

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



---

**Maestría en Ciencias  
en Acuicultura**

---

**Diversidad y estructura genética de la almeja mano de león  
(*Nodipecten subnodosus*) en la región central del Golfo de  
California**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**Brenda Priscila Oviedo Velázquez**

Ensenada, Baja California, México  
2017

Tesis defendida por  
**Brenda Priscila Oviedo Velázquez**

y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dra. Fabiola Lafarga De La Cruz**  
Director de tesis

**Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez**

**Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez**

**Dr. Zaúl García Esquivel**



---

**Dr. Jorge Abelardo Cáceres Martínez**  
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

---

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

Resumen de la tesis que presenta **Brenda Priscila Oviedo Velázquez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

**Diversidad y estructura genética de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) en la región central del Golfo de California**

Resumen aprobado por:

---

Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz  
**Director de tesis**

El pectínido *Nodipecten subnodosus* representa un recurso acuícola importante. Sin embargo, su importancia económica ha generado que sus poblaciones naturales estén actualmente reducidas o casi completamente agotadas. El objetivo de este trabajo fue caracterizar genéticamente a poblaciones silvestres y un lote de cultivo, evaluando el grado de diferenciación entre ellas. Se realizó una prospección en 60 sitios distribuidos en la región central del Golfo de California (GC) y se obtuvieron muestras de cuatro localidades: Bahía de los Ángeles (BLA), Punta El Soldado (PSO), Bahía de las Ánimas (ANI) y San Francisquito (SFR); adicionalmente se analizaron muestras procedentes de Isla Natividad (NAT) en la costa Pacífico (CP), además de un lote de juveniles de cultivo (F1 de Bahía de las Ánimas). Se amplificaron diez microsatélites especie-específicos mediante la técnica de PCR y se obtuvo una matriz de genotipos mediante análisis de fragmentos con electroforesis capilar de alta resolución. Posteriormente, se determinó la diversidad genética expresada en número de alelos ( $N_a$ ), riqueza alélica ( $R_a$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) y equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) con programas genéticos (GENALEX, FSTAT, GENEPOP). Para detectar estructura genética poblacional se calcularon los valores pareados de  $F_{ST}$  (ARLEQUIN), componentes genéticos (STRUCTURE y STRUCTURE HARVESTER), así como la dirección y magnitud del flujo genético (MIGRATE). Inicialmente se observó que la abundancia de este bivalvo se vio reducida, ya que a pesar del esfuerzo de prospección se encontraron muy pocos organismos en el área de estudio. En general, se encontró una moderada diversidad genética dentro del área de estudio ( $N_a = 2 - 12$ ,  $R_a = 3.815$ ,  $H_o = 0.60$ ,  $H_e = 0.75$ ). Los mayores valores de diversidad se detectaron en ANI ( $R_a = 4.096$ ) y los menores en SFR ( $R_a = 3.303$ ). Se observó un déficit de heterocigotos, que puede estar relacionado a la presencia moderada de alelos nulos. La variabilidad genética estuvo distribuida de forma homogénea en todas las localidades, por lo que no se observó estructura genética. Lo anterior, fue probablemente debido al fuerte flujo genético en dirección norte a sur, por el patrón de corrientes durante la época reproductiva. Los valores pareados de  $F_{ST}$  únicamente mostraron diferenciación, aunque relativamente baja, entre BLA y NAT ( $F_{ST} = 0.023$ ) y entre ANI y NAT ( $F_{ST} = 0.038$ ). Siendo NAT la única localidad fuera del GC y la geográficamente más lejana del resto de las incluidas en este estudio, el flujo genético entre estas localidades fue mínimo.

**Palabras clave:** *Nodipecten subnodosus*, microsatélites, diversidad genética, estructura genética, Golfo de California.

Abstract of the thesis presented by **Brenda Priscila Oviedo Velázquez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

**Diversity and genetic structure of the lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) from the central region of the Gulf of California**

Abstract approved by:

---

PhD. Fabiola Lafarga de la Cruz  
Thesis Director

The scallop *Nodipecten subnodosus* represents an important aquaculture resource. However, its economic importance has led to an overexploitation and their natural populations are currently reduced or almost completely depleted. The objective in this work was to genetically characterize populations in the wild and a cultured lot by evaluating the genetic variability between them. A survey was conducted in 60 sites distributed along the central region of the Gulf of California (GC) and samples were obtained at four locations: Bahía de los Angeles (BLA), Punta El Soldado (PSO), Bahía de las Animas (ANI) and San Francisquito (SFR). In addition, samples from Isla Natividad (NAT) on the Pacific coast (CP) were analyzed, as well a batch of hatchery-reared scallops (F1 from Bahía de las Animas). Ten species-specific microsatellites were amplified using the PCR technique and a genotype matrix was obtained by fragment analysis using high-resolution capillary electrophoresis. Subsequently, the genetic diversity expressed in number of alleles ( $N_a$ ), allelic richness ( $R_a$ ), observed and expected heterozygosity ( $H_o$ ,  $H_e$ ), inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) and Hardy-Weinberg equilibrium (EHW) was calculated with genetic programs (GENALEX, FSTAT, GENEPOP). To detect population genetic structure, the paired values of  $F_{ST}$  (ARLEQUIN) and genetic components (STRUCTURE and STRUCTURE HARVESTER) were calculated, as well as the direction and magnitude of the genetic flow (MIGRATE). Initially it was observed that the abundance of this bivalve was reduced, in spite of the prospecting effort, very few organisms were found in the study area. In general, a moderate genetic diversity was found within the study area ( $N_a = 2 - 12$ ,  $R_a = 3.815$ ,  $H_o = 0.60$ ,  $H_e = 0.75$ ). The highest values of diversity were detected in ANI ( $R_a = 4.096$ ) and the lowest in SFR ( $R_a = 3.303$ ). A deficit of heterozygotes was observed, which may be related to the moderate presence of null alleles. The genetic variability had an even distribution in all locations, so no population genetic structure was observed. This was probably due to the strong genetic flow in north-south direction, due to the pattern of currents during the breeding season. The paired values of  $F_{ST}$  only showed differentiation, although relatively low, between BLA and NAT ( $F_{ST} = 0.023$ ) and between ANI and NAT ( $F_{ST} = 0.038$ ). With NAT being the only location outside the GC and geographically farther from the rest of the ones included in this study, the genetic flow between these locations was minimal.

**Keywords:** *Nodipecten subnodosus*, microsatellites, genetic diversity, genetic structure, Gulf of California.

## Dedicatoria

### *At Dios*

Por todo lo bueno que concede en mi vida

### *At mis padres*

Por su amor y apoyo incondicional

### *At mi hermano Jaime*

Por ser mi motivación para seguir adelante, eres la persona más especial en mi vida, siempre voy a cuidar de ti

Keep your eyes open  
Filter out the crap  
Grow as hard shell  
But keep your soft heart  
BE MORE SCALLOP!

Bryce Stewart

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por contribuir en gran parte a mi formación académica y profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (Folio: 21865) para realizar mis estudios de maestría.

A los investigadores del Departamento de Acuicultura por compartir sus conocimientos durante las clases y a los miembros del CPP por aprobar el apoyo económico otorgado para asistir a los congresos y la continuación de la beca.

A mi directora de tesis, Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz, gracias por aceptarme entre sus estudiantes, por despejar y resolver mis dudas con el tema de investigación, por su paciencia y confianza, también por el gran apoyo que me dio para asistir a Portland (gracias también por llevarme al aeropuerto e ir por mí de regreso, fue un gran detalle de su parte).

A los miembros del comité de tesis, Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez, Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez y el Dr. Zaúl García Esquivel, por sus observaciones y sugerencias para mejorar esta investigación.

Al Oceanólogo Dahren Lindbergh Gómez Togo por facilitar las muestras para realizar los análisis genéticos.

A la M. en C. Carmen Elvira Vargas Peralta, técnico del laboratorio de genética acuícola, por su disponibilidad para otorgarme los reactivos y materiales necesarios.

A la M. en C. Ma. Dolores Camacho López, técnico del laboratorio de biotecnología marina, por su gran ayuda en la normalización de las muestras de DNA para RAD-Seq, gracias por tu amabilidad y paciencia.

A mis compañeros de generación: Marco, Miriam, Brenda, Arely, Estrella, José Antonio, Vladimir, también a los que se quedaron a mitad del camino, Claudia y Francisco, que gusto coincidir con ustedes y aventurarnos en esta experiencia del posgrado, compartir buenos momentos y grandes experiencias, éxito a todos.

A mis papás Jaime Oviedo y Reyna Velázquez, a mis hermanos Omar y Jimmy, a mi familia por apoyarme siempre, confiar en mí y dejarme volar, por darme ánimos para seguir mis sueños y alegrarse conmigo por cada logro, todo es gracias a ustedes, los amo.

A Marco Antonio, por tu compañía, amistad y amor durante estos dos años, por esas pláticas y tiempo juntos, tu apoyo y motivación, por tu cariño y comprensión, gracias a ti esta aventura fue mucho más divertida y feliz.

Por último, pero no menos importante, a las almejas, por regalarme un pedacito de su manto, fueron sin duda la parte esencial de este trabajo, espero que esta investigación contribuya de alguna manera para mejorar su manejo y protección.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatorias.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas.....	x

### Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes.....	2
1.1.1 Generalidades de la especie <i>Nodipecten subnodosus</i> .....	2
1.1.2 Distribución.....	3
1.1.3 Conectividad en el Golfo de California.....	5
1.1.4 Marcadores moleculares microsatélite.....	5
1.1.5 Diversidad genética.....	6
1.1.6 Parámetros para estimar la diversidad genética	7
1.1.7 Impacto de la acuicultura sobre la diversidad genética.....	8
1.1.7 Estudios genéticos en <i>Nodipecten subnodosus</i> .....	8
1.2 Justificación.....	11
1.3 Hipótesis.....	12
1.4 Objetivos.....	12
1.4.1 Objetivo general.....	12
1.4.2 Objetivos específicos.....	12

### Capítulo 2. Metodología

2.1 Origen de las muestras.....	13
2.2 Toma de muestras de organismos silvestres.....	15
2.3 Toma de muestras de juveniles de cultivo.....	15
2.4 Extracción de DNA genómico.....	15
2.5 Amplificación de los microsatélites.....	16
2.6 Genotipado.....	17
2.7 Análisis de diversidad genética.....	18

2.8	Análisis de estructura genética.....	18
2.9	Análisis estadístico.....	19
<b>Capítulo 3. Resultados</b>		
3.1	Extracción de DNA genómico.....	20
3.2	Amplificación de los microsatélites.....	21
3.3	Genotipado.....	23
3.4	Análisis de diversidad genética por localidad.....	23
3.4.1	Bahía de los Ángeles.....	23
3.4.2	Punta El Soldado.....	24
3.4.3	Bahía de las Ánimas.....	24
3.4.4	San Francisquito.....	25
3.4.5	Isla Natividad.....	25
3.4.6	F1 de Bahía de las Ánimas.....	26
3.5	Diversidad genética promedio por localidad y por marcador.....	26
3.6	Análisis estadístico de parámetros genéticos entre localidades.....	30
3.7	Análisis de estructura genética en la región central del GC.....	35
3.7.1	Asignación poblacional.....	35
3.7.2	Diferenciación genética poblacional.....	38
3.7.3	Flujo genético.....	38
<b>Capítulo 4. Discusión</b>		
4.1	Obtención de muestras y amplificación de microsatélites.....	40
4.2	Diversidad genética.....	42
4.3	Estructura genética.....	46
<b>Capítulo 5. Conclusiones.....</b>		
5.1	Recomendaciones.....	50
<b>Literatura citada.....</b>		51
<b>Anexos.....</b>		60



## Lista de figuras

Figura		Página
1	Distribución de <i>Nodipecten subnodosus</i> .....	4
2	Área de prospección para la recolección de muestras de almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> .....	13
3	Localización geográfica de los sitios de muestreo de almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> .....	14
4	Electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 60 min a 80 volts. Muestras del lote de reproductores (n=19) provenientes de Bahía de las Ánimas (ANI). Todas las fueron estandarizadas a una concentración de 50 ng/μl. Esc: marcador de referencia de 1 Kb.....	20
5	Concentración e índices de calidad del DNA obtenido (A. relación 260/280 y B. Relación 260/230) con el protocolo comercial.....	20
6	Visualización de productos de PCR en gel de agarosa al 1.2% durante 60 minutos a 80 volts en super buffer 1X. Microsatélite <i>NsubA235</i> del lote de juveniles en cultivo en Bahía de las Ánimas. Esc: marcador de referencia de 50 pb, C+ (control positivo), C- (control negativo).....	22
7	Electroferogramas de un organismo homocigoto para el locus <i>NsubA249</i> (A) y un organismo heterocigoto para el locus <i>NsubC261</i> (B), obtenido mediante electroforesis capilar de alta resolución.....	23
8	Frecuencias alélicas de los alelos detectados mediante los loci A) <i>NsubA004</i> , B) <i>NsubA208</i> C) <i>NsubC205</i> , D) <i>NsubC261</i> , E) <i>NsubA249</i> , F) <i>NsubA245</i> , G) <i>NsubA235</i> , H) <i>NsubA005</i> , I) <i>NsubA1G09</i> y J) <i>NsubA1F03</i> .....	29
9	Número de alelos (A) y riqueza alélica (B) por localidad en los diez loci microsatélite. Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana. Con las barras horizontales inferiores se representa el valor de significancia [ $*(p<0.05)$ , $** (p<0.01)$ , $*** (p<0.001)$ ].....	31
10	Heterocigosidad observada (A) y esperada (B) por localidad en los diez loci microsatélite. Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana. Con las barras horizontales inferiores se representa el valor de significancia [ $*(p<0.05)$ , $** (p<0.01)$ , $*** (p<0.001)$ ].....	32
11	Coefficiente de endogamia (A) y frecuencia de alelos nulos (B) por localidad en los diez loci microsatélite. Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana.....	33

12	Número de alelos privados por localidad en los diez loci microsatélite. Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana.....	34
13	Estructura genética de <i>N. subnodosus</i> de bancos naturales y un lote de cultivo con diez loci microsatélite para A (K = 8), B (K = 3) y C (K = 2) componentes genéticos (valor de K asignado). BLA= Bahía de los Ángeles, PSO= Punta El Soldado, ANI= Bahía de las Ánimas, SFR= San Francisquito, NAT= Isla Natividad (Pacífico), F1ANI= F1 de Bahía de las Ánimas.....	36
14	Estructura genética de <i>Nodipecten subnodosus</i> en cuatro localidades de la región central del GC con ocho loci microsatélite para A (K = 4), B (K = 3) y C (K = 2) componentes genéticos (valor de K asignado). BLA= Bahía de los Ángeles, PSO= Punta El Soldado, ANI= Bahía de las Ánimas, SFR= San Francisquito.....	37
15	Dirección y magnitud del flujo genético de <i>N. subnodosus</i> a lo largo del Golfo de California. Los vectores representan la dirección del flujo y el grosor del vector la magnitud (las flechas sólidas indican la mayor cantidad de flujo genético y las punteadas la menor cantidad).....	39
16	Delta k obtenida mediante la prueba de Evanno, que indica el número más probable de componentes genéticos (K = 2) para las muestras silvestres y de cultivo con diez loci microsatélite.....	66
17	Delta k obtenida mediante la prueba de Evanno, que indica el número más probable de componentes genéticos (K = 4) para las muestras silvestres dentro del GC con ocho loci microsatélite.....	66
18	Número de alelos (A) y riqueza alélica (B) por microsatélite (diez loci). Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana. Con las barras horizontales inferiores se representa el valor de significancia [ $*(p<0.05)$ , $** (p<0.01)$ , $*** (p<0.001)$ ].....	67
19	Heterocigosidad observada (A) y esperada (B) por microsatélite (diez loci). Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana. Con las barras horizontales inferiores se representa el valor de significancia [ $*(p<0.05)$ , $** (p<0.01)$ , $*** (p<0.001)$ ].....	68
20	Coeficiente de endogamia (A) y frecuencia de alelos nulos (B) por microsatélite (diez loci). Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana.....	69
21	Número de alelos privados (AP) por microsatélite (diez loci). Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana.....	70

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Inventario de muestreos genéticos de almeja mano de león <i>Nodipecten subnodosus</i> .....	14
2	Descripción de los marcadores moleculares microsatélite utilizados.....	16
3	Master mix para amplificación de DNA por PCR utilizando la enzima <i>Taq</i> polimerasa (Kapa Biosystems).....	17
4	Número de muestras que amplificaron para cada microsatélite y localidad.....	21
5	Porcentaje de éxito de amplificación para cada microsatélite.....	22
6	Resumen de parámetros genéticos por marcador.....	27
7	Diversidad genética de <i>N. subnodosus</i> en las localidades silvestres y el lote de cultivo con base en diez loci microsatélite.....	28
8	Valores de $F_{ST}$ (debajo de la diagonal) y p-valores (arriba de la diagonal). Los valores en negritas son significativos ( $p < 0.05$ ).....	38
9	Número de migrantes entre las localidades del GC. Las poblaciones en filas están dando migrantes a poblaciones en columnas. Los números en negrita indican flujo genético unidireccional entre las localidades (valores significativos).....	39
10	Parámetros genéticos estimados para los diez loci en la localidad de Bahía de los Ángeles.....	60
11	Parámetros genéticos estimados para los diez loci en la localidad de Punta El Soldado.	61
12	Parámetros genéticos estimados para los diez loci en la localidad de Bahía de las Ánimas.....	62
13	Parámetros genéticos estimados para los diez loci en la localidad de San Francisquito.....	63
14	Parámetros genéticos estimados para los diez loci en la localidad de Isla Natividad.....	64
15	Parámetros genéticos estimados para los diez loci en el lote de juveniles (F1ANI).....	65

## Capítulo 1. Introducción

---

La demanda mundial de productos acuícolas ha aumentado en los últimos años, mientras que la producción de pesca se ha estancado como consecuencia de la sobreexplotación (Martínez, 2005). La contribución de la acuicultura al suministro mundial de peces, crustáceos y moluscos ha crecido significativamente en las últimas décadas. Entre 1980 y 2012, el volumen de la producción acuícola mundial incrementó a una tasa media anual del 8.6%, siendo los cultivos principales peces, crustáceos y moluscos (FAO, 2014). Los moluscos son actualmente el tercer grupo más importante de los organismos marinos en términos de ganancia económica en la acuicultura (Lovatelli *et al.*, 2008). En 2014 la producción de organismos provenientes de acuicultura fue de 73.8 millones de toneladas, de éstas 16.1 millones de toneladas pertenecieron sólo a moluscos, de las cuales se cultivaron 104 especies con un valor total de 19 mil millones de USD (FAO, 2016).

Los bivalvos son animales ideales para el desarrollo sustentable de la acuicultura, su cultivo tiene un bajo impacto ambiental, ya que son filtradores y requieren un manejo mínimo, además de una menor infraestructura para su cultivo, el cual puede realizarse en aguas abiertas, por lo cual dependen únicamente de las microalgas que se encuentran de forma natural en el agua de mar para alimentarse (Osuna-García, 2004; Koch *et al.*, 2005). Las poblaciones naturales proveen la mayor parte de la producción, aunque en algunas especies los bancos naturales se están acercando o han sobrepasado ya el límite sostenible (Avendaño *et al.*, 2001; Helm *et al.*, 2006). La captación de semilla del medio natural es también una práctica habitual, pero debe pensarse en otra opción para la obtención de semilla de forma permanente (Maguiño-Napurí *et al.*, 2011). Una solución para satisfacer la demanda de semilla de la industria de bivalvos es el cultivo en criadero. La producción de semilla en laboratorios aporta un pequeño porcentaje de los requerimientos totales, pero es posible que las necesidades aumenten, a medida que se generen variedades seleccionadas genéticamente con condiciones específicas de crecimiento o resistencia (Helm *et al.*, 2006).

En México el cultivo de bivalvos se realiza mayormente en el noroeste del país; Baja California es el primer productor de moluscos bivalvos cultivados en el país. Los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa son los que cuentan con más áreas certificadas para el cultivo de moluscos bivalvos (COFEPRIS, 2017). Sin embargo, la producción de pectínidos por acuicultura es escasa y en su mayoría proviene de poblaciones silvestres (FAO, 2010). A pesar de que en el país la producción de moluscos se basa principalmente en ostiones del género *Crassostrea*, hay especies como *Nodipecten subnodosus*, que

por su alto valor comercial, así como por su rápida tasa de crecimiento, se consideran con un alto potencial de cultivo (Villalejo-Fuerte *et al.*, 2004; Maeda-Martínez, 2008; Massó-Rojas *et al.*, 2014). No obstante, su importancia económica ha provocado una sobreexplotación de este recurso en diferentes cuerpos de agua de la península de Baja California, debido a ello su abundancia ha disminuido al grado de que su pesquería se ha restringido. En la actualidad el abasto de semillas del medio natural no es suficiente como para soportar un cultivo a escala comercial (Maguiño-Napurí *et al.*, 2011). Por estas razones es importante realizar una evaluación de las poblaciones naturales de almeja mano de león existentes en su rango natural de distribución para poder implementar programas óptimos de manejo y cultivo del recurso.

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Generalidades de la especie *Nodipecten subnodosus*

El molusco bivalvo *Nodipecten subnodosus* es una de las especies de mayor tamaño dentro de la familia Pectinidae, comúnmente llamada almeja mano de león o garra de león. Es una especie de particular interés para la acuicultura mexicana, tiene una tasa rápida de crecimiento, puede alcanzar hasta 10 cm de altura de la concha en 12 meses y su músculo aductor puede llegar a pesar hasta 50 g (Racotta *et al.*, 2003). Tiene una gran demanda comercial a nivel nacional e internacional debido al sabor de su músculo aductor comúnmente llamado “callo” (Beltrán-Lugo *et al.*, 2006). Asimismo, las conchas que presentan un color naranja muy llamativo, también se consideran un subproducto de la pesquería (Ponce-Díaz *et al.*, 2011). Recientemente también ha incrementado el interés en perlas de almeja mano de león, pues su coloración va del blanco al rosa o purpura, detalles que le confieren un alto valor comercial a dichas perlas (Torres-Martínez *et al.*, 2012).

Esta especie es hermafrodita funcional, a pesar de que se producen ambos tipos de células sexuales (ovocitos y espermatozoides) al mismo tiempo; éstas no son liberadas simultáneamente, por lo regular liberan primero el esperma y más tarde los ovocitos (Arellano-Martínez *et al.*, 2011). Debido a su condición hermafrodita, la autofecundación es posible, dando como resultado la reducción en variabilidad genética, lo cual a su vez afecta la capacidad adaptativa de la especie (Toro *et al.*, 2009). Además, presenta una alta tasa de fecundidad (> 2 millones de ovocitos por hembra), que incrementa la endogamia en generaciones posteriores (Petersen *et al.*, 2008). La endogamia puede generar efectos perjudiciales, tales como

afectaciones en la capacidad reproductiva, supervivencia, resistencia a enfermedades y crecimiento en los organismos en cultivo (Ibarra *et al.*, 2011).

Una evaluación de este recurso en el interior de la Laguna Ojo de Liebre a inicios del año 2010 mostró un crecimiento poblacional constante comparado con el de años anteriores. No obstante, en la evaluación de febrero 2011 se observó una disminución en la población de almeja de alrededor de 2.25 millones de organismos (3.7%) en relación con el año anterior. También en mayo de 2011, los pescadores de este recurso reportaron una mortandad masiva de organismos y en septiembre de ese mismo año, tras realizar una prospección se estimó que esa mortalidad incluyó a casi 40% de la población que se tenía inicialmente estimada (Massó-Rojas *et al.*, 2014). En ese mismo año, Villalva-Vega (2011) encontró ejemplares de almeja mano de león cultivados en Bahía Tortugas, Baja California Sur, con deformaciones y depósitos marrones en la cara interna de la concha, asociados a un bajo crecimiento y a altas tasas de mortalidad. Sus resultados mostraron que el problema se debió a vibriosis, una enfermedad causada por bacterias que produce deformidades en la concha y puede incluso ocasionar la muerte del animal. Cáceres-Martínez (2007) menciona que las enfermedades son uno de los problemas que puede enfrentar el cultivo de cualquier organismo, incluyendo los bivalvos. Si bien éstas ocurren de manera natural como un mecanismo de control de las poblaciones, en condiciones de cultivo su presencia puede provocar pérdidas económicas o incluso la desaparición de la actividad.

### **1.1.2 Distribución**

Se distribuye a lo largo de las costas del Pacífico y Golfo de California en México hasta Perú (Keen, 1971; Massó-Rojas *et al.*, 2014) (Fig. 1). Sin embargo, ambas costas mexicanas presentan diferencias tanto en temperatura como en disponibilidad de alimento, lo cual condiciona el crecimiento de los organismos. Los cultivos de almeja en el Pacífico muestran mejores resultados en cuanto a crecimiento, debido a que la disponibilidad de alimento es mayor que en el Golfo y la temperatura es en general más baja, lo que favorece su crecimiento (Koch *et al.*, 2015).

No obstante su extenso rango de localización, los bancos comerciales sólo se registraban en las lagunas Guerrero Negro y Ojo de Liebre, B.C.S. (DOF, 2012). En Baja California, *N. subnodosus* se considera una especie en validación acuícola, es decir, su cultivo ha sido únicamente con propósitos de investigación a

través de permisos de fomento y aún no se tienen concesiones para la acuicultura comercial de la especie (SEPESCABC, 2011).



**Figura 1.** Distribución de *Nodipecten subnodosus*.

No hay una Norma Oficial que regule el manejo y aprovechamiento de *N. subnodosus*. Si bien la distribución de esta especie dentro del Golfo de California comprende la Reserva de la Biosfera de Bahía de los Ángeles, Canal de Ballenas y Canal Salsipuedes (RBBLA, por sus siglas) y a pesar de que su cultivo no se encuentra permitido a escala comercial, no se encuentra enlistada en la NOM-059-SEMARNAT-2010 en ninguna categoría y tampoco ha sido evaluada para la Lista Roja de la Unión internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés).

### 1.1.3 Conectividad en el Golfo de California

La conectividad en genética se define como el grado en el cual el paisaje facilita o impide el movimiento de los individuos (Taylor *et al.*, 1993) y consta de dos componentes: la conectividad funcional y la conectividad estructural. El primero hace referencia a al flujo genético y el segundo a la estructura del paisaje, como la presencia de barreras o la continuidad del hábitat que son cruciales para el movimiento de los organismos (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez, 2013). En este sentido, el Golfo de California (GC) es uno de los ecosistemas oceánicos más productivos. El régimen de vientos dentro del Golfo es variable: de noviembre a mayo prevalecen vientos provenientes del noroeste, el resto del año prevalecen vientos provenientes del sureste que generan condiciones climáticas de tipo tropical (Escalante *et al.*, 2013). Presenta un patrón de dirección de la corriente superficial de norte a sur durante la primavera, con una velocidad de 5 a 7 m/s. Mientras que el patrón cambia de sur a norte durante el verano, velocidad de 3 a 5 m/s (Marinone, 2003). Estas condiciones favorecen la dispersión de las larvas de numerosos organismos, incluyendo los moluscos bivalvos.

Tremblay *et al.* (2012) mencionan que algunos pectínidos pueden desplazarse nadando a través de corrientes de agua, esto por la contracción del músculo aductor y el cierre de las valvas. La mayoría de los organismos marinos tienen estadios larvarios planctónicos, la dispersión de estas larvas puede crear conexiones entre poblaciones de organismos marinos bentónicos que están geográficamente separadas (Riginos *et al.*, 2011). El flujo genético de diversos grupos de invertebrados bentónicos con estadio de larva pelágica ha sido investigado, asimismo su relación con la circulación del océano. En la mayoría de los casos la estructura y el flujo génico de las poblaciones se ha atribuido a la capacidad de la larva pelágica de dispersarse (Soliman *et al.*, 2012).

### 1.1.4 Marcadores moleculares microsatélite

Los marcadores moleculares representan una herramienta útil que han permitido caracterizar la variabilidad genética de un grupo, identificar especies, asignar paternidad o parentesco, identificar loci asociados a caracteres cuantitativos, realizar selección asistida por marcadores, entre otras funciones (Liu y Cordes, 2004; Astorga, 2008). Hay una gran variedad de marcadores genéticos moleculares, entre estos se encuentran las secuencias simples repetidas o SSR por sus siglas en inglés (*Simple Sequence Repeats*), comúnmente llamados microsatélites, que son secuencias de ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus



siglas en inglés), que consisten en unidades de 2 a 6 nucleótidos que se repiten consecutivamente, además se encuentran distribuidos aleatoriamente en el genoma, generalmente en regiones no codificantes (Schlötterer, 1998; Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

Otra de sus características es que son marcadores codominantes, es decir, un alelo lo hereda la madre y otro el padre, por lo que es posible identificar individuos homocigotos y heterocigotos. También son altamente polimórficos, esto es debido a la variación en el número de repeticiones en tándem (Hellberg *et al.*, 2002; Ellegren, 2004; Liu y Cordes, 2004). Las regiones contiguas a estas zonas generalmente son conservadas, gracias a lo cual es posible diseñar cebadores que permitan obtener muchas copias de estas zonas por amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Los microsatélites han sido ampliamente utilizados por su abundancia en el genoma y sus características intrínsecas que los hacen altamente informativos y han permitido medir la variabilidad genética de numerosos organismos en acuicultura (González, 2003; Astorga, 2008).

### **1.1.5 Diversidad genética**

La sobreexplotación ha afectado a una gran cantidad de especies de importancia comercial, que se han visto dañadas por la reducción en sus tamaños poblacionales, la cual está asociada con pérdida de diversidad genética debido a la deriva génica y a altos niveles de endogamia (Smith, 1996; CINU, 2008). La diversidad genética puede definirse como la variedad de alelos y genotipos presentes en poblaciones y especies, esta diversidad es muy importante pues les permite a las especies adaptarse a cambios en su entorno (FAO/UNEP, 1981; Hedrick, 2001).

En acuicultura es fundamental la evaluación de recursos genéticos de las poblaciones y grupos de reproductores, ya que los organismos para la fundación de lotes de reproductores e inicio de programas de selección genética provienen principalmente de poblaciones naturales y es esencial disponer de la mayor diversidad genética posible (Martínez, 2005). El estudio de la variabilidad genética, disponible tanto en poblaciones naturales como cultivadas, es la línea base tanto para el manejo de recursos naturales como para el mejoramiento genético en cultivo. Esto no solo con la finalidad de obtener un mejor rendimiento en cultivo, sino principalmente para no alterar las frecuencias alélicas de las poblaciones naturales que cohabiten con las cultivadas y mitigar el posible impacto en el acervo genético de la especie en cuestión (Ibarra *et al.*, 2011).

### 1.1.6 Parámetros para estimar la diversidad genética

Para documentar la cantidad de variación genética de manera estandarizada, necesitamos medidas que nos permitan cuantificar esta información. Existen diferentes parámetros genéticos para estimar esta variabilidad. Para empezar podemos decir que un alelo es una forma alternativa de un locus; en el análisis con microsatélites, se identifica como una variante con diferente número de repeticiones del motivo de repetición. Por lo tanto, el término número de alelos ( $N_a$ ) se refiere a las variantes que se encuentran en un individuo para un locus. El poder encontrar diferentes alelos en una población depende principalmente del tamaño de la muestra que se analiza. En cambio la riqueza alélica ( $R_a$ ) es el número de alelos por locus corregido por el tamaño de la muestra. Otro parámetro que a menudo se estima es la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), que es la proporción de organismos heterocigotos (con dos alelos diferentes para el mismo locus) calculada a partir del EHW. Para su cálculo es necesario obtener las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas, siguiendo un binomio cuadrado  $(p + q)^2$ , en donde  $p$  y  $q$  son las frecuencias alélicas y  $2pq$  la frecuencia de heterocigotos. Por su parte la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), es la proporción de organismos heterocigotos calculada a partir de los genotipos observados en una muestra poblacional. El equilibrio de Hardy Weinberg (EHW), es el equilibrio alcanzado en las frecuencias alélicas en una población panmíctica donde no hay mutación, migración, selección o deriva génica. Si dos alelos  $A_1$  y  $A_2$  tienen frecuencias  $p$  y  $q$ , las frecuencias en equilibrio de Hardy-Weinberg para los genotipos  $A_1A_1$ ,  $A_1A_2$  y  $A_2A_2$  serán  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$ , respectivamente. El coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), es otra medida de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg dentro de las subpoblaciones, donde los valores positivos indican una deficiencia de heterocigotos y los valores negativos indican un exceso de heterocigotos (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2000).

Otra estimación de la diferenciación genética es mediante el índice de fijación ( $F_{ST}$ ), que es una medida de la diferenciación genética entre subpoblaciones, toma valores que van del 0 a 1 (positivos); sin embargo, es posible encontrar valores negativos que se interpretan como cero. Se ha sugerido que valores en el rango de 0-0.05 indican escasa diferenciación, entre 0.05-0.15 indica moderada diferenciación, una gran diferenciación se encuentra entre 0.15-0.25, mientras que valores sobre 0.25 indican una muy grande diferenciación genética (Hartl y Clark, 1997).

### **1.1.7 Impacto de la acuicultura sobre la diversidad genética**

Es muy importante contar con un conocimiento básico sobre la genética de las especies con potencial de cultivo, o ya en cultivo, para efectuar programas óptimos de manejo y conservación de los recursos naturales, esto para evitar el deterioro de las poblaciones naturales. En este sentido, los aspectos básicos de genética poblacional no deben ser ignorados durante el desarrollo de la acuicultura (Martínez, 2005). Actualmente son pocas las opciones que proponen un manejo de los recursos naturales explotados que no ignoran la conservación de los mismos. En el caso de la acuicultura, principalmente realizada con especies nativas, es necesario implementar propuestas de cultivo que eviten el impacto sobre las poblaciones naturales de la especie, primordialmente en áreas destinadas para la conservación (Ibarra *et al.*, 2011). Disminuciones en el número de individuos de esta especie como las que se observaron en el año 2011, pueden haber originado cuellos de botella con alta pérdida de variabilidad genética, por eso es necesario evaluar la variabilidad genética en distintas áreas de distribución y tener un monitoreo constante de la recuperación de las poblaciones.

Sumado a la posibilidad de autofecundación, otro problema en la producción de larvas de moluscos, es la utilización de un bajo número de reproductores por desove debido a la alta fecundidad de estos organismos, así como a la baja disponibilidad de organismos maduros (Arellano-Martínez *et al.*, 2004). La repercusión de utilizar un número efectivo bajo es la deriva génica, o dicho de otra forma, el observar cambios en las frecuencias alélicas en la población en cultivo debido a la pérdida de los alelos portados por progenitores de la población inicial que no contribuyeron a la siguiente generación (Petersen *et al.*, 2008). Es importante mantener la diversidad genética en poblaciones cultivadas de almeja, ya que su etapa de engorde se produce en aguas abiertas adyacentes a las poblaciones naturales en condiciones físico-químicas cambiantes. La introgresión de individuos de cultivo en el medio natural, ya sea intencional o no, puede afectar la diversidad genética en la naturaleza, por lo que la movilidad de organismos entre el Golfo de California y el Pacífico con fines de cultivo debe de ser evitada (Ibarra *et al.*, 2011).

### **1.1.8 Estudios genéticos en *Nodipecten subnodosus***

A pesar de su extensa distribución, los estudios enfocados en la genética de *N. subnodosus* son pocos, y se considera como una 'especie nueva' desde el punto de vista de su aprovechamiento para cultivo (Ibarra *et al.*, 2011). En 2004 Maldonado-Amparo *et al.* realizaron experimentos enfocados en la inducción a la

triploidía, ya que los organismos triploides por tener un desarrollo pobre de la gónada, presentan mayores tasas de crecimiento, mejor calidad de la carne, músculo aductor más grande y un mejor sabor. La obtención de triploides se ha logrado aplicando diferentes concentraciones de citocalasina-B, que es un antibiótico que inhibe la formación del cuerpo polar. Sin embargo, se encontró un resultado diferente a lo esperado, ya que la triploidía no resultó en una ventaja productiva sobre la diploidía en el medio donde se evaluó el crecimiento por el contrario, se observaron tamaños y pesos significativamente menores en comparación con los diploides.

También se han desarrollado 72 marcadores moleculares tipo microsatélite, que se han empleado en el estudio de las poblaciones naturales y en propuestas eficientes para la producción de semilla no endogámica. Ibarra *et al.* (2006) en su primer trabajo de caracterización de 35 loci microsatélites, amplificaron estos marcadores en una muestra con 25 organismos provenientes de Laguna Ojo de Liebre y cinco de Bahía de La Paz, siendo estos los primeros bancos evaluados en términos de diversidad genética; además se probó y verifico la amplificación cruzada con otros pectínidos como *Argopecten irradians* (EUA, Atlántico); *A. purpuratus* (Chile, Pacífico); *A. ventricosus* (México, Pacífico) y *Nodipecten nodosus* (Venezuela, Atlántico). La mayoría de los loci estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg (32 de 35) y presentaron un nivel de polimorfismo mediano y alto (rango alélico de 4-28 alelos por loci).

Seis marcadores microsatélite en conjunto con el DNA mitocondrial (12S y 16S rRNA) se utilizaron para establecer el impacto en la estructura genética ocasionado por los desoves en masa en la progenie producida. En este estudio realizado por Petersen *et al.* (2008) identificaron el parentesco materno y paterno de una muestra de la progenie de un desove en masa donde se utilizaron seis almejas para determinar el grado de contribución de cada desove. Los genotipos de los seis reproductores y 374 semillas resultantes con los seis loci microsatélites se combinaron con la secuenciación de DNA mitocondrial para asignar el origen materno y paterno. Los datos con ambos marcadores revelaron que el 51.7% de la progenie eran hermanos completos, con una contribución desigual de los seis reproductores. Todos los reproductores contribuyeron paternalmente (aunque desigualmente); sin embargo, solo dos reproductores tuvieron la mayor contribución materna. La asignación de parentesco mostró que dos reproductores contribuyeron con el 36.9% y 39.1% de los gametos totales. Estos resultados ayudan a comprender la composición genética de las semillas producidas por desove en masa inducidos y proporcionan una base para el desarrollo de técnicas más eficaces de desove en especies hermafroditas funcionales.

Posteriormente, Petersen *et al.* (2009) caracterizaron otros 37 marcadores microsatélites específicos para *N. subnodosus*, siendo estos probados en una muestra de 24 organismos provenientes de Laguna Ojo de Liebre, B.C.S.; en estos la riqueza alélica vario de 5 a 27 alelos por locus, con una heterocigosidad esperada de 0.76 además diez loci mostraron desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg debido a la presencia de alelos nulos. Asimismo 16 loci mostraron amplificación cruzada en especies de pectínidos cercanamente relacionados con la almeja mano de león, y casi nada o nula amplificación se mostró en especies del genero *Argopecten*.

El único estudio sobre la variabilidad genética de *N. subnodosus* es el realizado por Petersen *et al.* (2010) en el que evaluó las poblaciones naturales del Pacífico y del Golfo de California, determinando la variación genética entre y dentro de poblaciones naturales y de cultivo de almeja utilizando DNA nuclear (14 microsatélites) y DNA mitocondrial (subunidades mitocondriales 12S y 16S rRNA). Obtuvieron muestras de cuatro localidades del GC (Bahía de La Paz, Loreto, Bahía de Los Ángeles e Isla Tiburón) y siete localidades de la costa del Pacífico (El Conchalito, Canal Barcazas, Banco la Concha, El Dátil, El Alambre, El Mariscal y La Ventana), así como también de tres empresas dedicadas al cultivo de esta especie en Guerrero Negro y Bahía Tortugas. La información obtenida con los microsatélites reveló que las muestras provenientes de acuicultura mostraron una menor diversidad, medida por la heterocigosidad esperada y la riqueza de alelos, que las poblaciones naturales. Asimismo, los microsatélites demostraron que las poblaciones de almeja distribuidas en diferentes bancos a lo largo del Golfo de California, y la Laguna Ojo de Liebre en las costas del Pacífico, actúan como dos poblaciones genéticamente distintas; cabe mencionar que estas poblaciones fueron evaluadas antes de observarse la mortandad masiva en el año 2011 anteriormente mencionada (Massó-Rojas *et al.*, 2014). Por otra parte, a nivel de DNA mitocondrial se evidenció la existencia de dos clados, ambos presentes en el Pacífico y GC, aunque en diferentes frecuencias. El mitotipo más común se encontró en 42 de los 95 individuos secuenciados, ese y otros tres mitotipos se encontraron en ambas costas, esto parece evidenciar que ha habido una introgresión entre los miembros de los dos clados mitocondriales. La divergencia en el DNA mitocondrial eclipsa la evidencia de la estructura de la población revelada por los datos de microsatélites.

Por último, usando 73 microsatélites y polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) se crearon los primeros mapas de ligamiento genético para esta especie (Petersen *et al.*, 2012). Los cuales se emplean para identificar loci relacionadas con caracteres cuantitativos que son de importancia para la acuicultura, principalmente la longitud, el color naranja de la concha y un mayor tamaño del músculo aductor. En este estudio, se identificaron cuatro loci microsatélites asociados con el pigmento de color naranja de la concha (*NsubA1F04*, *Nsub2A1F01B*, *NsubA1F03* y *NsubA245*). El desarrollo de estos mapas y

la identificación de grupos de ligamiento para rasgos de crecimiento podrían ayudar en la selección asistida por marcadores para mejorar el crecimiento de la almeja mano de león en la acuicultura.

Tomando en cuenta estos antecedentes y considerando que *N. subnodosus* cuenta con una etapa larvaria planctónica de aproximadamente tres semanas antes de asentarse en el sustrato, se espera que la circulación del Golfo de California tenga un efecto en la dispersión larval de este pectínido y en consecuencia niveles bajos de diferenciación genética que podrían incrementarse entre sitios geográficamente distantes.

## **1.2 Justificación**

Ante el eminente crecimiento de la población humana, la acuicultura representa una alternativa para satisfacer la demanda de alimentos de origen animal con proteína de alta calidad. Sin embargo, es necesario diversificar las especies que actualmente se cultivan. La almeja mano de león se considera una especie atractiva para la acuicultura, debido a su alto valor económico y su rápido crecimiento. En acuicultura es de gran utilidad conocer la variabilidad genética de las poblaciones naturales, dado que de aquí se obtienen los lotes de reproductores que serán mantenidos en cautividad para producir progenies viables para su producción masiva.

Las pérdidas en variabilidad genética, causadas ya sea por una reducción en el tamaño de las poblaciones silvestres o por introducción de semillas altamente endogámicas producidas inadecuadamente (riesgo de autofecundación, posible en esta especie hermafrodita funcional), pueden generar efectos negativos en los organismos cultivados, como disminución en las tasas de crecimiento y/o supervivencia, entre otros. Además, dado que se han observado disminuciones en el tamaño de la población de bancos naturales causado por diversos factores, principalmente sobreexplotación pesquera, pesca ilegal y mortandades masivas del recurso, es necesaria la evaluación de las poblaciones naturales de almeja para conocer cómo se encuentra actualmente la población, para poder implementar programas óptimos de manejo y conservación.

Por lo cual, el objetivo del presente proyecto fue evaluar la diversidad genética de organismos silvestres de almeja mano de león provenientes de distintos bancos naturales del Golfo de California y un banco de la costa del Pacífico; además de un lote de juveniles producido en laboratorio, mediante el uso de

microsatélites. Esta información genética básica permitirá identificar si existe diferencia y estructuración genética entre las poblaciones silvestres de *N. subnodosus* en el Golfo de California.

### **1.3 Hipótesis**

Los bancos de almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) dentro de la región central del Golfo de California no presentan diferencia en su estructura genética, debido al flujo genético ocasionado por el patrón de corrientes oceánicas de la región.

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo general**

Determinar la diversidad y estructura genética de bancos naturales de almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) en la región central del Golfo de California mediante marcadores moleculares microsatélite.

#### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Optimizar las técnicas de amplificación de marcadores microsatélites especie-específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Evaluar la diversidad genética en cuatro bancos naturales de almeja en la región central del Golfo de California, un banco de la costa del Pacífico y un lote de juveniles obtenidos en laboratorio.
- Determinar la estructura genética de la almeja mano de león en la región central del Golfo de California (Bahía de los Ángeles-San Francisquito).

## Capítulo 2. Metodología

### 2.1 Origen de las muestras

Para la evaluación de la diversidad y estructura genética de *N. subnodosus* se realizó una prospección desde San Luis Gonzaga hasta El Barril, Baja California (Fig. 2), donde se llevaron a cabo 180 buceos en 60 sitios realizados por el Oceanólogo Dahen L. Gómez Togo. A pesar de la extensa área que se abarcó únicamente se obtuvieron muestras de cuatro localidades en la región central del Golfo de California: Bahía de los Ángeles (BLA, n=30), Punta El Soldado (PSO, n=16), Bahía de las Ánimas (ANI, n=37), San Francisquito (SFR, n=6). Adicionalmente, se consiguieron muestras de Bahía de La Paz (BLP, n=30) y de una localidad del Pacífico en Isla Natividad (NAT, n=5) (Fig. 3). Asimismo, se evaluó un lote de juveniles (n=32) que fueron obtenidos de un desove en el Laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanológicas (UABC) con reproductores provenientes de Bahía de las Ánimas. La prospección y colecta de tejido se efectuó de octubre 2015 a abril 2017 obteniéndose un total de 156 muestras (Tabla 1).



**Figura 2.** Área de prospección para la recolección de muestras de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Tomado de Google Earth, modificado por Gómez-Togo).





**Figura 3.** Localización geográfica de los sitios de muestreo de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Modificado de ReefGIS).

**Tabla 1.** Inventario de muestreos genéticos de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*.

Origen	Fecha de colecta	Muestras Totales (N)	Muestras analizadas (n)
<b>a) Silvestres</b>			
Bahía de los Ángeles, B.C. (BLA)	Octubre 2015	30	17
Bahía de las Ánimas, B.C. (ANI)	Mayo 2016, Junio 2016	37	14
Punta El Soldado, B.C. (PSO)	Julio 2016	16	8
San Francisquito, B.C. (SFR)	Febrero 2016	6	5
Bahía de La Paz, B.C.S (BLP)	Agosto 2016	30	-
Isla Natividad, B.C.S. (NAT)	Marzo 2017	5	5
<b>b) Lote de juveniles producidos en laboratorio</b>			
F1 de Bahía de las Ánimas (F1ANI)	Diciembre 2016	32	27
<b>Total</b>		<b>156</b>	<b>76</b>

## 2.2 Toma de muestras de organismos silvestres

La toma de las muestras fue *in situ*. Se extrajeron aproximadamente 30 mg de manto (en el caso de las muestras de organismos silvestres: BLA, PSO, ANI, SFR y BLP) y de músculo aductor en las muestras provenientes de NAT (almejas para consumo local) y el lote de juveniles (organismos con un promedio de 2.5 cm de longitud de la concha); con pinzas y tijeras estériles. Las muestras fueron etiquetadas y conservadas en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml con etanol al 96%. Posteriormente se trasladaron en hieleras con gel ice al laboratorio de Genética Acuícola y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

## 2.3 Toma de muestras de juveniles de cultivo

Se muestreo un lote de juveniles obtenidos en desoves realizados por el Dr. Zaúl García en el Laboratorio de Biotecnología de Moluscos del IIO (UABC) con reproductores provenientes de Bahía de las Ánimas. La semilla se mantuvo en cultivo en ANI y allí se tomaron muestras de 32 juveniles de aproximadamente seis meses de edad, los cuales se colocaron en tubos cónicos de 50 ml con etanol al 96% y se trasladaron en hieleras con gel ice al laboratorio de Genética Acuícola de CICESE. A la llegada de los juveniles se registró la longitud, altura y grosor de cada cocha. El tejido se separó de la concha, se colocó en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml con etanol al 96% y se etiquetaron individualmente, las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su análisis.

## 2.4 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA se realizó utilizando el kit “DNeasy Blood & Tissue” de QIAGEN® siguiendo las instrucciones del fabricante. La maceración del manto (20 mg) se hizo con nitrógeno líquido. Después de realizar la extracción de DNA se incubo con RNAsas a 37°C durante 40 min. La concentración y pureza del DNA se estimó por espectrofotometría con el equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) en las longitudes de onda 260/280 la cual indica la presencia de contaminación por proteínas y 260/230 que indica presencia de contaminantes por reactivos como fenoles. Una vez que se estimó la concentración del DNA, se hicieron diluciones a una concentración de 50 ng/μl y se almacenó a -20°C, el DNA concentrado restante se almacenó a -80°C. Para la verificación de la integridad del DNA extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 60 min a 80 volts con Súper Buffer 1X, usando como referencia un marcador de

peso molecular de 1 Kb para visualizar y determinar el tamaño del DNA. Previo a cargar las muestras en los pocillos del gel, se agregó Gel-red en cada muestra, para visualizarlo en el sistema digital de fotodocumentación (Gel Doc™ XR+ BIO-RAD) bajo luz UV, las imágenes se obtuvieron utilizando el programa Quantity One® (BIO-RAD).

## 2.5 Amplificación de los microsatélites

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron diez marcadores moleculares microsatélite (Tabla 2) los cuales son específicos para *N. subnodosus*, y han sido probados en trabajos previos de esta especie (Ibarra *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 2010). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador (Veriti Applied Biosystem).

**Tabla 2.** Descripción de los microsatélites utilizados.

Locus	Cebadores	Motivo de repetición	Tamaño estimado (pb)	Ta* (°C)	Referencia
<i>NsubA004</i>	F: TTTGACAGACATCCCTTCTTAC R: GAATGCGACATAGACATCG	(TCA) <sub>10</sub>	230-267	60°C	
<i>NsubA005</i>	F: CGACAAACATCCCCTCTT R: ACAGCGACCAGTGTAACG	(TCA) <sub>12</sub>	204-218	60°C	
<i>NsubA208</i>	F: GTTACGTGCGTGGACTGAA R: CGGCATCTGTACCTGACAC	(ATG) <sub>9</sub>	283-298	60°C	
<i>NsubA235</i>	F: GTGGCAAGTCTTATTTGGTAGA R: CTGTTTACTTTTCGATGCAAGTT	(TGA) <sub>11</sub>	200-230	60°C	Ibarra <i>et al.</i> (2006)
<i>NsubA245</i>	F: TGCCTATTTTCGATAACTGATTG R: TAATGCTAATACGGCACCAGT	(TCA) <sub>8</sub>	293-320	61°C	
<i>NsubA249</i>	F: CCGCTGAAAATCTCTCCT R: GCCCATCGTAACAATCT	(TCA) <sub>13</sub>	240-295	60°C	
<i>NsubC205</i>	F: GTCAAAAGGTTGGCAGTCTAAG R: CAGCATAAACCTACTCATGGT	(GATA) <sub>10</sub>	195-240	62°C	
<i>NsubC261</i>	F: TTCAAACGCACGTCATTTG R: CTTGGCACCATATTCGGAC	(TATC) <sub>8</sub>	125-200	62°C	
<i>NsubA1F03</i>	F: ACAATGTGGCAATGATGACG R: TCATCCATAAGCATCCACCA	(ATG) <sub>9</sub>	148-185	64°C	Petersen <i>et al.</i> (2009)
<i>NsubA1G09</i>	F: GCTATCTGCTGTGTGGACAA R: TGGGGAAATCCTTCCATGT	(CAT) <sub>9</sub>	342-372	64°C	

\*Ta: Temperatura de anillamiento

El protocolo implementado fue una modificación del utilizado por Petersen *et al.* (2010). Cada reacción consistió en 10 ng/ $\mu$ L de DNA, 1X Buffer, 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ L de BSA, 0.2 mM de dNTP's, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M de cada cebador y 0.15 U/ $\mu$ L de *Taq* polimerasa (Kapa Biosystems) y agua libre de nucleasas para completar un volumen total de reacción de 10  $\mu$ L (Tabla 3).

Las condiciones de PCR consistieron en 94°C de desnaturalización inicial por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, temperatura de anillamiento dependiente de los cebadores usados (Tabla 2) por 30 s, 72°C por 30 s y una extensión final de 72°C durante 10 min. La verificación de la amplificación de los fragmentos se realizó en gel de agarosa al 1.2% a 60 volts durante 80 min en Súper Buffer 1X y se comparó con un marcador de peso molecular de 50 pb (Sigma-Aldrich) para verificar su tamaño.

**Tabla 3.** Master mix para amplificación de DNA por PCR utilizando la enzima *Taq* polimerasa (Kapa Biosystems).

Concentración inicial	Compuesto	Concentración final	Muestra 1X ( $\mu$ L)
10 X	Buffer A	1 X	1.0
10 $\mu$ g/ $\mu$ L	BSA	0.2 $\mu$ g/ $\mu$ L	0.2
2.5 mM	dNTP's	0.2 mM	0.8
25 mM	MgCl <sub>2</sub>	2.0 mM	0.2
10 $\mu$ M	Cebador Forward	1 $\mu$ M	1.0
10 $\mu$ M	Cebador Reverse	1 $\mu$ M	1.0
5 U/ $\mu$ L	Taq Polimerasa	0.15 U/ $\mu$ L	0.3
50 ng/ $\mu$ L	DNA genómico	10 ng/ $\mu$ L	2.0
	Agua libre de nucleasas		3.5
Volumen de rx final			10.0

## 2.6 Genotipado

El genotipado de los organismos muestreados se realizó a partir del análisis de fragmentos mediante electroforesis capilar de alta resolución en QIAxcel (Qiagen) con el método OM500 y utilizando marcadores de alineamiento de 15 y 600 pb. Una vez generados los reportes de lecturas por este equipo, los alelos de cada locus se asignaron de acuerdo a su tamaño y se obtuvo el genotipo de cada organismo para cada

locus. Con los datos obtenidos se generó una matriz de datos con los genotipos de cada localidad en formato Excel.

## 2.7 Análisis de diversidad genética

Se utilizó el programa MICROCHECKER v2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) para detectar errores de genotipado, posteriormente se ajustaron a los formatos necesarios utilizando el programa CREATE 1.35 (Coombs *et al.*, 2008). Los parámetros de diversidad genética tales como número de alelos por locus ( $N_a$ ), heterocigosidad observada y esperada ( $H_o$ ,  $H_e$ ) y el número de alelos privados (AP) fueron calculados con el software GenAIEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). La frecuencia de alelos nulos se estimó en el programa ML-NullFreq (Kalinowski y Taper, 2006). Los coeficientes de endogamia ( $F_{IS}$ ) y la riqueza alélica ( $R_a$ ) fueron calculados con el programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995). La prueba global para detectar desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) fue analizado utilizando GENEPOP 4.0 (Raymond y Rousset, 1995).

## 2.8 Análisis de estructura genética

Para determinar la estructura poblacional de *N. subnodosus* en la región central del GC se utilizó el método de análisis de asignación bayesiana, éstos se basan en información genética para asignar a qué población pertenece un individuo, sin suponer poblaciones predefinidas; implementado por el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa asigna los individuos a un número específico (K) de poblaciones a partir de sus genotipos y simultáneamente, estima las frecuencias alélicas de los individuos de las poblaciones por medio de las cadenas de Markov tipo Monte Carlo (MCMC). El primer análisis exploratorio consideró ocho poblaciones (K), dado que se contaba con muestras de seis localidades y tomando en cuenta que cada localidad se tratara de una población distinta, pudieran distinguirse las poblaciones reales y no se ensombrecieran los resultados reales por la asignación de un número menor de K. Posteriormente el número de poblaciones se fue reduciendo hasta encontrar el número más probable de componentes (K). Para el segundo análisis exploratorio que incluyó únicamente a las cuatro localidades dentro del GC se inició con la asignación de seis poblaciones y de igual forma el número de componentes se redujo hasta determinar el número más probable de componentes. Las simulaciones se hicieron con base en  $1 \times 10^6$  interacciones, suponiendo frecuencias alélicas correlacionadas y bajo el

modelo de poblaciones mezcladas (*admixture model*). Se corrieron diez réplicas para cada K grupo para asegurar la reproducibilidad del análisis.

Posteriormente se realizó la prueba de Evanno (Evanno *et al.*, 2005) en el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl y VonHoldt, 2012) para determinar delta K ( $\Delta K$ ) que se refiere al número más probable de componentes genéticos. También se calculó la diferenciación genética mediante el índice de fijación ( $F_{ST}$ ) empleando el programa ARLEQUÍN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). La magnitud y dirección del flujo genético entre los sitios evaluados se estimó utilizando el enfoque de máxima verosimilitud implementado en MIGRATE 3.6.11 (Beerli y Felsenstein 1999; Beerli y Palczewski, 2010). MIGRATE utiliza un enfoque de coalescencia para estimar el número de migrantes (MLE) entre las poblaciones, suponiendo una tasa de mutación por locus constante. Se utilizaron diez búsquedas en cadena corta y tres búsquedas de cadena larga sobre las cinco localidades silvestres con diez loci microsatélite.

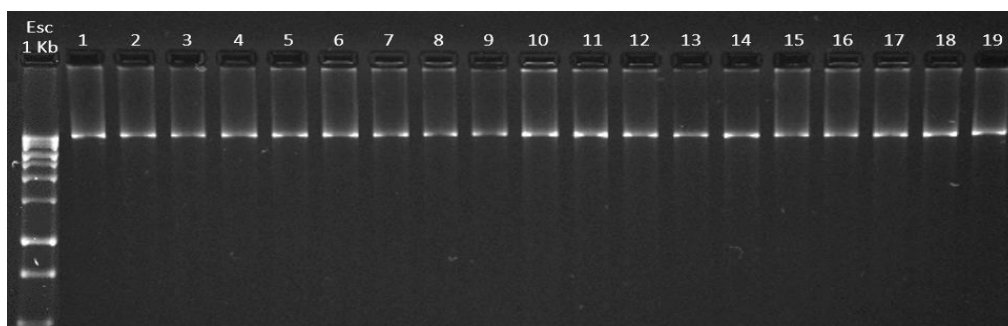
## 2.9 Análisis estadístico

Los parámetros genéticos analizados por locus fueron sometidos a pruebas de normalidad de Kolmogorov-Smirnov y homocedasticidad de varianzas de Levene's, en los datos que presentaron distribución normal e igualdad de varianzas se realizó una prueba ANOVA de una vía, en los datos donde estos supuestos no se cumplieron se aplicó la prueba de ANOVA no-paramétrica Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre las localidades evaluadas. Finalmente, se realizaron las comparaciones de los parámetros genéticos entre las localidades usando las pruebas *a posteriori* de Tukey y de Dunn respectivamente. Las pruebas se llevaron a cabo en el programa STATISTICA 10 (StatSoft, Inc.) fijando un nivel de confianza del 95% ( $\alpha=0.05$ ).

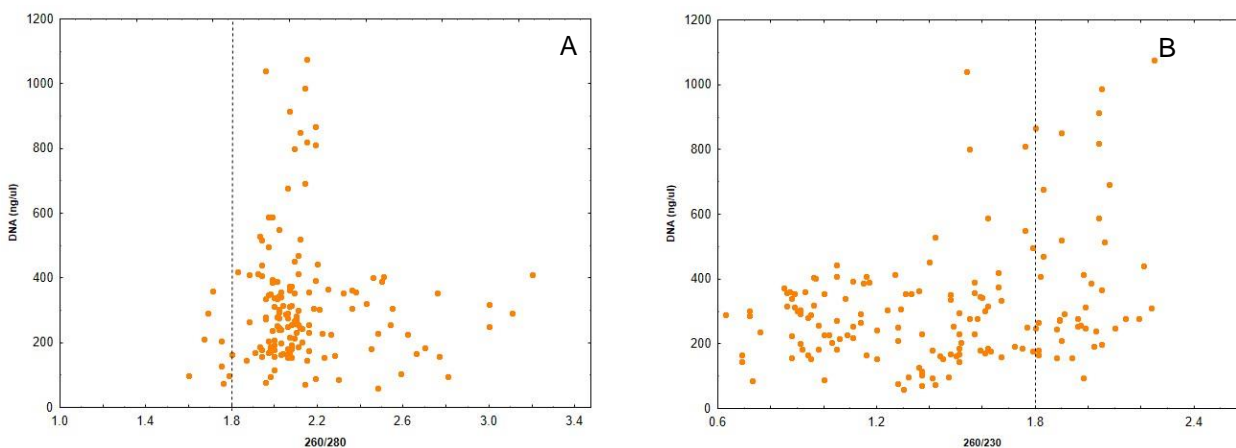
## Capítulo 3. Resultados

### 3.1 Extracción de DNA genómico

Todas las muestras de DNA fueron de alto peso molecular, igualmente la integridad de las moléculas del DNA fue la adecuada (Fig. 4). El DNA obtenido con el kit de extracción comercial tuvo en promedio una concentración de 313 ng/ $\mu$ l (DE = 190 ng/ $\mu$ l), el valor mínimo y máximo fueron 60 y 1,077 ng/ $\mu$ l, respectivamente (Fig. 5). Para la relación 260/280 nm, que mide la relación DNA/proteínas, el 95.5% de las extracciones obtenidas presentaron un valor por arriba de 1.8 (Fig. 5A). En cuanto a la relación 260/230 nm, que mide la relación DNA/solventes, únicamente el 26% de las muestras presentaron un valor superior a 1.8. Esta relación es importante a considerar, porque las muestras con un valor bajo en la relación 260/230 tienen presencia de contaminantes como fenoles o reactivos utilizados en la extracción que pueden interferir con la amplificación mediante PCR (Fig. 5B).



**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% durante 60 min a 80 volts. Muestras del lote de reproductores (n=19) provenientes de Bahía de las Ánimas (ANI). Todas las muestras fueron estandarizadas a una concentración de 50 ng/ $\mu$ l. Esc: marcador de referencia de 1 Kb.



**Figura 5.** Concentración y calidad del DNA obtenido (A. relación 260/280 y B. Relación 260/230) con el protocolo comercial.

### 3.2 Amplificación de los microsatélites

A pesar de que todo el DNA obtenido fue de buena calidad, el DNA de manto (muestras de BLA, ANI, PSO, SFR y BLP) presentó mayor cantidad de pigmentos que impidieron la amplificación de un gran número de muestras (únicamente se obtuvo amplificación exitosa de 44 muestras de las 119 disponibles). Por el contrario el DNA que se obtuvo con músculo aductor (muestras de F1-ANI y NAT) no tenía pigmentos, lo cual no pareció inhibir la amplificación de los microsatélites (amplificación exitosa con 32 de las 37 muestras disponibles) (Tabla 4). De las 156 muestras totales con las que se contaba solo 62 amplificaron para los diez microsatélites (39.7% de éxito), 7 muestras amplificaron para nueve loci (4.5%), 15 muestras amplificaron únicamente para un locus (9.6%) y en 46 muestras no fue posible obtener ningún producto de PCR (29.5%). Un caso excepcional fueron las muestras provenientes de Bahía de La Paz, ya que no se pudo obtener ninguna amplificación (0%; Tabla 4).

**Tabla 4.** Número de muestras que amplificaron para cada microsatélite y localidad.

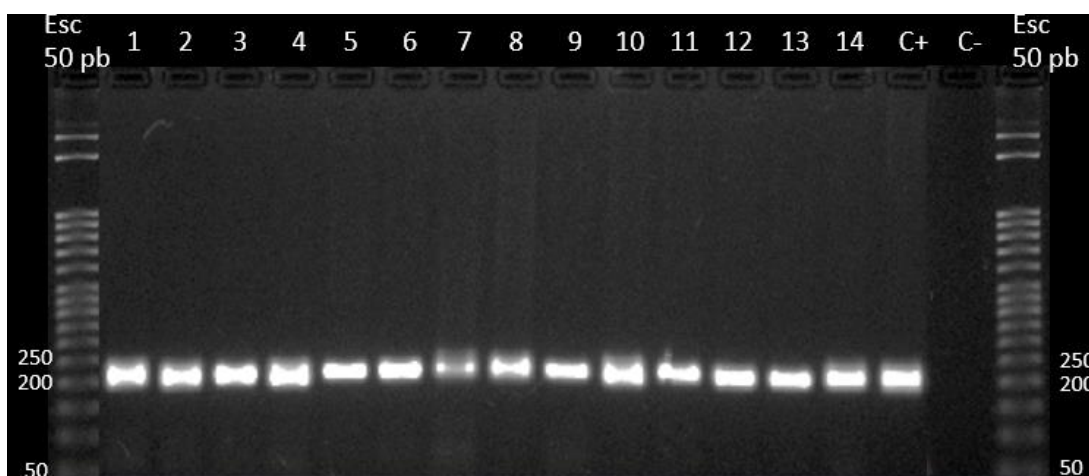
Origen	Número de microsatélites que amplificaron											n	n analizado
	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0		
BLA	16	0	1	0	0	1	0	3	2	4	3	30	<b>17</b>
ANI	10	2	0	2	0	1	0	3	4	7	8	37	<b>14</b>
F1-ANI	22	3	0	1	3	0	1	0	1	1	0	32	<b>27</b>
PSO	6	2	0	0	0	0	0	1	0	3	4	16	<b>8</b>
SFR	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	6	<b>5</b>
NAT	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	<b>5</b>
BLP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	30	<b>0</b>
<b>Total</b>	<b>62</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>7</b>	<b>7</b>	<b>15</b>	<b>46</b>	<b>156</b>	<b>76</b>

Tomando en cuenta las 156 muestras que se tenían, el locus del que se obtuvo un mayor número de amplificaciones fue el *NsubA004* (90 muestras), seguido de los loci *NsubA208*, *NsubC205* y *NsubA005* con 83 muestras que amplificaron para cada uno. Para el locus *NsubA235* amplificaron 81 muestras, para el *NsubA245* 80 muestras, 79 y 78 muestras para los loci *NsubC261* y *NsubA1G09* respectivamente. Con el locus *NsubA249* se obtuvo amplificación en 75 muestras y por último para el locus *NsubA1F03* se lograron amplificar 73 muestras (Tabla 5). En la figura 6 se puede observar cómo se visualizaba el gel de agarosa con amplificación exitosa.



**Tabla 5.** Porcentaje de éxito de amplificación para cada microsatélite.

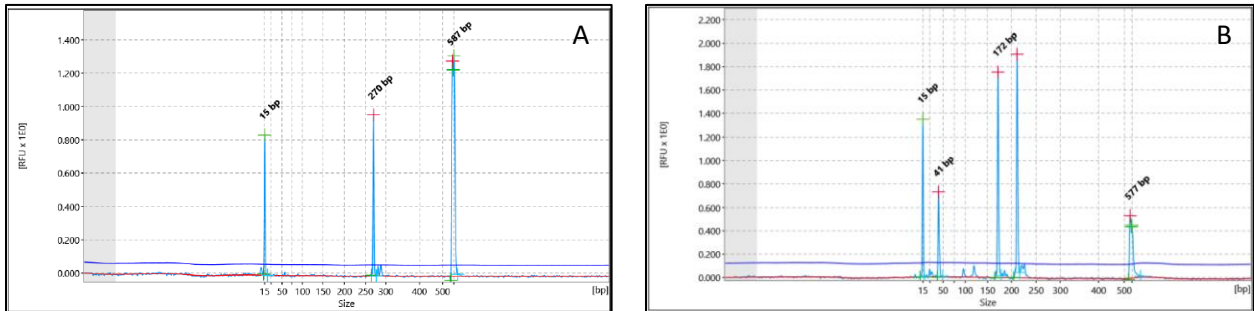
Locus	N	Muestras amplificadas	Muestras no amplificadas	% éxito amplificación	% éxito amplificación sin Bahía de La Paz
<i>NsubA004</i>	156	90	66	57.7	71.4
<i>NsubA208</i>	156	83	73	53.2	65.9
<i>NsubC205</i>	156	83	73	53.2	65.9
<i>NsubC261</i>	156	79	77	50.6	62.7
<i>NsubA249</i>	156	75	81	48.1	59.5
<i>NsubA245</i>	156	80	76	51.3	63.5
<i>NsubA235</i>	156	81	75	51.9	64.3
<i>NsubA005</i>	156	83	73	53.2	65.9
<i>NsubA1G09</i>	156	78	78	50.0	61.9
<i>NsubA1F03</i>	156	73	83	46.8	57.9
Promedio	156	81	76	51.6	63.9
DE	0.0	5	5	3.1	3.8



**Figura 6.** Visualización de productos de PCR en gel de agarosa al 1.2% durante 60 min a 80 volts en super buffer 1X. Microsatélite *NsubA235* del lote de juveniles en cultivo en Bahía de las Ánimas. Esc: marcador de referencia de 50 pb, C+ (control positivo: DNA de una almeja de la localidad de ANI), C- (control negativo: reacción de PCR sin DNA).

### 3.3 Genotipado

Con base en el tamaño de los fragmentos obtenidos fue posible diferenciar el genotipo homocigoto o heterocigoto de cada loci para cada individuo (Fig. 7). Con el análisis de los diez microsatélites, se identificaron un total de 268 genotipos.



**Figura 7.** Electroferogramas de un organismo homocigoto para el locus *NsubA249* (A) y un organismo heterocigoto para el locus *NsubC261* (B), obtenido mediante electroforesis capilar de alta resolución.

### 3.4 Análisis de diversidad genética por localidad

A continuación, se presentan los parámetros genéticos resultantes por localidad evaluada:

#### 3.4.1 Bahía de los Ángeles

La localidad de Bahía de los Ángeles quedó conformada por 17 organismos muestreados en el año 2015 (Tabla 1). El número de alelos varió de 5 a 12 (promedio 8.4 alelos por locus; DE = 2.7), siendo los loci *NsubA208*, *NsubC205* y *NsubA245* los que presentaron el menor número de alelos ( $N_a = 5$ ) y los loci *NsubC261* y *NsubA1G09* con el mayor número de alelos ( $N_a = 12$ ). Cuatro loci presentaron un total de 6 alelos privados (*NsubA004*, *NsubC261*, *NsubA249* y *NsubA1F03*). El promedio de la riqueza alélica fue de 4 (DE = 0.564). La heterocigosidad observada tuvo en promedio 0.637 (DE = 0.151) con un valor máximo de 0.824 (*NsubC261*) y un mínimo de 0.353 (*NsubC205*). La heterocigosidad esperada tuvo un promedio de 0.800 (DE = 0.064) con un valor máximo de 0.886 (*NsubA1G09*) y un mínimo de 0.680 (*NsubA208*). En cuanto al EHW, cuatro loci mostraron desviaciones significativas ( $p < 0.05$ ). El locus *NsubC205* mostró la mayor frecuencia de alelos nulos (0.222), mientras que en el locus *NsubA004* no se registró presencia de alelos nulos. El valor del coeficiente de endogamia osciló de 0.069 en los loci *NsubA004* y *NsubC261* a 0.545 en el locus *NsubC205*. Cinco de los diez loci mostraron valores de  $F_{IS}$  no significativos ( $p > 0.05$ ); sin

embargo, el valor global indicó diferencias altamente significativas ( $F_{IS} = 0.233$ ;  $DE = 0.154$ ;  $p < 0.001$ ), por lo cual esta población estuvo en endogamia (Anexo I, Tabla 10).

### 3.4.2 Punta El Soldado

El número de alelos por locus en la localidad de Punta El Soldado ( $n = 8$ ) varió de 3 (*NsubC205*) a 9 (*NsubA249*) teniendo en promedio 6 alelos por locus ( $DE = 1.7$ ). Tres loci presentaron un alelo privado (*NsubA004*, *NsubA249* y *NsubA005*). El promedio de la riqueza alélica fue de 3.884 ( $DE = 0.849$ ) con valores de 4.946 (*NsubA249*) a 2.0 (*NsubC205*). La heterocigosidad observada tuvo un valor promedio de 0.641 ( $DE = 0.219$ ), el locus *NsubC205* presentó el valor mínimo (0.250), mientras que el locus *NsubA235* tuvo el valor máximo (1). La heterocigosidad esperada fue mayor que la observada, con un valor promedio de 0.736 ( $DE = 0.157$ ), cuyo mínimo y máximo fueron 0.320 (*NsubC205*) y 0.867 (*NsubA249*) respectivamente. El valor del coeficiente de endogamia osciló de -0.143 a 0.434, con un valor promedio de 0.196 ( $DE = 0.200$ ), siete de los diez loci presentaron valores de  $F_{IS}$  no significativos ( $p > 0.05$ ); sin embargo, dos loci se desviaron del EHW y los valores globales indicaron que esta localidad se encuentra en endogamia ( $F_{IS} = 0.196$ ;  $DE = 0.200$ ;  $p < 0.001$ ). El locus *NsubC261* mostró la mayor frecuencia de alelos nulos (0.170), mientras que en los loci *NsubC205*, *NsubA245*, *NsubA235* y *NsubA005* no se registró la presencia de alelos nulos (Anexo I, Tabla 11).

### 3.4.3 Bahía de las Ánimas

La localidad de Bahía de las Ánimas estuvo integrada por 14 organismos. El número mínimo de alelos fue de 4 en el locus *NsubA208* mientras que el número máximo fue de 12 en el locus *NsubA1G09* (promedio 7.8 alelos por locus;  $DE = 2.25$ ). Cuatro de los diez loci presentaron alelos privados, los loci *NsubC261*, *NsubA249* y *NsubA1F03* presentaron un alelo privado, mientras que el locus *NsubA1G09* tuvo el valor máximo, que fueron cuatro alelos. El promedio de la riqueza alélica fue de 4.096 ( $DE = 0.647$ ) con un mínimo de 2.814 (*NsubA208*) y máximo de 4.814 (*NsubA1G09*). La heterocigosidad observada fue de 0.593 ( $DE = 0.217$ ) con un valor mínimo de 0.286 en los loci *NsubA208* y *NsubC205*, el valor máximo fue de 0.923 en el locus *NsubA004*. En cuanto a la heterocigosidad esperada se obtuvo un valor promedio de 0.798 ( $DE = 0.080$ ) con un valor mínimo de 0.620 en el locus *NsubA208* y un máximo de 0.873 en *NsubA1G09*. El

coeficiente de endogamia varió de -0.021 a 0.623 (promedio de 0.294; DE = 0.231;  $p < 0.001$ ). Se presentaron valores de  $F_{IS}$  significativos y desviaciones al EHW en los loci *NsubA208*, *NsubC205*, *NsubA235*, *NsubA1G09* y *NsubA1F03*. La frecuencia de alelos nulos fue de 0 (*NsubA004*) a 0.313 (*NsubA235*) (Anexo I, Tabla 12).

#### 3.4.4 San Francisquito

El número de alelos en la localidad de San Francisquito ( $n = 5$ ) varió de 2 alelos en el locus *NsubA208* a 6 en el locus *NsubA004* (promedio 4 alelos por locus; DE = 1.155). Únicamente el locus *NsubC261* presentó un alelo privado. El promedio de la riqueza alélica fue de 3.303 (DE = 0.685). La heterocigosidad observada fue de 0.512 (DE = 0.313) con un valor mínimo de 0 en el locus *NsubA208* y un máximo de 1 en el locus *NsubA245*, mientras que la heterocigosidad esperada fue de 0.650 (DE = 0.099) con un valor mínimo de 0.480 y un máximo de 0.800 en los loci *NsubA208* y *NsubA004* respectivamente. En cuanto al EHW, tres loci mostraron desviaciones significativas ( $p < 0.05$ ). La frecuencia de alelos nulos varió de 0 a 0.327, cinco de los diez loci no mostraron evidencia de alelos nulos. El coeficiente de endogamia osciló de -0.379 en el locus *NsubA245* a 1 en el locus *NsubA208*. Siete de los diez loci mostraron valores de  $F_{IS}$  no significativos ( $p > 0.05$ ), a pesar de esto el valor global indicó diferencias significativas ( $F_{IS} = 0.327$ ; DE = 0.447;  $p < 0.001$ ) (Anexo I, Tabla 13).

#### 3.4.5 Isla Natividad

Para estimar la diversidad genética de la localidad de Isla Natividad (Pacífico mexicano) se contó con 5 organismos silvestres. El número de alelos varió de 3 (*NsubA208* y *NsubA005*) a 6 (*NsubA004*, *NsubC205* y *NsubC261*) con un promedio de 4.7 alelos por locus (DE = 1.16). Ningún loci presentó alelos privados. El promedio de la riqueza alélica fue de 3.692 (DE = 0.686), con un rango de 2.73 (*NsubA005*) a 4.5 (*NsubA004* y *NsubC261*). La heterocigosidad observada promedio fue de 0.420 (DE = 0.257) variando de 0 (*NsubA208* y *NsubA005*) a 0.8 (*NsubC261*). La heterocigosidad esperada varió de 0.56 (*NsubA005*) a 0.8 (*NsubA004* y *NsubA261*), el promedio fue de 0.700 (DE = 0.091). En cuanto al EHW, cuatro loci presentaron desviaciones significativas ( $p < 0.05$ ). Siete de los diez loci tuvieron presencia de alelos nulos, variando de 0.105 (*NsubA004*) a 0.391 (*NsubA208*). Cuatro loci mostraron valores de  $F_{IS}$  significativos ( $p < 0.05$ ), los loci

*NsubA208* y *NsubA005* mostraron el máximo valor de endogamia (1). Asimismo, el valor global mostró diferencias significativas ( $F_{IS} = 500$ ;  $DE = 0.298$ ;  $p < 0.001$ ), indicando que esta localidad se encuentra en endogamia (Anexo I, Tabla 14).

### 3.4.6 F1 de Bahía de las Ánimas

La F1 proveniente de Bahía de las Ánimas ( $n = 27$ ) mostró un valor mínimo de 6 alelos en el locus *NsubC205* y un máximo de 11 alelos en el locus *NsubA005* (promedio 8.5 alelos por locus;  $DE = 1.434$ ). En este lote se observó el mayor número de alelos privados, 15 en total, el locus que presentó el mayor número fue el *NsubA208* con 5 alelos privados, mientras que los loci *NsubA004*, *NsubC205* y *NsubA1G09* no presentaron ningún alelo privado. La riqueza alélica tuvo un promedio de 3.88 ( $DE = 0.517$ ), variando de 2.66 (*NsubC205*) a 4.48 (*NsubA1F03*). La heterocigosidad observada registró un promedio de 0.572 ( $DE = 0.229$ ) con un mínimo de 0.240 y un máximo de 0.846 en los locus *NsubC205* y *NsubA1G09* respectivamente. Por otra parte, la heterocigosidad esperada fue de 0.784 ( $DE = 0.080$ ), presentando un rango de 0.579 (*NsubC205*) a 0.864 (*NsubA1F03*). Relativo al EHW siete loci (*NsubA004*, *NsubA208*, *NsubC205*, *NsubA249*, *NsubA245*, *NsubA005* y *NsubA1F03*) estuvieron en desequilibrio ( $p < 0.05$ ). La frecuencia de alelos nulos varió de 0 a 0.359, tres de los diez loci no mostraron evidencia de alelos nulos (*NsubC261*, *NsubA235*, *NsubA1G09*). En cuanto al coeficiente de endogamia, este osciló de -0.033 (*NsubC261*) a 0.599 (*NsubC205*). Cuatro de los diez loci (*NsubC261*, *NsubA235*, *NsubA005* y *NsubA1G09*) mostraron valores de  $F_{IS}$  no significativos ( $p > 0.05$ ). El resto de los loci presentaron valores de  $F_{IS}$  significativos, de igual forma el valor global indicó diferencias significativas ( $F_{IS} = 0.296$ ;  $DE = 0.259$ ;  $p < 0.001$ ) por lo cual se considera que este lote de juveniles está en endogamia (Anexo I, Tabla 15).

## 3.5 Diversidad genética promedio por localidad y por marcador

El análisis de diez microsatélites registró 120 alelos diferentes en los 76 individuos de *N. subnodosus*, de los cuales 47 fueron compartidos entre la muestra de la costa Pacífico y las del Golfo de California (Tabla 6, Fig. 8). En las muestras silvestres y de cultivo del GC se observaron 16 y 15 alelos privados, respectivamente; mientras que en las del Pacífico no se observaron alelos privados. El número total de alelos en las poblaciones silvestres varió de 40 (SFR) a 84 (BLA) y 85 en el lote de cultivo (F1ANI) (Tabla 7).

La mayor diversidad genética se observó en BLA y ANI ( $R_a = 4.04$  y  $4.10$ , respectivamente). Los valores de  $H_o$  promedio por localidad fueron menores que los  $H_e$ ; por lo que ninguna de las localidades analizadas se encontró en EHW ( $p < 0.05$ ). La presencia de alelos nulos se encontró en todos los loci (rango 0.065-0.228; Tabla 6) y con mayor frecuencia en la población de NAT (0.154) y la F1ANI (0.147). Los mayores valores del coeficiente de endogamia  $F_{IS}$  se presentaron en las poblaciones de NAT (0.500) y SFR (0.327) en las cuales el número de muestras fue de 5 (Tabla 7). Los loci más polimórficos fueron el *NsubC261* y *NsubA1G09* con 16 y 15 alelos, por el contrario, el locus menos polimórfico fue el *NsubC205* con sólo 8 alelos (Tabla 6, Fig. 8).

**Tabla 6.** Resumen de parámetros genéticos por marcador.

Locus	n	Na	Tamaño del alelo más frecuente (pb)	AP	Ra	Ho	He	F (n)	F <sub>IS</sub>
<i>NsubA004</i>	75	13	242	2	4.22	0.685	0.796	0.065	0.206
<i>NsubA208</i>	76	11	291	5	2.94	0.275	0.645	0.228	0.619
<i>NsubC205</i>	74	8	198	0	3.15	0.322	0.629	0.175	0.519
<i>NsubC261</i>	71	16	171	7	4.20	0.687	0.800	0.081	0.205
<i>NsubA249</i>	74	13	269	5	4.21	0.570	0.802	0.151	0.355
<i>NsubA245</i>	76	9	293	1	3.55	0.618	0.714	0.091	0.182
<i>NsubA235</i>	73	10	200	1	3.91	0.615	0.749	0.097	0.243
<i>NsubA005</i>	76	12	203	4	3.82	0.640	0.754	0.085	0.237
<i>NsubA1G09</i>	72	15	353	3	4.22	0.613	0.808	0.109	0.309
<i>NsubA1F03</i>	67	13	161	3	3.93	0.602	0.752	0.123	0.223
Sumatoria		120		31					
Promedio	73.4	12	238.1	3.1	3.8	0.562	0.745	0.120	0.310
DE	2.8	3	62.1	2.2	0.5	0.144	0.065	0.050	0.148
Mediana	74	13	222.5	3.0	3.9	0.614	0.753	0.103	0.240
Mínimo	67	8	161.0	0.0	2.9	0.275	0.629	0.065	0.182
Máximo	76	16	353.0	7.0	4.2	0.687	0.808	0.228	0.619

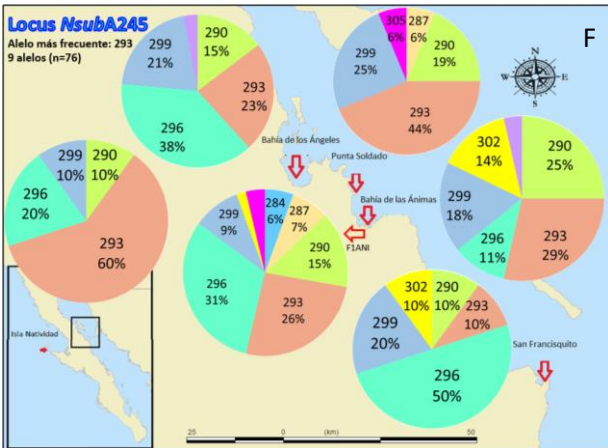
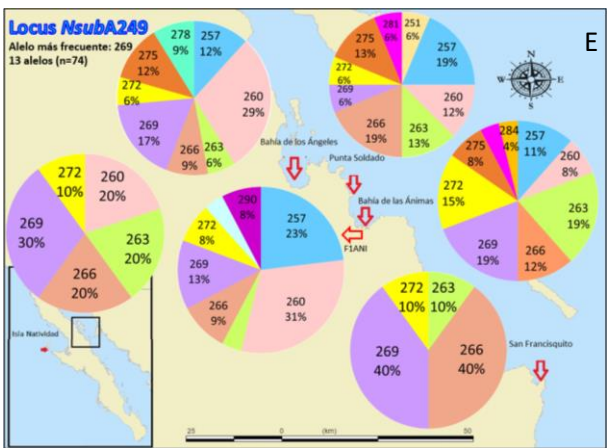
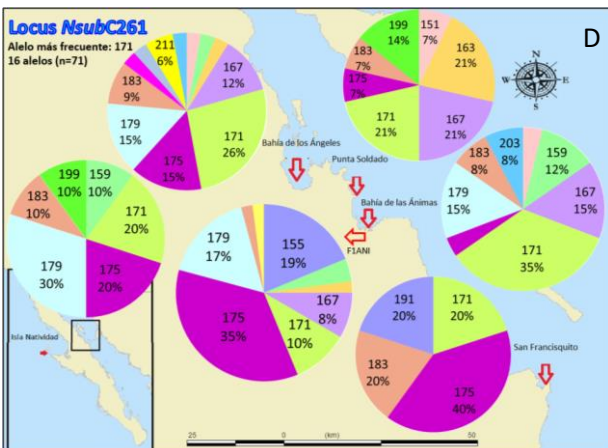
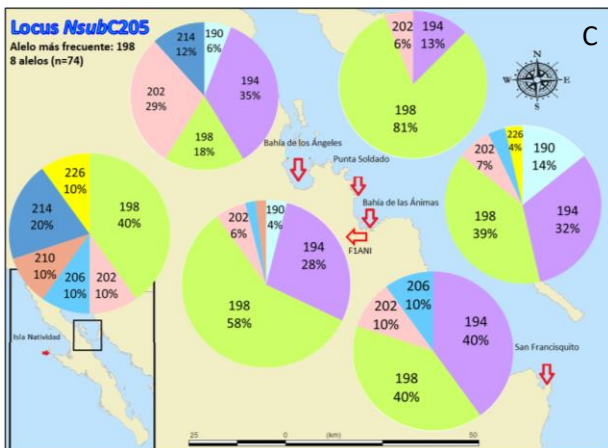
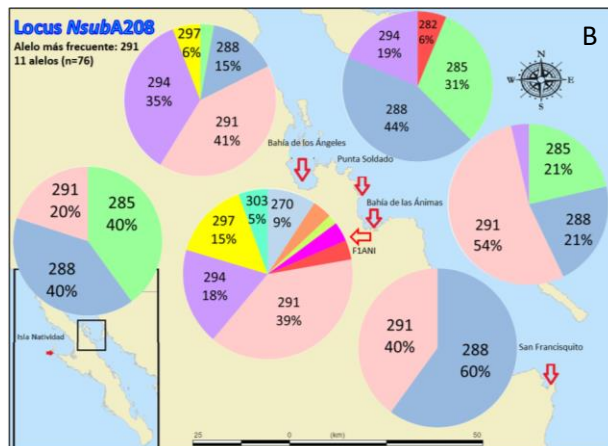
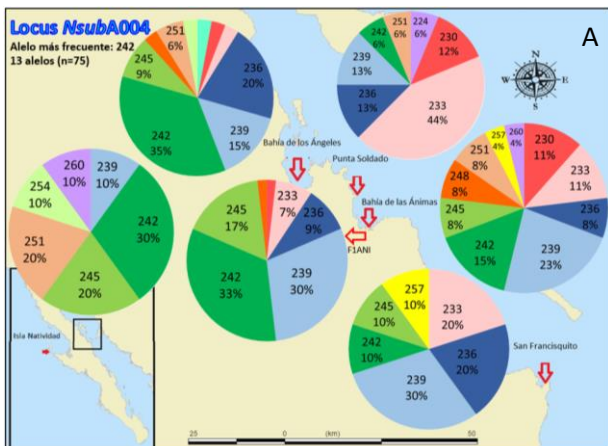
n = número de muestras, Na = número de alelos, pb = pares de bases, AP = alelos privados, Ra = riqueza alélica, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada, F(n) = frecuencia de alelos nulos, F<sub>IS</sub> = Coeficiente de endogamia.

**Tabla 7.** Diversidad genética de *N. subnodosus* en las localidades silvestres y el lote de cultivo con base en diez loci microsatélite.

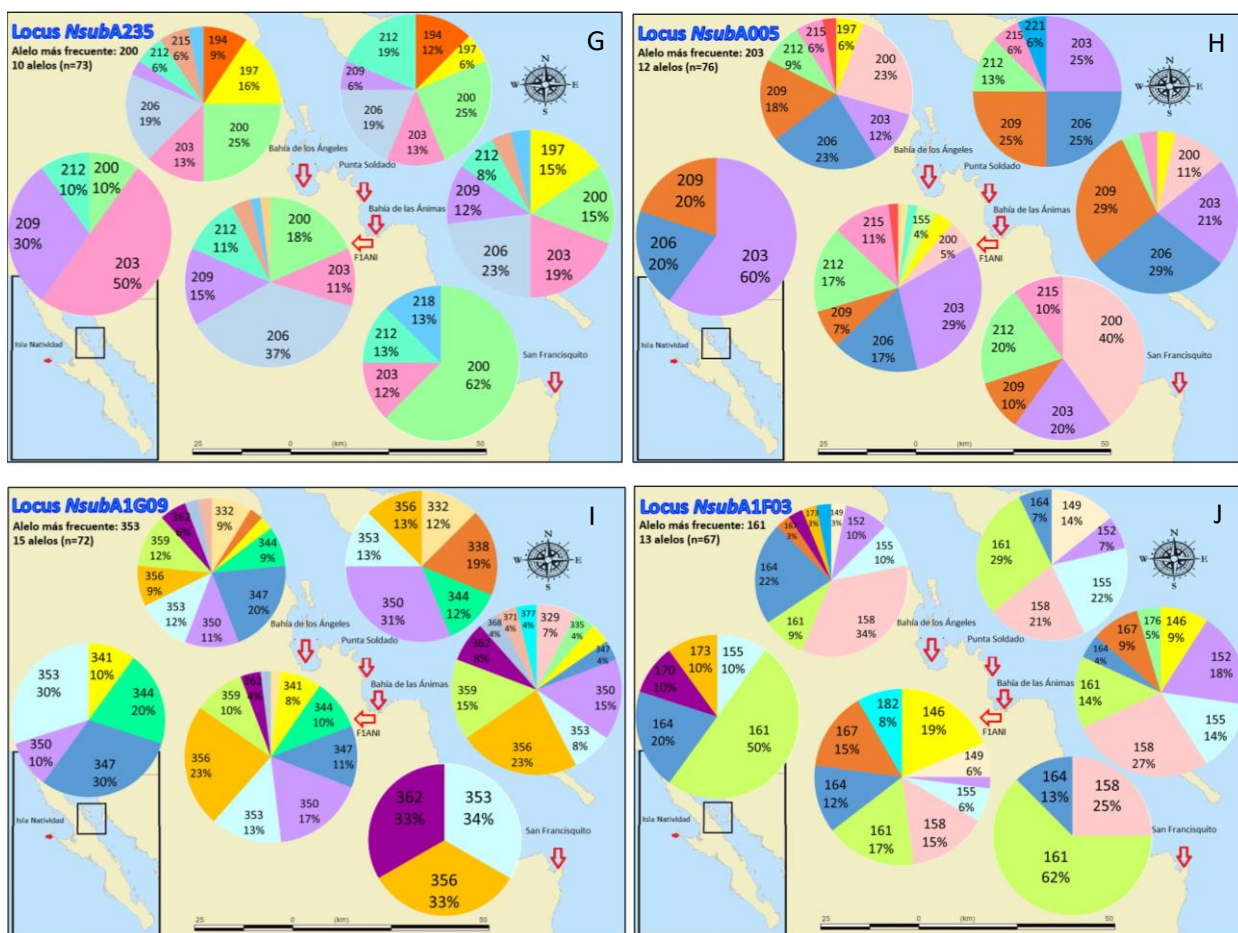
Localidad	n	Na (máx. – mín.)	Alelos totales	AP	Ra	Ho	He	EHW	F (n)	F <sub>IS</sub>
<b>BLA</b>	17	5 - 12	84	6	4.04	0.637	0.800	***	0.095	0.233***
<b>PSO</b>	8	3 - 9	60	3	3.88	0.641	0.736	*	0.072	0.196**
<b>ANI</b>	14	4 - 12	78	6	4.10	0.593	0.798	***	0.138	0.294***
<b>SFR</b>	5	2 - 6	40	1	3.30	0.512	0.650	**	0.116	0.327***
<b>NAT</b>	5	3 - 6	47	0	3.69	0.420	0.700	***	0.154	0.500***
<b>F1ANI</b>	27	6 - 11	85	15	3.88	0.572	0.784	***	0.147	0.296***

n = número de muestras, Na = número de alelos (rango), AP = alelos privados, Ra = riqueza alélica, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada, EHW = Equilibrio de Hardy-Weinberg, F(n) = frecuencia de alelos nulos, F<sub>IS</sub> = Coeficiente de endogamia, Valor de significancia: \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ).

En la figura 8 se presentan las frecuencias alélicas para los diez loci para cada localidad silvestre y el lote de juveniles producido en laboratorio a partir de reproductores silvestres de Bahía de Las Animas. Se puede observar los alelos de mayor frecuencia y los alelos compartidos y privados por localidad por marcador. Las localidades silvestres con mayor diversidad de alelos fueron BLA (84 alelos totales; n = 17) y ANI (78 alelos totales; n = 14), seguidas de PSO (60 alelos, n = 8), NAT (47 alelos, n = 5) y SFR (40 alelos, n = 5); sin embargo, estos resultados están estrechamente relacionados con el tamaño de la muestra, entre más reducido sea éste, la posibilidad de encontrar alelos diferentes también será menor. Los 47 alelos presentes en la costa Pacífico en la localidad de Isla Natividad (NAT) estuvieron presentes en las cuatro localidades silvestres del GC. Dentro del GC, se presentaron 16 alelos privados en las poblaciones silvestres y 15 en la progenie F1ANI; el resto de los alelos (42) presentes estuvieron compartidos entre las localidades del GC.



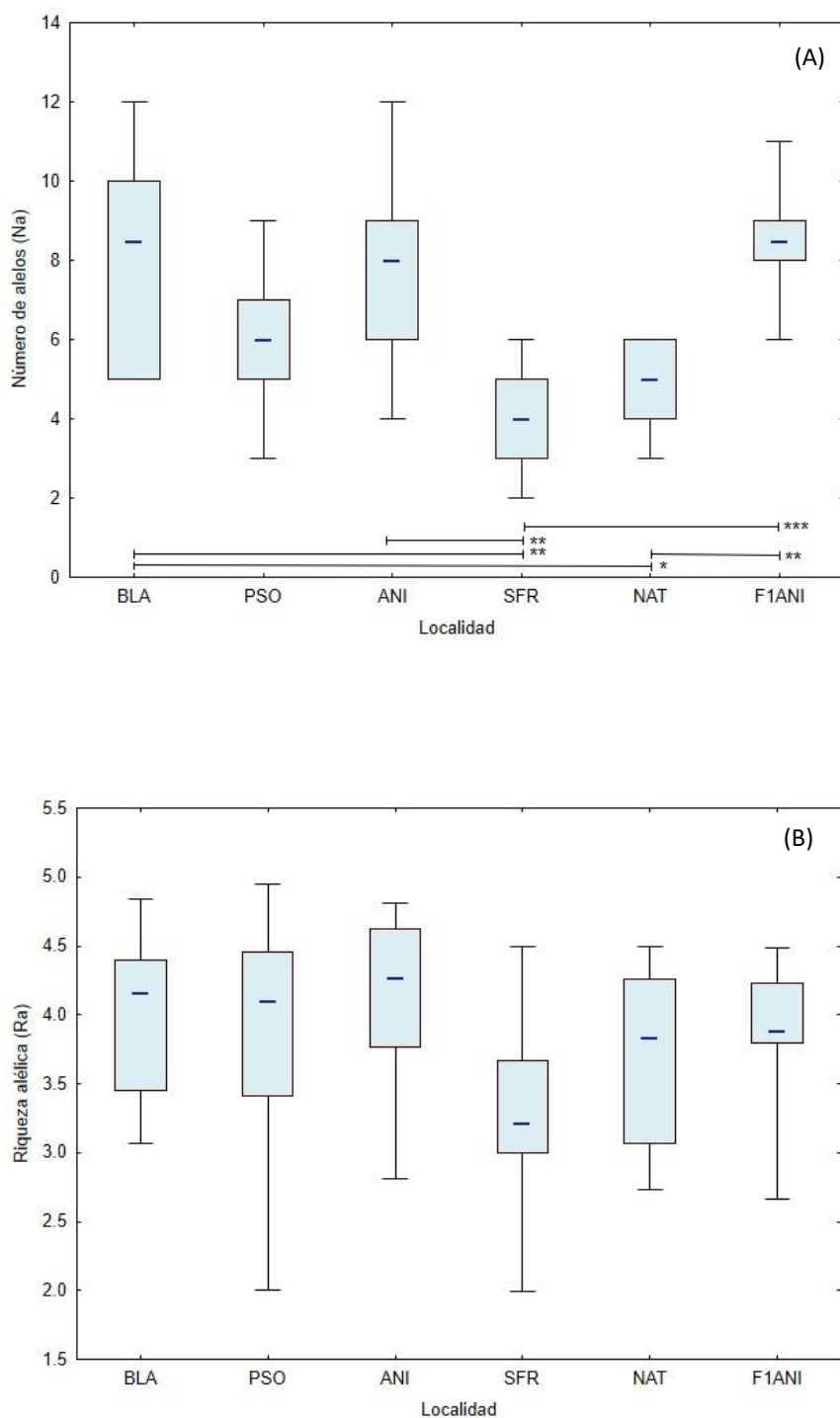




**Figura 8.** Frecuencias alélicas de los alelos detectados mediante los loci A) *NsubA004*, B) *NsubA208* C) *NsubC205*, D) *NsubC261*, E) *NsubA249*, F) *NsubA245*, G) *NsubA235*, H) *NsubA005*, I) *NsubA1G09* y J) *NsubA1F03*. En cada gráfico de pastel, los colores son el mismo para alelo en cada locus y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

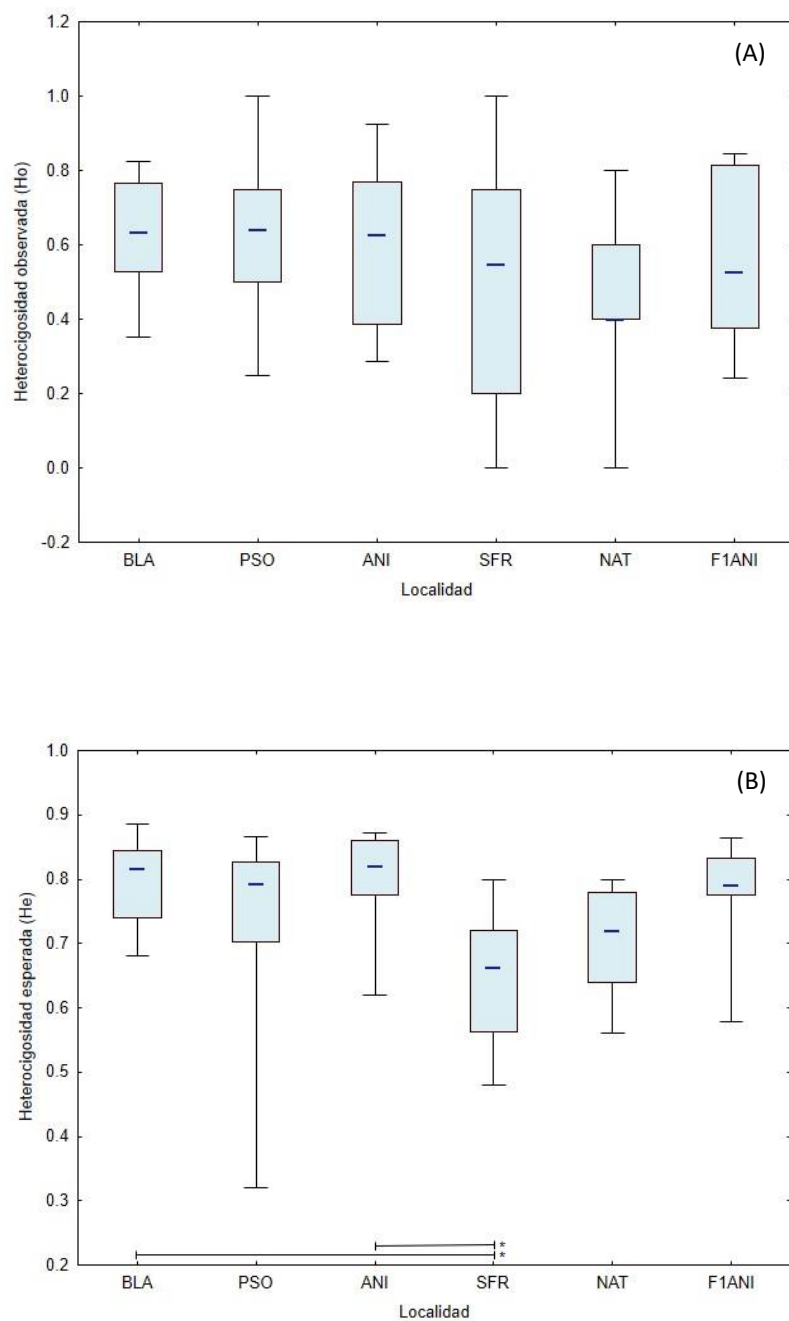
### 3.6 Análisis estadístico de parámetros genéticos entre localidades

Para las comparaciones entre parámetros genéticos entre localidades, con 10 loci microsatélites, se realizaron análisis de varianzas paramétricos (ANOVA) en las pruebas que cumplieron con los supuestos de normalidad y homocedasticidad; y análisis no paramétricos (Prueba de Kruskal-Wallis) en las que no cumplieron. Para el número de alelos ( $N_a$ ) se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre localidades; y mediante el análisis de comparaciones múltiples se identificaron diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ ) entre SFR y ANI, BLA y diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) con el F1ANI; asimismo NAT fue significativamente diferente de BLA (y del F1ANI ( $p < 0.05$ ; Fig. 9A). En la riqueza alélica (Fig. 9B) no se encontraron diferencias significativas entre ninguna de las localidades



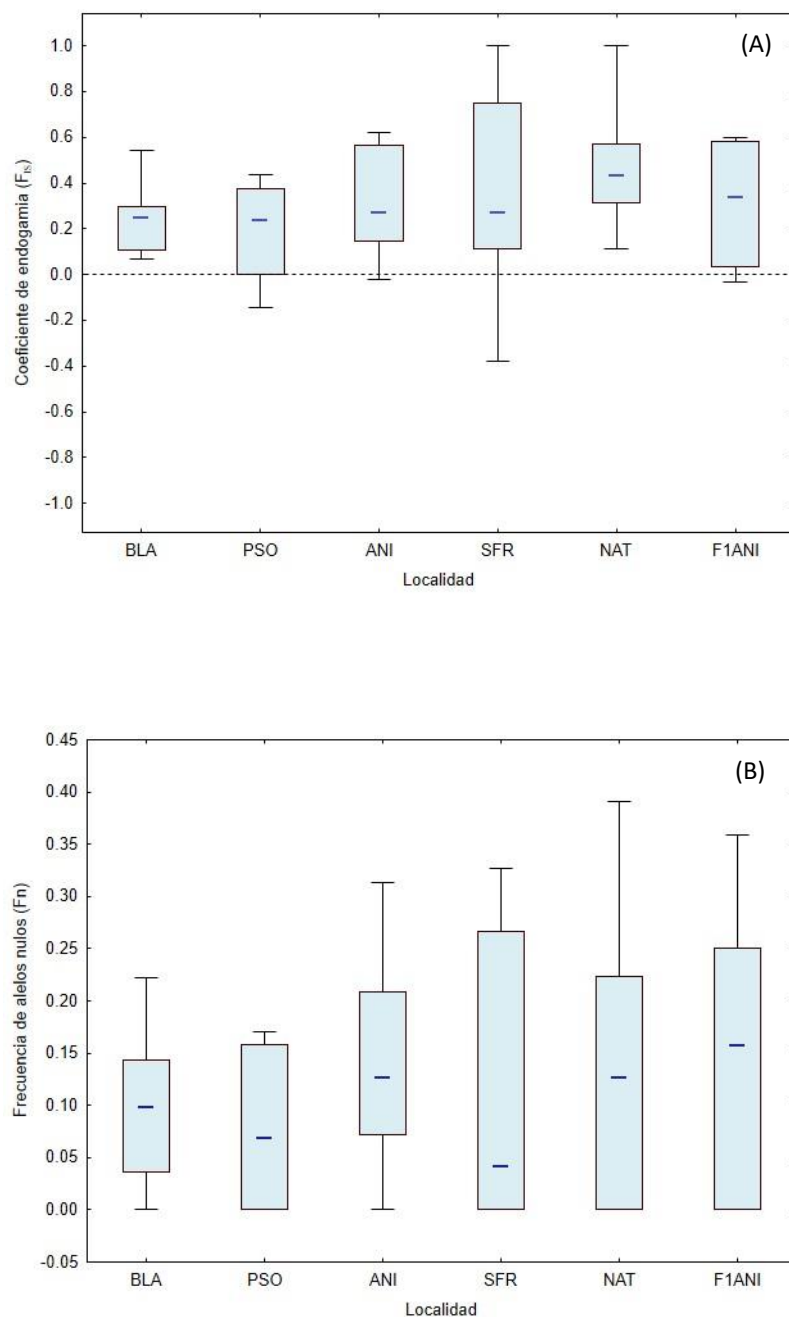
**Figura 9.** Número de alelos por localidad (A) y riqueza alélica (B) en los diez loci microsatélite. Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana. Con las barras horizontales inferiores se representa el valor de significancia [ $*(p < 0.05)$ ,  $** (p < 0.01)$ ,  $*** (p < 0.001)$ ].

Los resultados de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) no mostraron diferencias significativas entre las localidades (Fig. 10A). Sin embargo, en los valores de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre SFR con ANI y BLA (Fig. 10B).



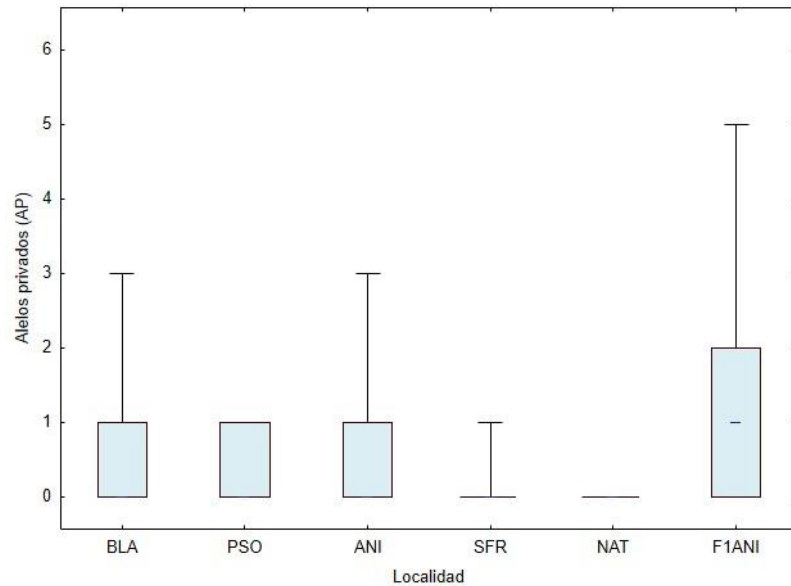
**Figura 10.** Heterocigosidad observada (A) y esperada (B) por localidad en los diez loci microsatélite. Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana. Con las barras horizontales inferiores se representa el valor de significancia [ $^*(p < 0.05)$ ,  $^{**}(p < 0.01)$ ,  $^{***}(p < 0.001)$ ].

El coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) no mostró diferencias significativas entre las localidades sin embargo, todos los valores fueron estadísticamente diferentes y superiores a cero, con tendencia a la endogamia (Fig. 11A). En cuanto a la frecuencia de alelos nulos (Fig. 11B) no se observaron diferencias significativas entre las localidades.



**Figura 11.** Coeficiente de endogamia (A) y frecuencia de alelos nulos (B) por localidad en los diez loci microsatélite. Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana.

En el número de alelos privados (Fig. 12) no se encontraron diferencias significativas entre ninguna de las localidades



**Figura 12.** Número de alelos privados por localidad en los diez loci microsatélite. Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana.

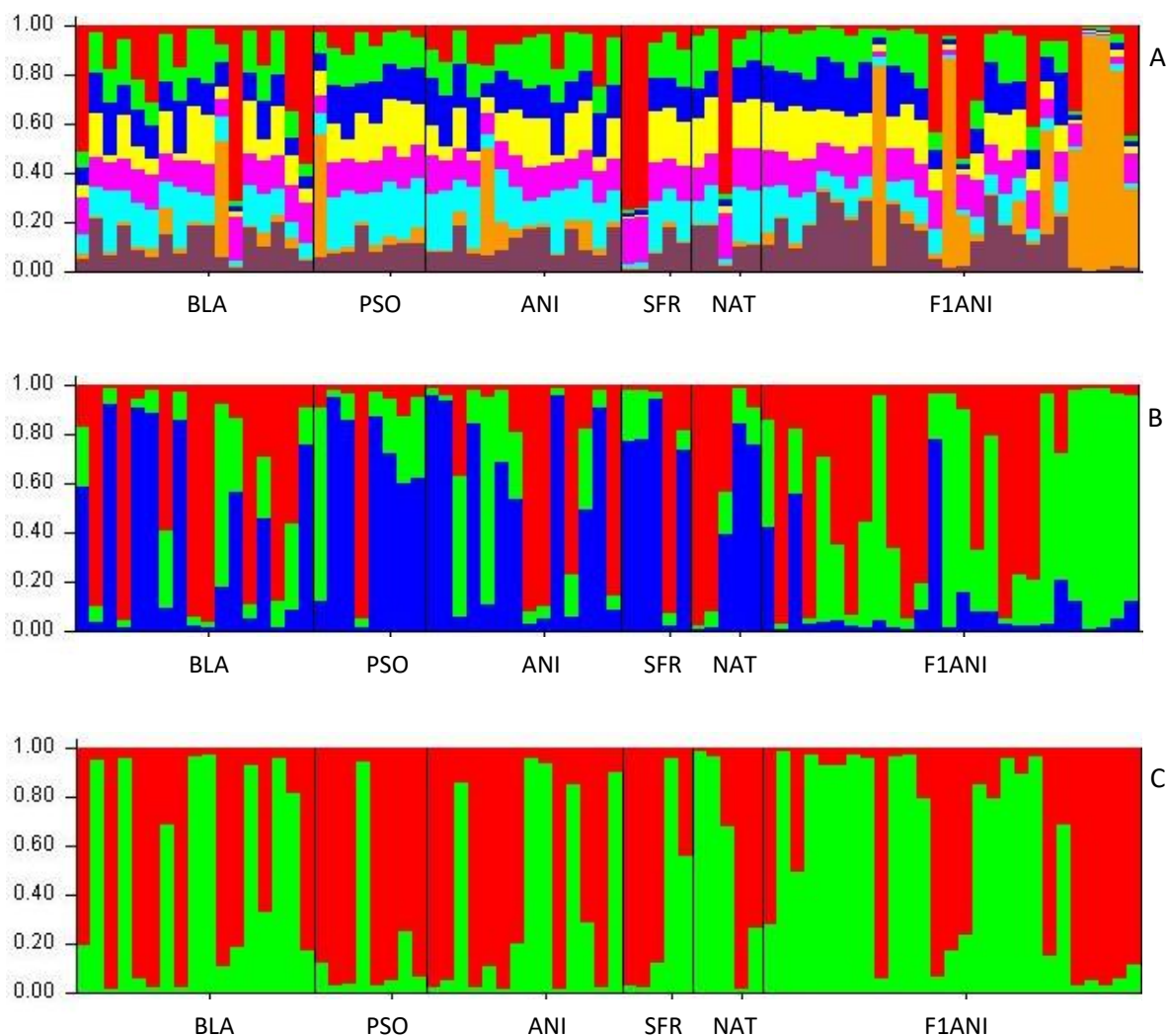
Para las comparaciones entre parámetros genéticos entre microsatélites, se realizó un análisis no paramétrico (Prueba de Kruskal-Wallis). Para el número de alelos ( $N_a$ ) no se observaron diferencias significativas entre microsatélites; pero si se encontraron diferencias en la riqueza alélica ( $R_a$ ) y mediante el análisis de comparaciones múltiples se identificaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre *NsubA208* con: *NsubA004*, *NsubC261*, *NsubA249* y *NsubA1G09* (Anexo III, Fig. 18). Los resultados de heterocigosidad observada ( $H_o$ ) mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre *NsubA208* con *NsubA004* y *NsubC261* (Anexo III, Fig. 19A). En los valores de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre *NsubA004* y *NsubA208*; además de diferencias muy significativas ( $p < 0.01$ ) entre *NsubA004* y *NsubC205*; *NsubC261* y *NsubC205*; *NsubA208* con *NsubC261*, *NsubA249* y *NsubA1G09*; también entre *NsubC205* y *NsubA1G09* (Anexo III, Fig. 19B). El coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) no mostró diferencias significativas entre los microsatélites, sin embargo todos los valores mostraron tendencia a la endogamia (Anexo III, Fig. 20A). En cuanto a la frecuencia de alelos nulos (Anexo III, Fig. 20B) y el número de alelos privados (Anexo III, Fig. 21) tampoco se observaron diferencias significativas entre los microsatélites analizados.

## 3.7 Análisis de estructura genética en la región central del GC

### 3.7.1 Asignación Poblacional

El primer análisis exploratorio de grupos y asignación de individuos a “n” componentes genéticos o poblaciones (K), así como el cálculo del número probable de componentes genéticos ( $\Delta K$ ) consideró todas las muestras de origen silvestre y de cultivo con los diez loci microsatélite (Fig. 13). Las gráficas representan a cada individuo y el porcentaje de asignación de sus genotipos y frecuencias alélicas para cada componente genético inferido. En la figura 13 se resumen los resultados obtenidos considerando la presencia de ocho a dos componentes genéticos. Por ejemplo, en el análisis de  $K = 8$  (Fig. 13A) se observa que todos los individuos presentan un porcentaje similar de cada componente genético, a excepción de cinco individuos del F1ANI que presentan más del 75% de un componente genético (naranja).

En el análisis de  $K = 3$  (Fig. 13B) el primer individuo de la localidad de BLA muestra que el 16% de su genoma corresponde a un componente genético (color rojo), mientras que el 25% corresponde a otro componente genético (color verde) y por último el 59% restante corresponde a un componente genético distinto a los anteriores (color azul). De forma similar al análisis anterior, se aprecia que en los últimos cinco individuos del F1ANI predomina un componente genético (verde). En el caso de  $K = 2$  las localidades continuaron siendo muy parecidas, sin observarse una diferenciación o estructura (Fig. 13C), ambos componentes estuvieron presentes en todos los individuos. En BLA ambos componentes (rojo y verde) estuvieron presentes en un 50%, en PSO predominó el componente rojo (80%), al igual que en ANI (62%) y SFR (65%), mientras que en NAT y el F1ANI predominó el otro componente (verde) en un 58 y 57% respectivamente. La prueba de Evanno mostró que el número más probable de componentes en las muestras silvestres y de cultivo es igual a dos (Anexo II, Fig. 16).



**Figura 13.** Estructura genética de *Nodipecten subnodosus* de bancos naturales y un lote de cultivo con diez loci microsatélite para A ( $K = 8$ ), B ( $K = 3$ ) y C ( $K = 2$ ) componentes genéticos (valor de  $K$  asignado). BLA = Bahía de los Ángeles, PSO = Punta El Soldado, ANI = Bahía de las Ánimas, SFR = San Francisquito, NAT = Isla Natividad (Pacífico), F1ANI = F1 de Bahía de las Ánimas.

Para el segundo análisis de estructura genética se incluyó únicamente a las muestras de origen silvestre dentro del GC (4 poblaciones; Fig. 14) además de que se eliminó del análisis a los loci *NsubA208* y *NsubC205* ya que tenían una frecuencia de alelos nulos de 22.8 y 17.5 % respectivamente. En la figura 14 se resumen los resultados obtenidos considerando la presencia de seis (A), cuatro (B) y dos (C) componentes genéticos ( $K$ ). Para la simulación de  $K = 6$ , los seis componentes estuvieron presentes en todos los organismos de cada localidad (Figura 14A). En el análisis de  $K = 4$  (Fig. 14B) el último individuo de la localidad de SFR presenta 27% del componente rojo, 17.3% del componente verde, mientras que el 37.8% corresponde al componente azul y por último el 17.9% restante pertenece al componente amarillo. Visto de otra forma,

en la simulación de  $K = 4$  el componente rojo estuvo presente en las cuatro localidades en un 25.9%, el componente verde 22.9%, el componente azul 28.4% y el componente amarillo 22.8%, los cuatro en proporciones similares sin observarse estructura genética en las localidades.

En el caso de  $K = 2$  en BLA, PSO y ANI predominó ligeramente el componente rojo con un 52, 56 y 53% respectivamente, mientras que en SFR el componente verde estuvo más presente con un 54% (Fig. 14C). Con base en lo anterior, es posible visualizar que la estructura genética de *N. subnodosus* en las localidades silvestres del GC se encuentra heterogéneamente distribuida. La prueba de Evanno mostró que el número más probable de componentes genéticos en las muestras silvestres del GC es igual a cuatro (Anexo II, Fig. 17).



**Figura 14.** Estructura genética de *Nodipecten subnodosus* en cuatro localidades de la región central del GC con ocho loci microsatélite para A ( $K = 4$ ), B ( $K = 3$ ) y C ( $K = 2$ ) componentes genéticos (valor de  $K$  asignado). BLA = Bahía de los Ángeles, PSO = Punta El Soldado, ANI = Bahía de las Ánimas, SFR = San Francisquito.



### 3.7.2 Diferenciación genética poblacional

El valor de  $F_{ST}$  pareado entre las cinco localidades de origen silvestre varió de -0.007 a 0.056 (promedio = 0.028; DE = 0.020). Conceptualmente un valor negativo de  $F_{ST}$  no es posible, dado que los valores oscilan de 0 a 1. Sin embargo, la definición original de  $F_{ST}$  permite valores negativos, lo cual se puede interpretar como un valor igual a cero. El valor de  $F_{ST} = 0.023$  observado entre BLA y NAT y el observado entre ANI y NAT ( $F_{ST} = 0.038$ ), resultaron significativos ( $p < 0.05$ ) mostrando escasas diferencias entre estas localidades. Mientras que, al comparar el lote de juveniles producido en cautiverio y engordado en campo, se observó una variación de 0.023 a 0.094 (promedio = 0.052; DE = 0.026); y no se encontraron diferencias con ninguna de las demás localidades. En general, se encontró que hay una distribución heterogénea de la variabilidad genética de la especie dentro del GC (Tabla 8); lo que coincide con el análisis de estructura genética anteriormente presentado.

**Tabla 8.** Valores de  $F_{ST}$  (debajo de la diagonal) y p-valores (arriba de la diagonal). Los valores en negritas son significativos ( $p < 0.05$ ).

	BLA	PSO	ANI	SFR	NAT	F1-ANI
BLA	-	0.302	0.822	0.085	<b>0.048</b>	0.373
PSO	0.010	-	0.050	0.311	0.182	0.063
ANI	-0.007	0.034	-	0.054	<b>0.028</b>	0.215
SFR	0.043	0.021	0.056	-	0.055	0.178
NAT	<b>0.023</b>	0.012	<b>0.038</b>	0.051	-	0.090
F1ANI	0.023	0.054	0.044	0.094	0.047	-

**BLA** = Bahía de los Ángeles, **PSO** = Punta El Soldado, **ANI** = Bahía de las Ánimas, **SFR** = San Francisquito, **NAT** = Isla Natividad, **F1ANI** = Cultivo de Bahía de las Ánimas.

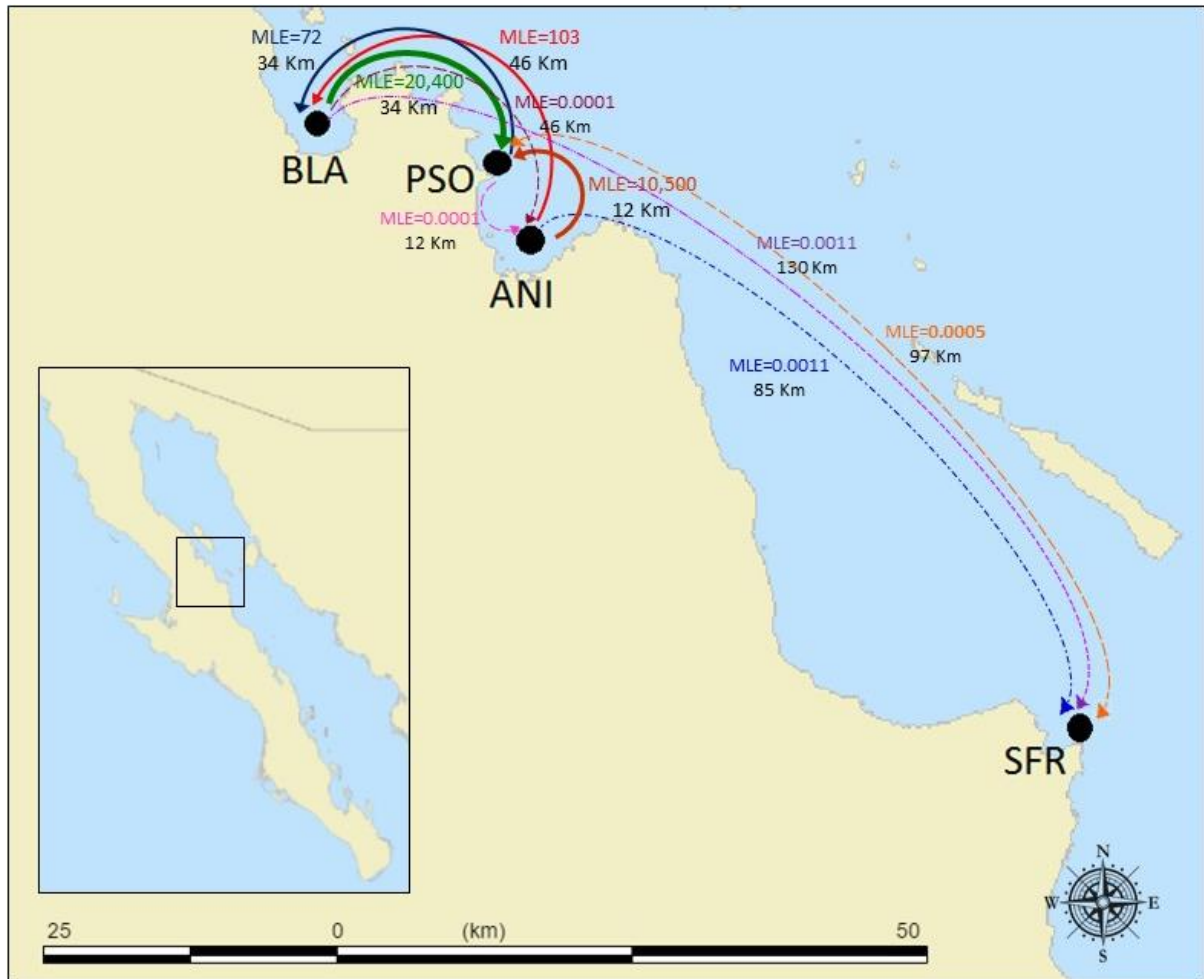
### 3.7.3 Flujo genético

Las hipótesis que se plantearon para este análisis fueron:  $H_0$  = el flujo es igual en ambos sentidos entre dos localidades (bidireccional);  $H_a$  = el flujo no es igual entre dos localidades (unidireccional). Dicho esto, las estimaciones de máxima verosimilitud mediante simulaciones Monte Carlo de Cadenas de Markov (MCMC, por sus siglas en inglés) realizadas utilizando el programa MIGRATE; sugieren que el flujo de genes es predominantemente hacia el sur a lo largo de la costa oeste del GC, principalmente desde BLA hacia

PSO (MLE = 20,400). Por otro lado, la migración fue bidireccional entre SFR↔PSO pero con un número de migrantes muy bajo (MLE = 0.0005). Los valores de flujo genético más grandes se encontraron de ANI hacia PSO (MLE = 10,500) y de BLA hacia PSO (MLE = 20,400) (Tabla 9, Fig. 15).

**Tabla 9.** Número de migrantes entre las localidades del GC. Las poblaciones en filas están dando migrantes a poblaciones en columnas. Los números en negrita indican flujo genético unidireccional entre las localidades (valores significativos).

	BLA	PSO	ANI	SFR
BLA	-	<b>20,400</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0011</b>
PSO	<b>72</b>	-	<b>0.0001</b>	0.0005
ANI	<b>103</b>	<b>10,500</b>	-	<b>0.0011</b>
SFR	<b>0.0001</b>	0.0005	<b>0.0002</b>	-



**Figura 15.** Dirección y magnitud del flujo genético de *N. subnodosus* a lo largo del Golfo de California. Los vectores representan la dirección del flujo y el grosor del vector la magnitud (las flechas sólidas indican la mayor cantidad de flujo genético y las punteadas la menor cantidad). Los colores de las flechas sólo son para poder identificar a cada una. También se indica el número de migrantes y la distancia en kilómetros entre las localidades.

## Capítulo 4. Discusión

---

### 4.1 Obtención de muestras y amplificación de microsatélites

La zona de prospección inicio en San Luis Gonzaga, ya que se tenía ubicado con anterioridad un lote de almeja mano de león (Comm. Pers. Dahren Gómez); sin embargo, cuando se realizó el muestreo en ese sitio ya no se encontraron a los ejemplares. De igual forma la búsqueda de individuos concluyó en la localidad de El Barril. En este lugar también se tenía ubicado un lote, que al momento del muestreo tampoco se encontró (Comm. Pers. Manuel Maldonado). Esto podría estar relacionado con la capacidad natatoria que tienen los pectínidos, que les permite desplazarse y migrar, con fines de reproducción, alimentación o para huir de un predador (Himmelman *et al.*, 2009; Tremblay *et al.*, 2012). Aunque el comportamiento natatorio no está documentado específicamente para *N. subnodosus*, esta especie presenta un hábito de vida libre, sobre sedimentos blandos o duros (Alejandrino *et al.*, 2011), y que al igual que otras especies de pectínidos de vida libre como *Aequipecten opercularis* pueden presentar una actividad natatoria que se ve limitada en almejas de mayor tamaño (Jenkins *et al.*, 2003). Por otra parte, no se puede descartar que estos bancos no se volvieron a encontrar en estas localidades debido a pesca ilegal (BCS Noticias, 2016) dado que se sabe que es extraída para “consumo personal” pero no existen datos documentados al respecto.

No obstante, que para este estudio el muestreo abarcó un poco más de 100 kilómetros a lo largo de las costas del GC, y se incluyeron varios puntos de muestreo, en las localidades de San Francisquito e Isla Natividad sólo se encontraron 6 almejas por localidad. Contrario a esto en el 2006, Petersen *et al.* (2010), recolectaron muestras de *N. subnodosus* en cuatro localidades del golfo, con un tamaño de muestra de 27 a 61 individuos por localidad. Recientemente, la baja abundancia de este pectínido también fue registrada por Castañeda-Rivero (2017) quién estimó la abundancia de macro-invertebrados epibentónicos en el norte del GC, explorando 62 sitios, encontrando solamente dos individuos de la especie *N. subnodosus* por el contrario, observó 63 individuos de *Spondylus limbatus* otra especie de molusco conocida como almeja burra u ostra espinosa. A pesar de que no existen estudios de ecología poblacional de *N. subnodosus* en el GC, el conocimiento de la ecología local de los pescadores de la región permite suponer que la abundancia de la almeja mano de león se da por temporadas, y que cuando la abundancia de *S. limbatus* aumenta la de *N. subnodosus* disminuye (Comm. Pers. Manuel Maldonado). Sin embargo, ambas especies son de importancia ecológica y económica, por lo cual es necesario conocer más acerca de su distribución temporal y espacial a lo largo del GC para generar una línea base de información para su manejo y posible aprovechamiento. Por otra parte, es necesario considerar que reducciones severas en el tamaño

poblacional de una especie conllevan a una pérdida rápida de su diversidad genética, lo cual compromete su potencial adaptativo y aumenta el riesgo de su extinción (Ibarra *et al.*, 2011).

Una de las dificultades de la aplicación de técnicas moleculares en moluscos es la obtención de DNA de suficiente calidad y pureza (Pereira *et al.*, 2011) debido a la gran cantidad de polisacáridos que presentan sus tejidos, los cuales pueden inhibir la actividad de enzimas como la polimerasa (Shioda y Marakami-Muofushi, 1987). Sokolov (2000) menciona que el tejido del músculo aductor es el mejor recurso para la obtención de DNA de buena calidad en moluscos. Incluso varios autores han optado por utilizar músculo aductor para estudios de genética poblacional en diferentes especies como *Crassostrea corteziensis* (Rivera-Apodaca, 2009), *Patinopecten yessoensis* (Sato y Nagashima, 2001) y *Nodipecten subnodosus* (Ibarra *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2010) pero la obtención de este tejido implica necesariamente sacrificar a los individuos. Torres-Martínez *et al.* (2012) realizaron un estudio en el que probaron métodos de relajación en *N. subnodosus* e incisión del manto y encontraron muy buena supervivencia después de la incisión, así como regeneración del manto en todas las almejas. Es por esto, que en este trabajo se optó por hacer un muestreo no destructivo y trabajar con el manto para la extracción de DNA de las muestras silvestres. Únicamente se utilizó músculo aductor para la extracción de las muestras de los juveniles del lote de cultivo, asimismo para las muestras de NAT porque se tenía el producto para consumo local.

En 2006, Aranishi y Okimoto describieron un método para la extracción de DNA del manto de *Crassostrea gigas* empleando proteinasa K, Chelex 100, detergentes y una alta concentración de urea; sin embargo, no obtuvieron amplificación reproducible, por la presencia de proteínas presentes en el manto, que inhiben la amplificación por PCR. También compararon métodos de purificación, utilizando un tratamiento con silica y precipitación con etanol, encontrando que este último es incapaz de remover completamente los inhibidores de PCR presentes en el manto. Desafortunadamente en el presente trabajo con la utilización de manto y el protocolo comercial (DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN®) que emplea purificación con etanol, tampoco fue posible obtener amplificación de los diez microsatélites en todas las muestras, posiblemente por la presencia de algún inhibidor, aunque también pueden estar involucradas otras causas. McInerney *et al.* (2011) indican que una de las dificultades para amplificar microsatélites por PCR es la presencia de regiones flanqueantes inestables, que es donde se alinean los cebadores. Es incierto por qué no fue posible obtener amplificación en muchas muestras, ya sea por mutación en las regiones flanqueantes y presencia de alelos nulos, pero tampoco puede descartarse que esto se haya debido a la calidad del DNA, porque los valores obtenidos en Nanodrop de la relación 260/230 indicaron contaminación por solventes.

Para el análisis genético inicialmente se tenía contemplado también analizar 30 muestras provenientes de Bahía de La Paz; sin embargo, no fue posible obtener amplificación exitosa para ningún microsatélite y después de hacer varias pruebas sin obtener resultados se descartó la utilización de esta localidad en el análisis. Como el muestreo en BLP no se hizo de forma personal existe la posibilidad de que colectaran muestras de una especie críptica, aunque no se probó la amplificación de un gen como 16S o COI para despejar esta duda. Sin embargo, mientras que Keen (1971) menciona que la distribución de *N. subnodosus* abarca desde las costas de la península de Baja California hasta Perú; Smith (1991) señala que su distribución está en el GC y costa oeste de Baja California Sur hasta Guerrero Negro e Isla Cedros. También menciona que existe una especie *Nodipecten arthriticus* que es idéntica a *N. subnodosus*, excepto porque tiene una costilla más y un esquema diferente de nodos en la valva izquierda. Esta especie tiene su distribución cerca de la boca del GC hasta Perú.

La familia Pectinidae es una de las más grandes de bivalvos marinos, cuenta con aproximadamente 225 especies existentes incluidas en 56 géneros. Los pectínidos exhiben una amplia gama de formas de la concha, tamaño y color, pero a pesar de su importancia tanto ecológica como económica, la clasificación taxonómica de la familia está basada en caracteres morfológicos de las conchas de adultos, lo cual refleja algunas dudas en validez de estos esquemas de clasificación (Puslednik y Serb, 2008). Estos autores también mencionan que las relaciones filogenéticas de algunos pectínidos aún no se han estudiado con técnicas moleculares y morfológicas simultáneamente; por eso es necesario aclarar la sistemática de estas dos especies, ya que hay una gran discrepancia entre si se trata de especies distintas o es la misma especie.

## 4.2 Diversidad genética

Con la utilización de diez marcadores microsatélite se encontraron 120 alelos diferentes en los 76 individuos de *N. subnodosus*. Empleando los mismos diez loci microsatélite Petersen *et al.* (2010) observaron 216 alelos diferentes en los 808 individuos silvestres y de cultivo del Pacífico y GC, de éstos, únicamente 103 alelos se observaron en los individuos de Bahía de los Ángeles (n = 61), que es una de las localidades que se encuentra geográficamente más cercana a las que se evaluaron en este trabajo. Con este antecedente previo es posible hacer una comparación de la diversidad genética de la almeja mano de león en tiempo y espacio, es decir, si ha habido cambios significativos entre lo que se tenía registrado para

el año 2006 (año en que realizaron el muestreo) y lo que se encontró diez años después en el presente trabajo.

En este estudio el número total de alelos diferentes en las localidades silvestres varió de 40 (San Francisquito) a 84 (Bahía de los Ángeles) y 85 en el lote de cultivo (F1 de Bahía de las Ánimas). Los loci más polimórficos fueron *NsubC261* ( $N_a = 16$ ,  $H_o = 0.687$ ,  $H_e = 0.800$ ) y *NsubA1G09* ( $N_a = 15$ ,  $H_o = 0.613$ ,  $H_e = 0.808$ ), lo cual coincide con los resultados reportados por Petersen *et al.* (2010). Sin embargo, las frecuencias alélicas sí cambiaron. En general los alelos más abundantes no fueron los mismos para todas las localidades, únicamente para el locus *NsubC205* el alelo 198 fue el más abundante en todas las localidades. El alelo 350 en el locus *NsubA1G09* y el alelo 230 en el locus *NsubA004* que Petersen *et al.* (2010) reportaron como los más frecuentes, no se encontraron en la localidad de San Francisquito. Algo similar ocurrió con el alelo 302 del locus *NsubA245*, que también se reportó como el más frecuente, pero en este estudio tampoco se encontró en las localidades de Bahía de los Ángeles y Punta El Soldado.

Analizando las frecuencias alélicas puede observarse la pérdida de alelos, en el caso del locus *NsubA208* el alelo 288 que reportaron como el más frecuente, está presente en todas las localidades silvestres, excepto en el lote de cultivo. Las prácticas acuícolas pueden disminuir la variabilidad genética en poblaciones cultivadas, la pérdida de alelos en cultivo se atribuye principalmente al efecto fundador, es decir, la selección de pocos reproductores para realizar los desoves o reproductores emparentados (Norris *et al.*, 1999; Martínez-Matus, 2016). Además de esto, la pérdida de diversidad también podría estar relacionada con su estrategia reproductiva (hermafrodita) con un alto potencial de autofecundación. Toro *et al.* (2009) encontraron que en bancos naturales del pectínido hermafrodita *Argopecten purpuratus*, existen grados variables de autofecundación, que se traducen en un aumento de la endogamia. Como se sabe una de las principales consecuencias de la autofecundación es la reducción en la heterocigosidad (Beaumont, 1986).

El nivel de diversidad genética, en términos de heterocigosidad, para *N. subnodosus* en las localidades del GC mostró valores moderados ( $H_o = 0.60$ ,  $H_e = 0.75$ ), comparado con lo obtenido previamente para la misma especie por Petersen *et al.* (2010) también para el GC ( $H_o = 0.72$ ,  $H_e = 0.76$ ), en donde se puede observar que obtuvieron un valor mayor en la heterocigosidad observada. Sin embargo, en ese estudio, aunque el número de localidades fue igual (4 localidades, aunque no las mismas), el tamaño de la muestra ( $n = 192$ ) fue superior a lo evaluado en el presente estudio ( $n = 76$ ), lo cual incrementa la posibilidad de obtener estimaciones de variabilidad genética superiores. Las muestras de cultivo que se analizaron en ese estudio mostraron una menor diversidad, medida por la heterocigosidad esperada y la riqueza de

alelos. Zhan *et al.* (2009) evaluaron la estructura genética del pectínido *Chlamys farreri* con nueve loci microsatélite, en seis localidades en el norte de China (N = 270). Los valores de heterocigosidad que reportaron ( $H_o = 0.592$   $H_e = 0.732$ ) coinciden con los encontrados en este trabajo.

Comparando los valores de variabilidad obtenidos aquí, con lo reportado para otros moluscos bivalvos también en el Golfo de California, se observan valores parecidos. Pérez-Valencia (2011) al evaluar la variabilidad genética de *Panopea globosa* en cuatro localidades (N = 200) con dos marcadores microsatélite reporta valores ( $H_o = 0.62-0.82$ ,  $H_e = 0.84-0.90$ ). Rivera-Apodaca (2009) evaluó cuatro localidades de ostión *Crassostrea corteziensis* (N = 180) utilizando seis loci microsatélites reportando alta variabilidad genética ( $H_o = 0.645$ ,  $H_e = 0.921$ ). Astanei *et al.* (2005) utilizaron cinco loci microsatélite para estimar la diversidad y estructura genética en diez poblaciones de mejillón *Dreissena polymorpha*, (N = 345) reportaron valores de heterocigosidad observada similares ( $H_o = 0.580$ ,  $H_e = 0.843$ ). Por su parte Galindo-Sánchez *et al.* (2008) evaluaron la diversidad del ostión *Crassostrea virginica* en seis lagunas de Veracruz (N = 270), con cinco microsatélites, encontrando valores muy similares a los obtenidos en este trabajo ( $H_o = 0.595$ ,  $H_e = 0.819$ ). Otro estudio realizado por Zamora-Bustillos *et al.* (2011) para analizar la diversidad de dos poblaciones (N = 72) del molusco gasterópodo *Strombus gigas* en Yucatán en el que empleó cinco microsatélites, registró valores menores ( $H_o = 0.406$ ,  $H_e = 0.622$ ), esta especie al igual que la almeja mano de león fue ampliamente sobreexplotada y sus poblaciones naturales también han disminuido drásticamente.

De las 60 pruebas de equilibrio de Hardy-Weinberg que se hicieron (una por cada locus, para cada localidad), 25 presentaron desequilibrio debido al déficit de heterocigotos. De acuerdo a los resultados globales ninguna de las localidades se encontró en EHW. Únicamente el locus *NsubC261* se mantuvo en EHW en todas las localidades. Petersen *et al.* (2010) menciona que también encontró desviaciones significativas del EHW en 16 pruebas, pero después de hacer la corrección de Bonferroni, el único locus que permaneció significativamente diferente de las expectativas de EHW fue *NsubC261* en una localidad del Pacífico; el único locus que en este estudio si se mantuvo en equilibrio.

En las localidades evaluadas de *N. subnodosus*, no se encontraron diferencias significativas en la riqueza alélica, es decir, el número de alelos corregido por el tamaño de la muestra. A pesar de esto, los mayores valores de diversidad se detectaron en Bahía de las Ánimas ( $R_a = 4.096$ ,  $n = 14$ ) y los menores en San Francisquito ( $R_a = 3.303$ ,  $n = 5$ ). Petersen *et al.* (2010) registró valores de riqueza alélica superiores en el GC ( $R_a = 17.93$ ,  $n = 192$ ), pero no hay que perder en cuenta que sus tamaños de muestra también fueron superiores. El análisis global del coeficiente de endogamia por localidad, mostró que todas las localidades

presentaron valores significativamente diferentes de cero, además de que los valores de endogamia encontrados para las localidades silvestres del GC fueron altos ( $F_{IS} = 0.263$ ;  $DE = 0.06$ ), comparados con los reportados por Petersen *et al.* (2010) ( $F_{IS} = 0.055$ ;  $DE = 0.021$ ) para muestras tomadas en 2006. En la localidad de Punta El Soldado se presentó el menor valor de  $F_{IS}$  (0.196;  $DE = 0.200$ ) y San Francisquito en cambio presentó el valor más grande (0.327;  $DE = 0.447$ ), lo cual coincide en que sea la localidad con menor variabilidad genética, esta baja diversidad detectada probablemente esté relacionada con el bajo número de muestras ( $n = 5$ ). Por su parte el lote de cultivo presentó valores sumamente parecidos ( $F_{IS} = 0.296$ ;  $DE = 0.259$ ), a los de su contraparte silvestre Bahía de las Ánimas ( $F_{IS} = 0.294$ ;  $DE = 0.231$ ). El coeficiente de endogamia indica que en todas las localidades se presentó un déficit de heterocigotos.

El déficit de heterocigotos ya se ha observado en otros moluscos: *Crassostrea gigas* (Hedgecock *et al.*, 2004), *Crassostrea corteziensis* (Rivera-Apodaca, 2009), *Panopea globosa* (Pérez-Valencia, 2011), *Strombus gigas* (Zamora-Bustillos *et al.*, 2011) y anteriormente en *N. subnodosus* (Petersen *et al.*, 2010). Varios de estos autores atribuyen como la principal causa del déficit de heterocigotos a la presencia alelos nulos. Hoarau *et al.* (2002) menciona que los alelos nulos son comúnmente una desventaja en los microsatélites, ocasionando altos déficit de heterocigotos. La endogamia también podría explicar la deficiencia de heterocigotos, esa probabilidad aumenta en esta especie, ya que al ser hermafrodita funcional y tener la capacidad de autofecundarse, puede resultar en una reducción en variabilidad genética (Ibarra *et al.*, 2011), esto y su elevada fecundidad podría estar relacionado con la alta prevalencia de alelos nulos. Además, la endogamia puede verse favorecida si hay una disminución de individuos en su rango de distribución. Como se mencionó al inicio de este capítulo se han observado disminuciones severas de almeja mano de león en el rango de distribución a través del tiempo.

Por otra parte, el efecto Wahlund, es otro mecanismo que podría explicar el déficit de heterocigotos. Este término hace referencia a la reducción en heterocigosidad causada por una mezcla de individuos de distintas poblaciones que difieren en frecuencias alélicas (Astane *et al.*, 2005). Sin embargo, se descarta la influencia de este efecto en este estudio, porque los valores registrados de  $F_{ST}$  indicaron que la variabilidad genética estuvo distribuida de igual forma en las localidades analizadas, es decir, no se observó estructura genética. Con base en las frecuencias de alelos nulos encontradas en este estudio, se plantea que el exceso de homocigotos es por causa de la presencia de alelos nulos, ya que todos los loci utilizados presentaron alelos nulos ( $F(n)$  promedio = 0.120;  $DE = 0.05$ ), algunos en mayor frecuencia que otros, pero en todos se encontraron. Las localidades con mayor frecuencia de alelos nulos fueron Isla Natividad y el F1 de Bahía de las Ánimas. Asimismo, los loci que presentaron la menor frecuencia de alelos nulos fueron *NsubA004*, *NsubC261* y *NsubA005*. Por el contrario, los loci con mayor presencia de alelos nulos fueron



*NsubA208* y *NsubC205*, razón por la cual se eliminaron para hacer el análisis de diferenciación genética ( $F_{ST}$  y STRUCTURE).

### 4.3 Estructura genética

Los resultados obtenidos mediante el análisis bayesiano para la asignación de individuos a diferentes poblaciones, indicaron que no existen diferentes grupos genéticos, es decir, no se encontró estructura poblacional. Se corrieron varias simulaciones para todas las muestras (silvestres y de cultivo) con un valor de componentes genéticos (K) distinto, pero en ninguno se observó una estructuración. La prueba de Evanno indicó que el número más probable de componentes genéticos para todas las muestras de origen silvestre y de cultivo con los diez loci microsatélite era  $K = 2$ . En un segundo grupo de simulaciones se incluyó únicamente a las cuatro localidades silvestres (BLA, PSO, ANI y SFR) además de excluir del análisis a los loci *NsubA208* y *NsubC205*, ya que presentaron en promedio más del 15% de alelos nulos. En este caso la prueba de Evanno mostró que el número más probable de componentes genéticos era igual a cuatro. Además, en este análisis fue más evidente la ausencia de estructura genética (Fig. 14), los cuatro componentes genéticos estuvieron distribuidos de forma homogénea en todos los individuos de las localidades silvestres. Resultados preliminares de los datos de RAD-Seq para todas las muestras silvestres y de cultivo ( $n = 149$ ), donde se analizaron 1,190 loci SNPs (62 *outliers* y 627 loci neutrales) muestran un patrón similar con dos ancestrías compartidas entre localidades ( $K = 2$ , ADMIXTURE análisis - STRUCTURE). Sin embargo, en este caso, uno de los componentes ancestrales estuvo altamente representado en las muestras (más del 75%; Araneda *et al.*, en prep.)

Esto coincide con los resultados reportados previamente por Petersen *et al.* (2010). Ellos también evaluaron la estructura genética poblacional, comparando localidades de ambas costas de la península de Baja California. Llegaron a la conclusión de que la población del GC y la del Pacífico, son dos poblaciones genéticamente distintas, demostrando que no existe flujo genético entre estas poblaciones. Por el contrario, debido a la distancia geográfica entre los sitios de muestreo, no encontró diferencias genéticas considerando únicamente las muestras del Golfo de California.

Otra estimación de la diferenciación genética se hizo mediante el índice de fijación ( $F_{ST}$ ), que toma valores que van del 0 a 1. Se ha sugerido que valores en el rango de 0-0.05 indican escasa diferenciación, entre 0.05-0.15 indica moderada diferenciación, una gran diferenciación se encuentra entre 0.15-0.25, mientras

que valores sobre 0.25 indican una muy grande diferenciación genética (Hartl y Clark, 1997); sin embargo, esta escala puede variar dependiendo de la especie evaluada. Para este análisis igualmente se eliminaron a los loci *NsubA208* y *NsubC205* por la alta frecuencia de alelos nulos. Los valores de  $F_{ST}$  para las comparaciones por pares de las muestras silvestres indicaron una escasa diferenciación (-0.007 a 0.056) y solamente las comparaciones entre BLA y NAT y entre ANI y NAT indicaron que hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), lo cual es de esperarse pues Isla Natividad es la más lejana, por encontrarse en el Pacífico, se encuentra a una distancia aproximada de 1900 Km de Bahía de los Ángeles y a 1850 Km de Bahía de las Ánimas, por el flujo genético entre estas localidades es nulo. Hellberg *et al.* (2002) comentan que se ha observado que poblaciones geográficamente más cercanas frecuentemente tienen una mayor diferenciación genética que las poblaciones más distantes. Los valores significativos observados en este estudio (0.023 y 0.038) son superiores a los obtenidos previamente (-0.002 a 0.005) entre las localidades evaluadas en el Golfo de California por Petersen *et al.* (2010).

Existen trabajos en los que se ha observado una estructura genética poblacional moderada, Galindo-Sánchez *et al.* (2008) observaron esto en *Crassostrea virginica* relacionada con actividades antropogénicas y el aislamiento de algunas lagunas debido a factores físicos. Zhan *et al.* (2009) también determinaron la estructura genética poblacional en el pectínido *Chlamys farreri* y asociaron esta diferenciación con las corrientes marinas, en dos de las seis localidades que analizaron no detectaron diferenciación genética ( $F_{ST} = 0.0013$ ), pero las otras cuatro localidades separadas por fuertes corrientes marinas mostraron baja pero significativa diferenciación ( $F_{ST} = 0.018-0.060$ ). Zamora-Bustillos *et al.* (2011) también analizaron la estructura genética de dos poblaciones de caracol rosado *Strombus gigas*, los niveles de diferenciación que encontraron sugieren la existencia de una sola población panmíctica en la península de Yucatán ( $F_{ST} = 0.003, p = 0.49$ ).

Las barreras oceanográficas tales como la temperatura y corrientes, son uno de los principales factores que influyen en la estructura genética poblacional de organismos marinos, además de las actividades antropogénicas (Zhan *et al.*, 2009). La larva planctónica de *N. subnodosus* se dispersa en la columna de agua por aproximadamente de dos a tres semanas antes de asentarse en el sustrato (Rupp *et al.*, 2011). Yee-Duarte (2009) analizó el proceso reproductivo de almeja mano de león en Bahía de los Ángeles, encontró que esta especie se reproduce casi de manera continua, gracias a que la abundancia de alimento en esta zona favorece la reproducción, a pesar de esto la mayor proporción de desove se observó en los meses de marzo y abril, es decir en primavera. Durante esta época la dirección de la corriente superficial en el Golfo de California sigue un patrón norte-sur, mientras que el patrón es sur-norte durante el verano (Marinone, 2003). Este patrón de corrientes favorece la dispersión larval durante el período reproductivo

desde las localidades norteñas hacia las del sur, lo cual favorece el flujo genético en el área de estudio, esto se puede constatar en los valores de  $F_{ST}$ , aunque en una comparación se encuentra un valor significativo, es bajo (0.078), además se demostró que si hay flujo genético unidireccional entre estas localidades.

Whitlock y McCauley (1999) mencionan que la estimación del flujo genético es primordial para determinar la estructura de las poblaciones, ya que es una fuerza que mantiene integrada a la especie. Por lo cual ese análisis también se incluyó en este trabajo. Se estimaron altos valores de flujo genético entre las localidades más cercanas, mayormente entre Bahía de los Ángeles y Bahía de las Ánimas hacia Punta El Soldado. Según estos resultados, Bahía de los Ángeles recibió genes únicamente de dos localidades, Punta El Soldado y Bahía de las Ánimas, con valores moderados de número de migrantes (MLE) entre 72 y 103 individuos. Punta El Soldado también recibió un alto valor de flujo de Bahía de las Ánimas (MLE = 10,500 individuos) y de Bahía de los Ángeles (MLE = 20,400 individuos). Punta El Soldado solo recibió genes, pero aportó muy poco a otras localidades, por el contrario Bahía de las Ánimas dio genes a las dos localidades más al norte, pero también recibió muy poco flujo genético (MLE = 0.0001). El resto de las localidades obtuvieron valores muy bajos, cercanos a cero, las localidades con menor recepción de flujo genético fueron San Francisquito y Bahía de las Ánimas, la dirección del flujo fue bidireccional entre Punta El Soldado y San Francisquito, pero con valores de tasas de migración demasiado bajos (MLE = 0.0005), comparados con los anteriormente mencionados (10,500 – 20,400).

Las estimaciones revelaron que la mayor cantidad de flujo genético tiene una dirección de norte a sur, lo cual coincide con el patrón de corrientes durante la temporada reproductiva de este pectínido en Bahía de Los Ángeles (Yee-Duarte, 2009). Estos resultados son muy similares con los resultados en la dirección y magnitud del flujo reportados por Saavedra-Sotelo (2013) para corales hermatípicos en el Golfo de California. Sin embargo, ella encontró escaso o nulo flujo en dirección sur a norte. En este estudio si se encontró flujo en dirección sur a norte, aunque en menor magnitud.

Los resultados sugieren que *N. subnodosus* presenta una escasa estructura genética dentro del área de estudio, ya que no existen diferencias marcadas entre las localidades. Esto puede atribuirse a que la dispersión durante la fase larval favorece el flujo genético entre localidades. Por lo que se puede aceptar la hipótesis planteada en este trabajo, los bancos de almeja mano de león dentro de la región central del Golfo de California no presentan diferencia ni estructura genética, es decir, se trata de una población panmíctica.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

1. Se obtuvieron mejores resultados de amplificación de los marcadores microsatélite mediante PCR cuando se utilizó el músculo aductor, que con la utilización de manto; con este tejido no fue posible obtener amplificación exitosa de todos los microsatélites.
2. Del total de 120 alelos reportados en este estudio, 47 alelos (39.2%) estuvieron compartidos entre el GC y la costa Pacífico, 16 alelos (13.3%) fueron exclusivos de las poblaciones del GC, 15 alelos (12.5%) exclusivos de la progenie producida en granja y el resto, 42 alelos (35%) estuvieron compartidos entre las localidades del GC.
3. De las localidades silvestres, el mayor número total de alelos en los diez microsatélites varió de 40 en San Francisquito ( $n = 5$ ) a 84 alelos en Bahía de los Ángeles ( $n = 17$ ).
4. El nivel de diversidad genética en términos de heterocigosidad en las localidades del GC mostró valores moderados ( $H_o = 0.60$ ,  $H_e = 0.75$ ;  $n = 76$ ) en almejas colectadas de 2015 a 2017, con una heterocigosidad observada ligeramente menor a lo reportado para el análisis de poblaciones silvestres del GC muestreadas de 2006 a 2008 ( $H_o = 0.76$ ,  $H_e = 0.72$ ;  $n = 192$ ).
5. La riqueza alélica en el GC disminuyó significativamente de 9.59 alelos/localidad en 2006 - 2008 a 3.83 alelos/localidad en el presente; siendo Bahía de las Ánimas ( $R_a = 4.10$ ) la localidad con mayor riqueza actual y San Francisquito ( $R_a = 3.30$ ) la de menor.
6. De acuerdo a los resultados globales, ninguna de las localidades evaluadas estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg. Únicamente el locus *NsubC261* se mantuvo en equilibrio de HW en todas las localidades.
7. Las localidades silvestres del Golfo de California se encontraron en endogamia moderada ( $F_{IS} = 0.263$ ;  $DE = 0.06$ ) y significativamente diferente a lo reportado previamente ( $F_{IS} = 0.06$ ;  $DE = 0.02$ ) para poblaciones de 2006-2008, relacionado con la disminución en el número de individuos presentes y el déficit de heterocigotos en la población actual.
8. Los análisis de estructura y diferenciación genética demuestran que los individuos de las cuatro localidades silvestres evaluadas dentro de la región central del Golfo de California comprenden una

población genéticamente homogénea (población panmíctica) debido al flujo genético ocasionado por el patrón de corrientes oceánicas de la región, que favorece el movimiento de genes entre las localidades evaluadas.

9. Las estimaciones del flujo genético revelaron que la mayor cantidad de flujo genético tiene una dirección de norte a sur, lo cual coincide con el patrón de corrientes durante la temporada reproductiva de este pectínido en Bahía de los Ángeles (marzo y abril).

## 5.1 Recomendaciones

- Para posteriores análisis de diversidad genética o determinación de parentesco de esta especie se recomienda la utilización de un conjunto de cinco marcadores microsatélite: *NsubC261*, *NsubA004*, *NsubA005*, *NsubA245* y *NsubA1G09*. Estos marcadores tuvieron la menor frecuencia de alelos nulos ( $F_n < 0.10$ ), así como buenos porcentajes de éxito en la amplificación (>60% éxito) y además mostraron un alto polimorfismo (9 a 16 alelos por locus).
- En la producción de semillas de almeja mano de león es imprescindible la evaluación de la diversidad genética de la progenie producida y de los reproductores, esto con el fin de evitar introducir semilla con poca diversidad genética para evitar la pérdida de la misma en poblaciones naturales, dado que la etapa de engorde se realiza en aguas abiertas.
- Es fundamental realizar estudios de dinámica poblacional de la especie, para determinar si es capaz de desplazarse, dado que algunas veces se encontraron bancos en cierta ubicación y después ya no se localizaron o estuvieron desplazados.
- También es necesario realizar la clasificación taxonómica de las especies de pectínidos considerando técnicas moleculares además de las características morfológicas. Con el fin de determinar si *N. subnodosus* y *N. arthriticus* son especies crípticas o se trata de la misma especie.

## Literatura citada

---

- Alejandrino, A., Puslednik, L., Serb, J. M. 2011. Convergent and parallel evolution in life habit of the scallops (Bivalvia: Pectinidae). *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 164.
- Araneda, C., Lafarga-De la Cruz, F., Oviedo, B., López Dinamarca, M. E., Vargas, M., Larraín, M. A., Galindo, C. E. 2018. Genetic Diversity and Population Structure in Pacific Lion-Paw Scallop, *Nodipecten subnodosus* from Baja California Peninsula, Mexico. En Congreso que se llevará a cabo: Plant and Animal Genome XXVI, San Diego, CA, EE.UU., 13-17 de enero 2018.
- Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., Jordana, J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 13(1), 30-42.
- Aranishi, F., Okimoto, T. 2006. A simple and reliable method for DNA extraction from bivalve mantle. *Journal of applied genetics*, 47(3), 251-254.
- Arellano-Martínez, M., Ceballos-Vázquez, B., Lodeiros-Seijo, C., Freites-Valbuena, L., Palacios, E., Racotta, I., Váldez-Ramírez, M., García, N., García-Domínguez, F. 2011. Reproducción. En Maeda-Martínez, A., Lodeiros-Seijo, C. (Eds.). *Biología y cultivo de los pectínidos del género Nodipecten*. México: Limusa. pp. 99-133.
- Arellano-Martínez M., Ceballos-Vázquez, B., Villalejo-Fuerte, M., García-Domínguez, F., Elorduy-Garay, J., Esliman-Salgado, A., Racotta, I. 2004. Reproduction of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* Sowerby, 1835 (Bivalvia: Pectinidae) from Laguna Ojo de Liebre, B.C.S., México. *Journal of Shellfish Research*, 23(3), 723–730.
- Astanei, I., Gosling, E., Wilson, J. I. M., Powell, E. 2005. Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Molecular Ecology*, 14(6), 1655-1666.
- Astorga, M. 2008. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. En A. Lovatelli, A. Farías, y Uriarte I., Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. pp. 277-287.
- Avendaño, M., Le Pennec, M., Cantillanez, M. 2001. Anormalidades en larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Pectinidae), uno de los problemas en la reproducción artificial de semilla. *Estudios Oceanológicos*, 20, 33-42.
- BCS Noticias. 2016, 31 de marzo. Diputados exhortan a autoridades a prohibir pesca ilegal en mares de BCS. Disponible en: <http://www.bcsnoticias.mx/diputados-exhortan-a-autoridades-a-prohibir-pesca-ilegal-en-mares-de-bcs/>

- Beaumont, A.R., 1986. Genetics aspects of hatchery rearing of the scallop, *Pecten maximus* (L.). *Aquaculture*, 57, 99– 110.
- Beerli, P., Felsenstein, J., 1999. Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, 152, 763–773.
- Beerli, P., Palczewski, M., 2010. Unified framework to evaluate Panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics*, 185, 313–326.
- Beltrán-Lugo, A. I., Maeda-Martínez, A., Pacheco-Aguilar, R., Nolasco-Soria, H. 2006. Seasonal variations in chemical, physical, textural, and microstructural properties of adductor muscles of Pacific lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*). *Aquaculture*, 258(1), 619-632.
- Cáceres-Martínez, J. 2007. Acerca de las enfermedades infecciosas emergentes en moluscos bivalvos cultivados. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuícola y la Red de Diagnóstico*, 1(37): 4-6.
- Castañeda-Rivero, F. R, 2017. Ecología funcional de los ensambles de macroinvertebrados epibentónicos en el norte del golfo de California. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 190 pp.
- CINU Naciones Unidas Centro de Información para México, Cuba y República Dominicana. 2008. Disponible en: [http://www.cinu.org.mx/temas/des\\_sost/biodiv.htm](http://www.cinu.org.mx/temas/des_sost/biodiv.htm)
- COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios). 2017. Lista de áreas de cosecha de moluscos bivalvos clasificadas y cosechadores certificados dentro del Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/265042/Listado\\_cosechadores\\_octubre\\_2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/265042/Listado_cosechadores_octubre_2017.pdf)
- Coombs, J. A., Letcher, B. H., Nislow, K. H. 2008. CREATE: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Molecular Ecology Resources*, 8(3), 578–580.
- Desjardins, P., Conklin, D. 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, (45), e2565.
- Diario Oficial de la Federación. 2012. Carta Nacional Pesquera. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D. F.
- Earl, D. A., VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews. Genetics*, 5, 435-445.

- Escalante, F., Valdez-Holguín, J. E., Álvarez-Borrego, S., Lara-Lara, J. R. 2013. Temporal and spatial variation of sea surface temperature, chlorophyll *a*, and primary productivity in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 39(2):203-215.
- Evanno, G., Regnaut S., Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- 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.
- FAO/UNEP. 1981. Conservation of the genetic resources of fish: problems and recommendations. Report of the Expert Consultation on the genetic resources of fish. Rome, 9-13 June 1980. FAO Fish. Tech. Pap., (217):43 p. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/AD013E/AD013E00.htm>
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2010. Fishery Statistical Collections 1950-2008. FAO, Rome, Italy. En: Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA) (Ed.). 2014. Sustentabilidad y Pesca Responsable en México Evaluación y Manejo. pp. 17-48.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2014. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2014. Roma 253 pp.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2016. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.
- Galindo-Sánchez, C. E., Gaffney, P. M., Pérez-Rostro, C. I., De la Rosa-Vélez, J., Candela, J., Cruz, P. 2008. Assessment of genetic diversity of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in Veracruz, Mexico using microsatellite markers. *Journal of shellfish Research*, 27(4), 721-727.
- Garrido-Garduño, T., Vázquez-Domínguez, E. 2013. Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84(3), 1031-1054.
- González, E. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2-3), 377-388.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86(6), 485-486.
- Hartl, D.L., Clark, A.G. 1997. Principles of Population Genetics, 3rd edn. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA. En: Balloux, F., Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular ecology*, 11(2), 155-165.



- Hedgecock, D., Li, G., Hubert, S., Bucklin, K., Ribes, V. 2004. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 23(2), 379-386.
- Hedrick, P. W. 2000. *Genetics of Populations*. Segunda edición. Editorial Jones & Bartlett, Boston, USA.
- Hedrick, P. W. 2001. Conservation genetics: Where are we now? *Trends in Ecology and Evolution*, 16(11), 629–636.
- 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.
- Helm, M., Bourne, N., Lovatelli, A. (Comp.). 2006. *Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico*. FAO, Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, FAO. 184 pp.
- Himmelman, J. H., Guderley, H. E., Duncan, P. F. 2009. Responses of the saucer scallop *Amusium balloti* to potential predators. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 378(1), 58-61.
- Hoarau, G., Rijnsdorp, A.D., Van der Veer, H.W., Stam, W.T., Olsen, J.L. 2002. Population structure of plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in northern Europe: microsatellites revealed large-scale spatial and temporal homogeneity. *Molecular Ecology*, 11, 1165–1176.
- Ibarra, A., Alfonsi, C., Pérez, J. 2011. Genética y biotecnologías para el mejoramiento del cultivo y la conservación del recurso *Nodipecten* spp. En Maeda-Martínez, A., Lodeiros-Seijo, C. (Eds.). *Biología y cultivo de los moluscos pectínidos del género Nodipecten*. México: Limusa. pp. 135-147.
- Ibarra, A., Petersen, J., Famula, T., May, B. 2006. Characterization of 35 microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and their cross-species amplification in four other scallops of the Pectinidae family. *Molecular Ecology Notes*, 6, 153-156.
- Jenkins, S. R., Lart, W., Vause, B. J., Brand, A. R. 2003. Seasonal swimming behaviour in the queen scallop (*Aequipecten opercularis*) and its effect on dredge fisheries. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 289(2), 163-179.
- Kalinowski, S. T., & Taper, M. L. (2006). Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 7(6), 991-995.
- Keen, M. 1971. *Sea Shells of Tropical West America: marine mollusks from Baja California to Peru*. Segunda edición. Stanford University Press. Stanford, California. EE.UU. pp. 1064.
- Koch, V., Mazón-Suástegui, J., Sinsel, F., Robles, M., Dunn, D. 2005. Lion's paw scallop (*Nodipecten subnodosus*, Sowerby 1835) aquaculture in Bahía Magdalena, Mexico: effects of population density and season on juvenile growth and mortality. *Aquaculture Research*, 36: 505-512.

- Koch, V., Rengstorf, A., Taylor, M., Mazón-Suástegui, J., Sinsel, F., Wolff, M. 2015. Comparative growth and mortality of cultured Lion's Paw scallops (*Nodipecten subnodosus*) from Gulf of California and Pacific populations and their reciprocal transplants. *Aquaculture Research*, 46(1), 185-201.
- Liu, Z. J. Cordes, J. F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1), 1–37.
- Lovatelli, A., Farías, A., Uriarte, I. (Eds). 2008. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO.
- Maeda-Martínez, A. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En A. Lovatelli, A. Farías, e I. Uriarte (Eds.). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 91 -100.
- Maguiño-Napurí, R., Maeda-Martínez, A., Moctezuma-Cano, T., Valle-Meza, G., Acosta-Salmón, H. 2011. Abundancia larvaria y captación de semilla de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* en la Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, México. *Ciencias Marinas*, 37(1), 51-57.
- Maldonado-Amparo, R., Ramírez, J., Ávila, S., Ibarra, A. M. 2004. Triploid lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby); growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies when grown at a high food availability site. *Aquaculture*, 235, 185-205.
- Marinone, S. G. (2003). A three-dimensional model of the mean and seasonal circulation of the Gulf of California. *Journal of Geophysical Research*, 108(C10), 1-27.
- Martínez, P. 2005. Aplicaciones de la genética para la mejora de la acuicultura. Boletín Instituto Español de Oceanografía, **21**(1-4), 225-238.
- Martínez-Matus, E. 2016. Diversidad genética y éxito reproductivo del jurel de Castilla *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) en cautiverio. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 102 pp.
- Massó-Rojas, J. A., Morales-Bojórquez, E., Arellano-Martínez, M., Ceballos-Vázquez, B. P., Talavera-Maya, J., Ceseña-Espinoza, N. 2014. Almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. En: Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA) (Ed.).2014. Sustentabilidad y Pesca Responsable en México Evaluación y Manejo. pp. 17-48.
- McInerney, C. E., Allcock, A. L., Johnson, M. P., Bailie, D. A., & Prodöhl, P. A. 2011. Comparative genomic analysis reveals species-dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in molluscs. *Heredity*, 106, 78-87.

- Norris, A. T., Bradley, D. G., Cunningham, E. 1999. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) populations. *Aquaculture*, 180(3-4), 247-264.
- Osuna-García, M. 2006. Efecto de la densidad en el cultivo de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835), en la Península de Baja California, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional. 95 pp.
- Peakall, R., Smouse, P. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and reserch-an update. *Bioinformatics Applications Note*, 28(19), 2537-2539.
- Pereira, J. C., Chaves, R., Bastos, E., Leitão, A., Guedes-Pinto, H. 2011. An efficient method for genomic DNA extraction from different molluscs species. *International journal of molecular sciences*, 12(11), 8086-8095.
- Pérez-Valencia, L. I. 2011. Variabilidad genética de la almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall, 1898) en el Noroeste de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigaciones biológicas del Noroeste. 75 pp.
- Petersen, J., Ibarra, A., Ramírez, J., May, B. 2008. An induced mass spawn of the hermaphroditic lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*: genetic assignment of maternal and paternal parentage. *Journal of Heredity*, 99(4), 337-348.
- Petersen, J., Ibarra, A., May, B. 2009. Thirty-seven additional microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and cross-amplification in other pectinids. *Conservation Genet Resour*, 1, 101-105.
- Petersen, J., Ibarra, A., May, B. 2010. Nuclear and mtDNA lineage diversity in wild and cultured Pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus* (Baja California Peninsula, Mexico). *Marine Biology*, 157(12), 2751-2767.
- Petersen, J., Baerwald, M., Ibarra, A., May, B. 2012. A first-generation linkage map of the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*): Initial evidence of QTL for size traits and markers linked to orange shell color. *Aquaculture*, 200-209.
- Ponce-Díaz, G., Massó-Rojas, A., Félix-Pico, E., Morales-Zárate, M., García, N., Lodeiros-Seijo, C., Lluch-Cota, S. 2011. *Nodipecten* spp. como recurso pesquero. En A. Maeda-Martínez, y C. Lodeiros-Seijo (Eds.). *Biología y cultivo de los moluscos pectínidos del género Nodipecten*. Limusa. 11-26 pp.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.

- Puslednik, L., Serb, J. 2008. Molecular phylogenetics of the Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) and effect of increased taxon sampling and outgroup selection on tree topology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(3), 1178-1188.
- Racotta, I. S., Ramírez, J. L., Ibarra, A. M., Rodríguez-Jaramillo, M. C., Carreño, D., Palacios, E. 2003. Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten* (*Lyropecten*) *subnodosus*. *Aquaculture*, 217(1), 335-349.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49(6), 1280-1283.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), 223-225.
- 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(4), 566-575.
- Rivera-Apodaca, C. G. 2009. Estructura poblacional y diversidad genética del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) en la Costa Oriental del Golfo de California. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional. 70 pp.
- Robledo, D., Palaikostas, C., Bargelloni, L., Martínez, P., Houston, R. 2017. Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics. *Reviews in Aquaculture*, 0, 1-13.
- Rupp, G. S., Valdéz-Ramírez, M. E., Leme Da Fonseca, M. 2011. Biología y Ecología. En: Maeda-Martínez, A. y Lodeiros-Seijo, C. (Eds.). *Biología y cultivo de los moluscos pectínidos del género Nodipecten*. México: Limusa. pp. 135-147.
- Saavedra-Sotelo, N. C. 2013. Viviendo en el límite: evaluación del efecto de hábitats marginales en la diversidad y diferenciación genética de corales hermatípicos en el Golfo de California y el Pacífico mexicano. Tesis de Doctorado en Ciencias. Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 137 pp.
- Sato, M., Nagashima, K. 2001. Molecular characterization of a mitochondrial DNA segment from the Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*): demonstration of a region showing sequence polymorphism in the population. *Marine biotechnology*, 3(4), 370-379.
- Schlötterer, C. 1998. Genome evolution: Are microsatellites really simple sequences? *Current Biology*, 8(4), R132-R134.
- Secretaría de Pesca y Acuicultura de Baja California (SEPESCA). 2011. Carta Estatal Acuícola de Baja California. 63-64 pp.
- Shioda, M., Murakami-Murofushi, K. 1987. Selective inhibition of DNA polymerase  $\alpha$  by a polysaccharide purified from slime of *Physarum polycephalum*. *Biochemical and biophysical research communications*, 146(1), 61-66.

- Smith, J. T. 1991. Cenozoic giant pectinids from California and the Tertiary Caribbean Province; *Lyropecten*, " *Macrochlamis*," *Vertipecten*, and *Nodipecten* species. 241 pp.
- Smith, P. J. 1996. La diversidad genética de los recursos pesqueros marinos: posibles repercusiones de la pesca. Roma: FAO, Documento Técnico de Pesca. Consultado el 21 de octubre de 2017, de: [https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=Cbtn7HOOnPMC&oi=fnd&pg=PA1&ots=jrdMDCqTJG&sig=N1qlzPsHFTLHQzwyDFmOx50\\_j8w#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=Cbtn7HOOnPMC&oi=fnd&pg=PA1&ots=jrdMDCqTJG&sig=N1qlzPsHFTLHQzwyDFmOx50_j8w#v=onepage&q&f=false)
- Sokolov, E. P. 2000. An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissues. *Journal of Molluscan Studies*, 66(4), 573-575.
- Soliman, T., Kanno, M., Kijima, A., y 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.
- Taylor, P.D., Fahrig, L., Henein, K., Merriam, G. 1993. Connectivity is a vital element of landscape structure. *Oikos*, 68:571-573.
- Toro, J.E., Montoya, M.P., Martínez, V., Gutiérrez, D., Vergara, A. M. 2010. Consequences of self-fertilization on the growth rate and survival of *Argopecten purpuratus*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(2):63-70.
- Torres-Martínez, J., Saucedo, P., Rangel-Dávalos, C., Acosta-Salmón, H. 2012. Advances in pre-operative techniques for pearl production in the lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus*: Relaxation and mantle excision. *Aquaculture*, 279-283.
- Tremblay, I., Guderley, H. E., Himmelman, J. H. 2012. Swimming away or clamming up: the use of phasic and tonic adductor muscles during escape responses varies with shell morphology in scallops. *Journal of Experimental Biology*, 215(23), 4131-4143.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., Shipley, P. 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535-538.
- Villalejo-Fuerte, M., Arellano-Martínez, M., Robles-Mungaray, M., Ceballos-Martínez, B. 2004. Notas sobre el crecimiento, sobrevivencia y reproducción de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* en cultivo en suspensión. *Hidrobiológica*, 14(2), 161-165.
- Villalva-Vega, J. 2011. Caracterización de las bacterias asociadas a lesiones de la concha de la almeja Mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835), cultivada en Bahía Tortugas, Baja California Sur. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 54 pp.

- Whitlock, M. C., McCauley, D. E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST} \approx 1/(4Nm+1)$ . *Heredity*, 82(2), 117-125.
- Yee-Duarte, J. A. 2009. Reproducción de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, Sowerby 1835 en Bahía de los Ángeles, BC, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional. 84 pp.
- Zamora-Bustillos, R., Rodríguez-Canul, R., García de León, F. J., Tello Cetina, J. (2011). Diversidad genética de dos poblaciones del caracol *Strombus gigas* (Gastropoda: Strombidae) en Yucatán, México, con microsatélite. *Revista de Biología Tropical*, 59(3), 1127-1134.
- Zhan, A., Hu, J., Hu, X., Zhou, Z., Hui, M., Wang, S., Peng, W., Wang, M., Bao, Z. 2009. Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): do local marine currents drive geographical differentiation? *Marine Biotechnology*, 11(2), 223-235.

## Anexos

### Anexo I

**Tabla 10.** Parámetros genéticos estimados para los diez loci en la localidad de Bahía de los Ángeles.

Locus	N	Na	AP	Ra	Ho	He	P-valor EHW	EHW sin corrección	EHW con c. Bonferroni	F (n)	F <sub>IS</sub>	P-valor F <sub>IS</sub>	P sin corrección	P con c. Bonferroni
<i>NsubA004</i>	17	10	1	4.03	0.77	0.80	0.607	ns	ns	0	0.069	0.359	ns	ns
<i>NsubA208</i>	17	5	0	3.07	0.53	0.68	0.116	ns	ns	0.101	0.250	0.090	ns	ns
<i>NsubC205</i>	17	5	0	3.45	0.35	0.74	0.000	***	***	0.222	0.545	0.000	***	***
<i>NsubC261</i>	17	12	3	4.56	0.82	0.86	0.373	ns	ns	0.011	0.069	0.318	ns	ns
<i>NsubA249</i>	17	8	1	4.29	0.77	0.83	0.101	ns	ns	0.070	0.111	0.206	ns	ns
<i>NsubA245</i>	17	5	0	3.39	0.47	0.73	0.075	ns	ns	0.143	0.385	0.008	**	ns
<i>NsubA235</i>	16	9	0	4.40	0.63	0.84	0.029	*	ns	0.146	0.289	0.010	**	ns
<i>NsubA005</i>	17	8	0	4.22	0.77	0.83	0.452	ns	ns	0.036	0.107	0.223	ns	ns
<i>NsubA1G09</i>	17	12	0	4.85	0.65	0.89	0.001	**	***	0.119	0.297	0.002	**	**
<i>NsubA1F03</i>	16	10	1	4.11	0.63	0.80	0.009	**	ns	0.097	0.252	0.025	*	ns
Promedio		8.4	0.60	4.04	0.64	0.80	0.000	***	***	0.095	0.233	0.000	***	***
DE		2.7	0.96	0.56	0.15	0.06				0.068	0.154			
Mediana		8.5	0	4.16	0.64	0.82				0.099	0.251			
Mínimo		5	0	3.07	0.35	0.68				0	0.069			
Máximo		12	3	4.85	0.82	0.89				0.222	0.545			

n=número de muestras, Na=número de alelos, AP= alelos privados, Ra=riqueza alélica, Ho=heterocigosidad observada, He=heterocigosidad esperada, EHW= Equilibrio de Hardy-Weinberg, F(n)=frecuencia de alelos nulos, F<sub>IS</sub>=Coeficiente de endogamia, P-valor de significancia: \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ).

**Tabla 11.** Parámetros genéticos estimados para los diez loci en la localidad de Punta El Soldado.

Locus	N	Na	AP	Ra	Ho	He	P-valor EHW	EHW sin corrección	EHW con c. Bonferroni	F (n)	F <sub>IS</sub>	P-valor F <sub>IS</sub>	P sin corrección	P con c. Bonferroni
<i>NsubA004</i>	8	7	1	3.99	0.50	0.75	0.020	*	ns	0.158	0.391	0.024	*	ns
<i>NsubA208</i>	8	4	0	3.09	0.50	0.67	0.136	ns	ns	0.089	0.317	0.156	ns	ns
<i>NsubC205</i>	8	3	0	2.00	0.25	0.32	0.200	ns	ns	0	0.282	0.201	ns	ns
<i>NsubC261</i>	7	7	0	4.52	0.57	0.83	0.074	ns	ns	0.170	0.377	0.033	*	ns
<i>NsubA249</i>	8	9	1	4.95	0.75	0.87	0.218	ns	ns	0.066	0.200	0.116	ns	ns
<i>NsubA245</i>	8	5	0	3.41	0.75	0.70	0.359	ns	ns	0	0.000	0.654	ns	ns
<i>NsubA235</i>	8	7	0	4.46	1.00	0.83	0.889	ns	ns	0	-0.143	1.000	ns	ns
<i>NsubA005</i>	8	6	1	4.03	0.88	0.79	0.449	ns	ns	0	-0.043	0.748	ns	ns
<i>NsubA1G09</i>	8	6	0	4.23	0.50	0.81	0.031	*	ns	0.168	0.434	0.015	*	ns
<i>NsubA1F03</i>	7	6	0	4.17	0.71	0.80	0.199	ns	ns	0.073	0.178	0.263	ns	ns
Promedio		6	0.3	3.88	0.64	0.74	0.010	*	*	0.072	0.196	0.000	***	***
DE		1.7	0.48	0.85	0.22	0.16				0.072	0.200			
Mediana		6	0	4.10	0.64	0.79				0.070	0.241			
Mínimo		3	0	2.00	0.25	0.32				0	-0.143			
Máximo		6	1	4.95	1.00	0.87				0.170	0.434			

n=número de muestras, Na=número de alelos, AP= alelos privados, Ra=riqueza alélica, Ho=heterocigosidad observada, He=heterocigosidad esperada, EHW= Equilibrio de Hardy-Weinberg, F(n)=frecuencia de alelos nulos, F<sub>IS</sub>=Coeficiente de endogamia, P-valor de significancia: \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ).



**Tabla 12.** Parámetros genéticos estimados para los diez loci en la localidad de Bahía de las Ánimas.

Locus	N	Na	AP	Ra	Ho	He	P-valor EHW	EHW sin corrección	EHW con c. Bonferroni	F (n)	F <sub>IS</sub>	P-valor F <sub>IS</sub>	P sin corrección	P con c. Bonferroni
<i>NsubA004</i>	13	10	0	4.75	0.92	0.87	0.769	ns	ns	0	-0.021	0.745	ns	ns
<i>NsubA208</i>	14	4	0	2.81	0.29	0.62	0.004	*	**	0.208	0.565	0.003	**	**
<i>NsubC205</i>	14	6	0	3.36	0.29	0.71	0.000	***	***	0.246	0.623	0.000	***	***
<i>NsubC261</i>	13	8	1	4.15	0.69	0.81	0.300	ns	ns	0.093	0.179	0.123	ns	ns
<i>NsubA249</i>	13	9	1	4.62	0.77	0.86	0.104	ns	ns	0.072	0.146	0.145	ns	ns
<i>NsubA245</i>	14	6	0	3.87	0.64	0.79	0.341	ns	ns	0.08	0.223	0.085	ns	ns
<i>NsubA235</i>	13	8	0	4.39	0.39	0.84	0.000	***	***	0.313	0.57	0.000	***	***
<i>NsubA005</i>	14	7	0	3.77	0.79	0.78	0.657	ns	ns	0	0.024	0.538	ns	ns
<i>NsubA1G09</i>	13	12	3	4.81	0.62	0.87	0.002	**	**	0.163	0.331	0.002	**	**
<i>NsubA1F03</i>	11	8	1	4.42	0.55	0.84	0.005	**	ns	0.209	0.388	0.006	**	ns
Promedio		7.8	0.6	4.10	0.59	0.80	0.000	***	***	0.138	0.294	0.000	***	***
DE		2.3	0.97	0.65	0.22	0.08				0.106	0.231			
Mediana		8	0	4.27	0.63	0.82				0.128	0.277			
Mínimo		4	0	2.81	0.29	0.62				0	-0.021			
Máximo		12	3	4.81	0.92	0.87				0.313	0.623			

n=número de muestras, Na=número de alelos, AP= alelos privados, Ra=riqueza alélica, Ho=heterocigosidad observada, He=heterocigosidad esperada, EHW= Equilibrio de Hardy-Weinberg, F(n)=frecuencia de alelos nulos, F<sub>IS</sub>=Coeficiente de endogamia, P-valor de significancia: \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ).

**Tabla 13.** Parámetros genéticos estimados para los diez loci en la localidad de San Francisquito.

Locus	N	Na	AP	Ra	Ho	He	P-valor EHW	EHW sin corrección	EHW con c. Bonferroni	F (n)	F <sub>IS</sub>	P-valor F <sub>IS</sub>	P sin corrección	P con c. Bonferroni
<i>NsubA004</i>	5	6	0	4.50	0.80	0.80	0.149	ns	ns	0	0.111	0.457	ns	ns
<i>NsubA208</i>	5	2	0	2.00	0.00	0.48	0.048	*	ns	0.327	1.000	0.048	*	ns
<i>NsubC205</i>	5	4	0	3.19	0.20	0.66	0.010	**	ns	0.267	0.750	0.010	*	ns
<i>NsubC261</i>	5	4	1	3.60	0.40	0.72	0.061	ns	ns	0.210	0.529	0.061	ns	ns
<i>NsubA249</i>	5	4	0	3.19	0.20	0.66	0.010	**	ns	0.267	0.750	0.009	**	ns
<i>NsubA245</i>	5	5	0	3.67	1.00	0.68	1.000	ns	ns	0	-0.379	1.000	ns	ns
<i>NsubA235</i>	4	4	0	3.25	0.50	0.56	0.428	ns	ns	0	0.250	0.426	ns	ns
<i>NsubA005</i>	5	5	0	3.93	0.60	0.74	0.085	ns	ns	0.086	0.294	0.187	ns	ns
<i>NsubA1G09</i>	3	3	0	3.00	0.67	0.67	0.467	ns	ns	0	0.200	0.461	ns	ns
<i>NsubA1F03</i>	4	3	0	2.71	0.75	0.53	1.000	ns	ns	0	-0.286	1.000	ns	ns
Promedio		4	0.1	3.30	0.51	0.65	0.003	**	**	0.116	0.327	0.001	***	***
DE		1.2	0.32	0.69	0.31	0.10				0.136	0.447			
Mediana		4	0	3.22	0.55	0.66				0.043	0.272			
Mínimo		2	0	2.00	0.00	0.48				0.000	-0.379			
Máximo		6	1	4.50	1.00	0.80				0.327	1.000			

n=número de muestras, Na=número de alelos, AP= alelos privados, Ra=riqueza alélica, Ho=heterocigosidad observada, He=heterocigosidad esperada, EHW= Equilibrio de Hardy-Weinberg, F(n)=frecuencia de alelos nulos, F<sub>IS</sub>=Coeficiente de endogamia, P-valor de significancia: \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ).

**Tabla 14.** Parámetros genéticos estimados para los diez loci en la localidad de Isla Natividad.

Locus	N	Na	AP	Ra	Ho	He	P-valor EHW	EHW sin corrección	EHW con c. Bonferroni	F (n)	F <sub>IS</sub>	P-valor F <sub>IS</sub>	P sin corrección	P con c. Bonferroni
<i>NsubA004</i>	5	6	0	4.50	0.60	0.80	0.150	ns	ns	0.105	0.351	0.093	ns	ns
<i>NsubA208</i>	5	3	0	2.86	0.00	0.64	0.010	**	ns	0.391	1.000	0.010	*	ns
<i>NsubC205</i>	5	6	0	4.26	0.60	0.76	0.049	*	ns	0	0.314	0.124	ns	ns
<i>NsubC261</i>	5	6	0	4.50	0.80	0.80	0.618	ns	ns	0	0.111	0.454	ns	ns
<i>NsubA249</i>	5	5	0	4.17	0.40	0.78	0.060	ns	ns	0.223	0.568	0.022	*	ns
<i>NsubA245</i>	5	4	0	3.07	0.40	0.58	0.238	ns	ns	0.133	0.407	0.141	ns	ns
<i>NsubA235</i>	5	4	0	3.17	0.40	0.64	0.143	ns	ns	0.122	0.467	0.145	ns	ns
<i>NsubA005</i>	5	3	0	2.73	0.00	0.56	0.016	*	ns	0.366	1.000	0.016	*	ns
<i>NsubA1G09</i>	5	5	0	4.00	0.40	0.76	0.035	*	ns	0.203	0.556	0.028	*	ns
<i>NsubA1F03</i>	5	5	0	3.67	0.60	0.68	0.238	ns	ns	0	0.226	0.301	ns	ns
Promedio		4.7	0	3.69	0.42	0.70	0.000	***	***	0.154	0.500	0.000	***	***
DE		1.2	0	0.69	0.26	0.09				0.143	0.298			
Mediana		5	0	3.83	0.40	0.72				0.128	0.437			
Mínimo		3	0	2.73	0.00	0.56				0	0.111			
Máximo		6	0	4.50	0.80	0.80				0.391	1			

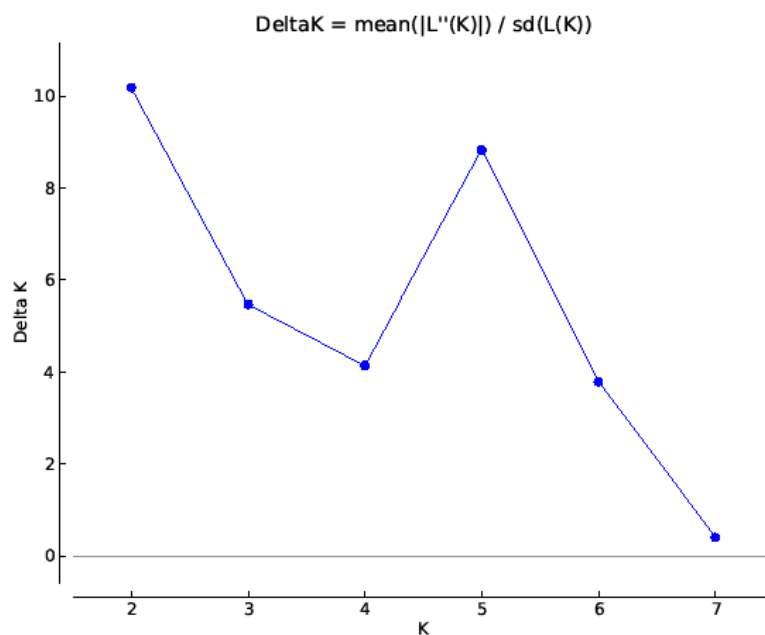
n=número de muestras, Na=número de alelos, AP= alelos privados, Ra=riqueza alélica, Ho=heterocigosidad observada, He=heterocigosidad esperada, EHW= Equilibrio de Hardy-Weinberg, F(n)=frecuencia de alelos nulos, F<sub>IS</sub>=Coeficiente de endogamia, P-valor de significancia: \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ).

**Tabla 15.** Parámetros genéticos estimados para los diez loci en el lote de juveniles (F1ANI).

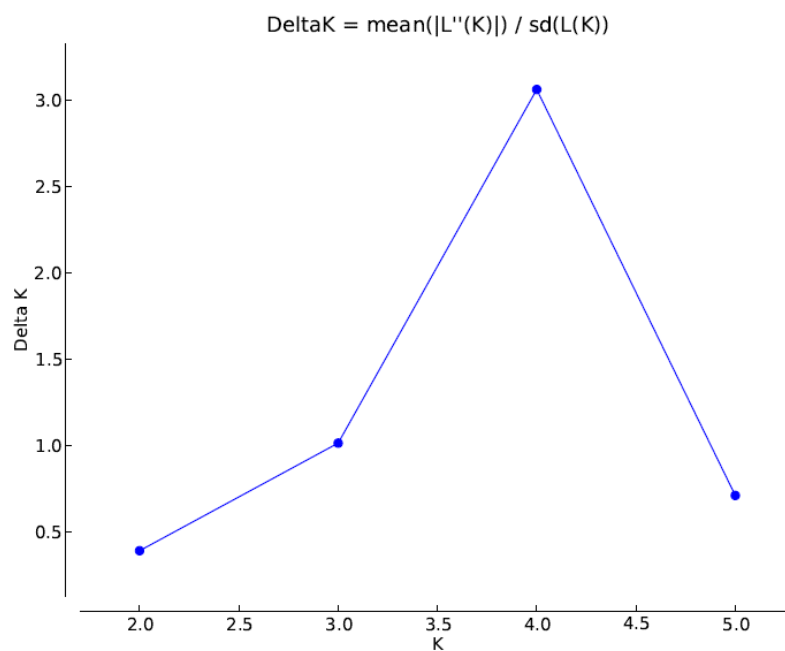
Locus	N	Na	AP	Ra	Ho	He	P-valor EHW	EHW sin corrección	EHW con c. Bonferroni	F (n)	F <sub>IS</sub>	P-valor F <sub>IS</sub>	P sin corrección	P con c. Bonferroni
<i>NsubA004</i>	27	7	0	3.57	0.52	0.76	0.001	***	***	0.125	0.333	0.002	*	**
<i>NsubA208</i>	27	9	5	3.83	0.33	0.78	0.000	***	***	0.250	0.583	0.000	***	***
<i>NsubC205</i>	25	6	0	2.67	0.24	0.58	0.000	***	***	0.315	0.599	0.000	***	***
<i>NsubC261</i>	24	9	2	3.90	0.83	0.79	0.409	ns	ns	0	-0.033	0.727	ns	ns
<i>NsubA249</i>	26	8	2	4.02	0.54	0.81	0.000	***	***	0.207	0.352	0.000	***	***
<i>NsubA245</i>	27	8	1	3.87	0.44	0.79	0.000	***	***	0.192	0.455	0.000	***	***
<i>NsubA235</i>	27	8	1	3.80	0.78	0.78	0.777	ns	ns	0	0.022	0.492	ns	ns
<i>NsubA005</i>	27	11	3	4.23	0.82	0.83	0.049	*	ns	0.021	0.039	0.392	ns	ns
<i>NsubA1G09</i>	26	10	0	4.44	0.85	0.86	0.321	ns	ns	0	0.034	0.412	ns	ns
<i>NsubA1F03</i>	24	9	1	4.48	0.38	0.86	0.000	***	***	0.359	0.580	0.000	***	***
Promedio		8.5	1.5	3.88	0.57	0.78	0.000	***	***	0.147	0.296	0.000	***	***
DE		1.4	1.58	0.52	0.23	0.08				0.138	0.259			
Mediana		8.5	1	3.89	0.53	0.79				0.159	0.343			
Mínimo		6	0	2.67	0.24	0.58				0	-0.033			
Máximo		11	5	4.48	0.85	0.86				0.359	0.599			

n=número de muestras, Na=número de alelos, AP= alelos privados, Ra=riqueza alélica, Ho=heterocigosidad observada, He=heterocigosidad esperada, EHW= Equilibrio de Hardy-Weinberg, F(n)=frecuencia de alelos nulos, F<sub>IS</sub>=Coeficiente de endogamia, P-valor de significancia: \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ).

## Anexo II

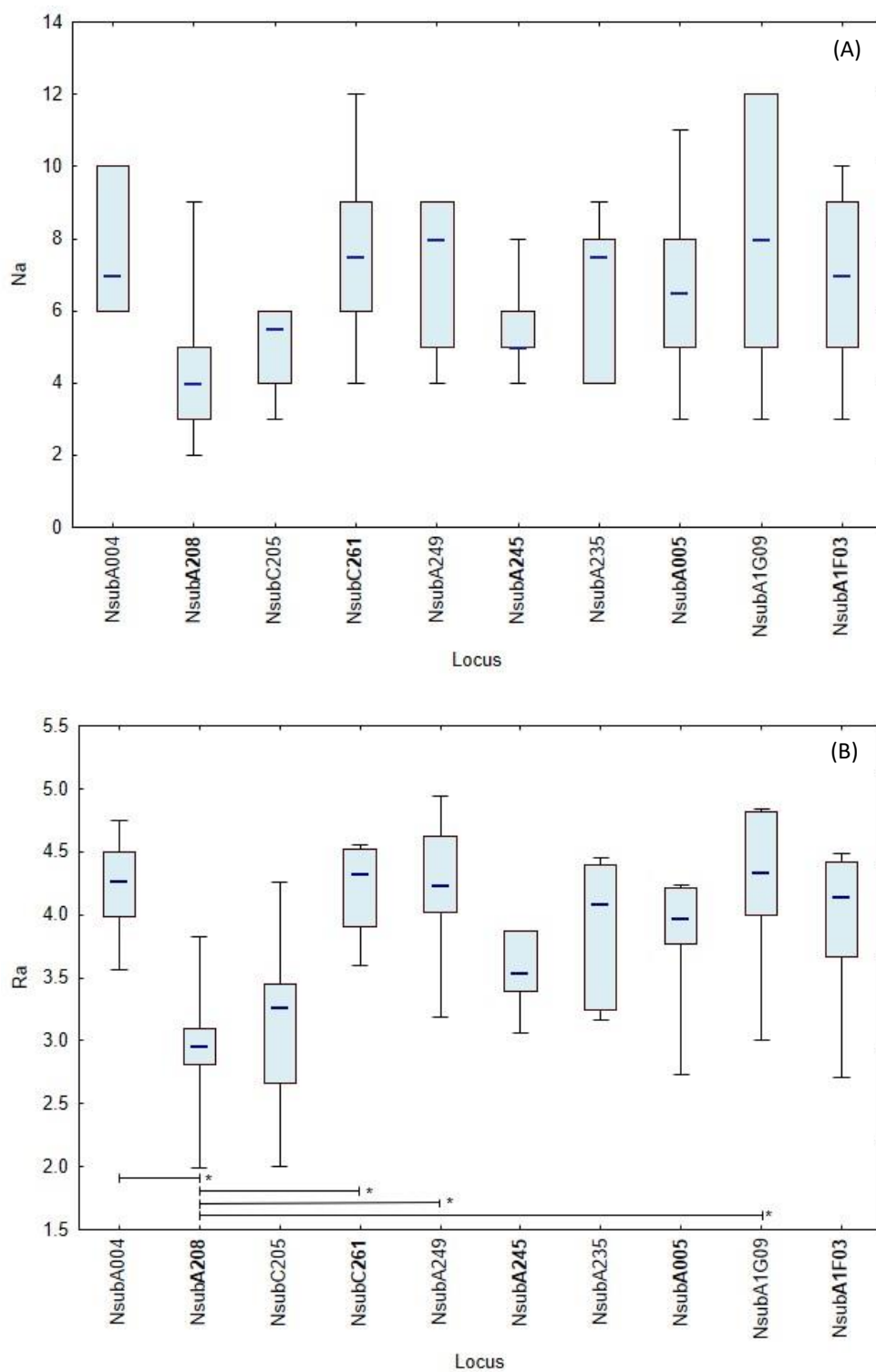


**Figura 16.** Delta k obtenida mediante la prueba de Evanno, que indica el número más probable de componentes genéticos ( $K = 2$ ) para las muestras silvestres y de cultivo con diez loci microsatélite.

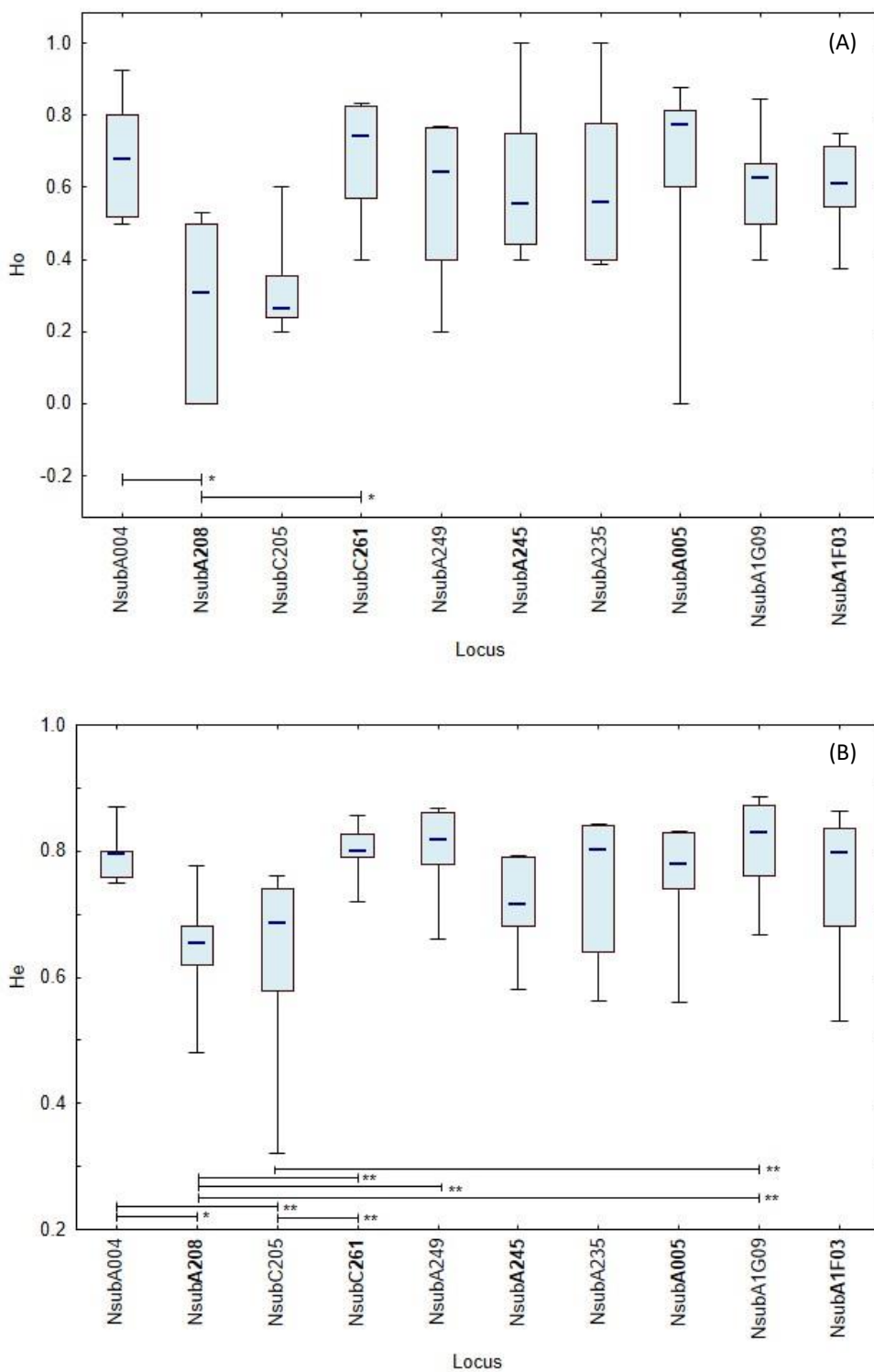


**Figura 17.** Delta k obtenida mediante la prueba de Evanno, que indica el número más probable de componentes genéticos ( $K = 4$ ) para las muestras silvestres dentro del GC con ocho loci microsatélite.

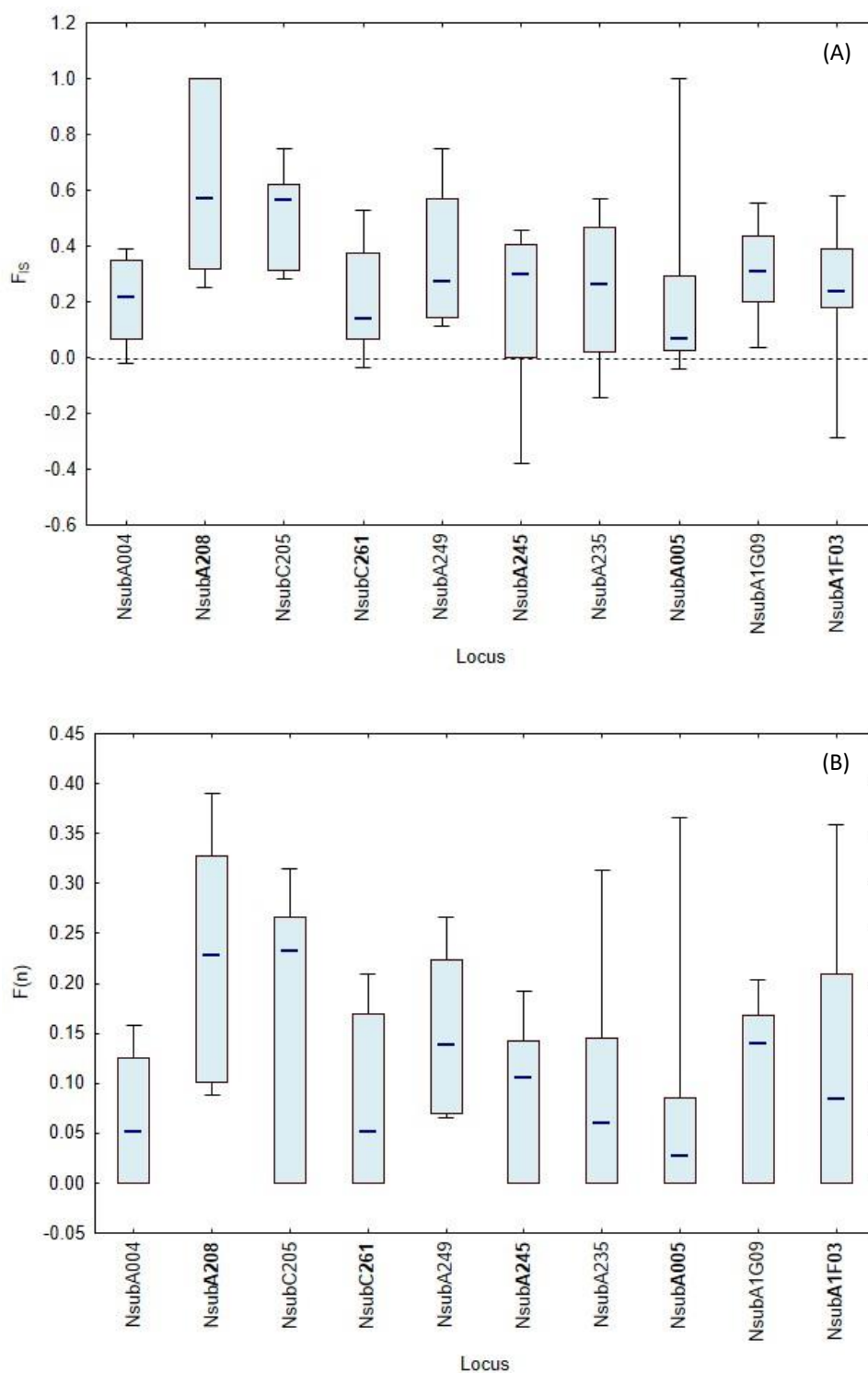
## Anexo III



**Figura 18.** Número de alelos (A) y riqueza alélica (B) por microsatélite (diez loci). Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana. Con las barras horizontales inferiores se representa el valor de significancia [ $*(p<0.05)$ ,  $** (p<0.01)$ ,  $*** (p<0.001)$ ].

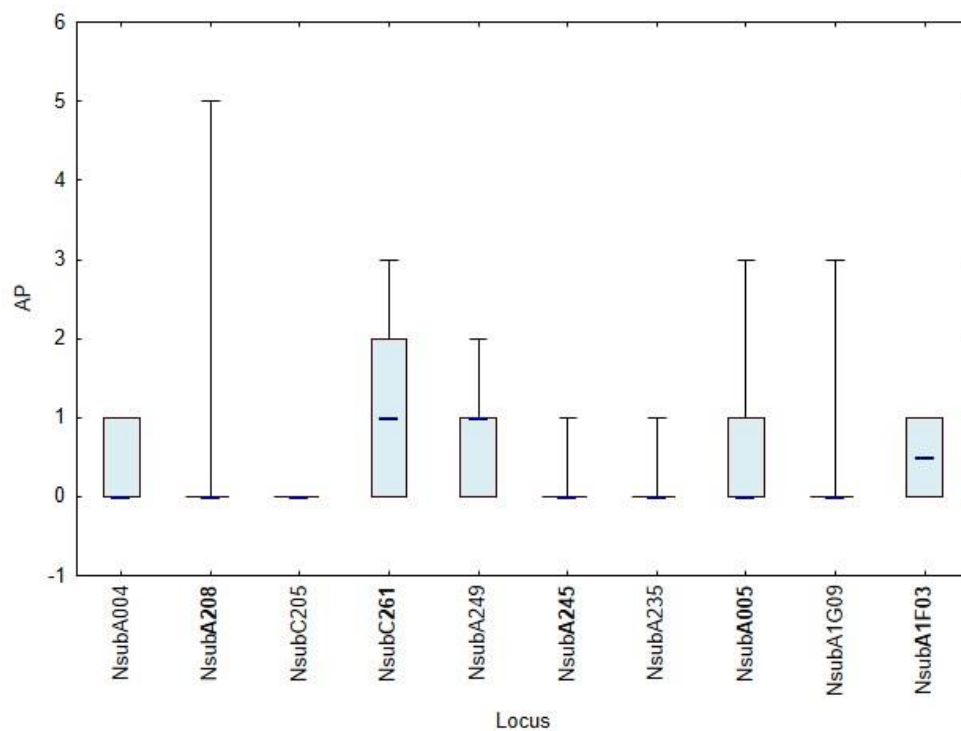


**Figura 19.** Heterocigosidad observada (A) y esperada (B) por microsatélite (diez loci). Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana. Con las barras horizontales inferiores se representa el valor de significancia [ $*$ ( $p < 0.05$ ),  $**$ ( $p < 0.01$ ),  $***$ ( $p < 0.001$ )].



**Figura 20.** Coeficiente de endogamia (A) y frecuencia de alelos nulos (B) por microsatélite (diez loci). Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana.





**Figura 21.** Número de alelos privados (AP) por microsatélite (diez loci). Las cajas son los percentiles: 25 y 75%, los bigotes representan los valores máximos y mínimos y el guion dentro de las cajas indica la mediana.