

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



**Maestría en Ciencias
en Acuicultura**

**Diversidad genética de poblaciones naturales y de cultivo de
abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en localidades de California
y Baja California.**

Tesis

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

Presenta:

Paola Estrella Córdova Secundino

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por

Paola Estrella Córdova Secundino

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz
Directora de tesis

Dr. Miguel Ángel del Rio Portilla

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Dr. Arturo Serrano Santoyo

M.C. Carmen Elvira Vargas Peralta



Dr. Jorge Cáceres Martínez
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Paola Estrella Córdova Secundino © 2018

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

Resumen de la tesis que presenta **Córdova Secundino Paola Estrella**, como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Acuicultura.

Diversidad genética de poblaciones naturales y de cultivo de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en localidades de California y Baja California

Resumen aprobado por:

Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz
Directora de tesis

Los abulones son moluscos gasterópodos marinos residentes de zonas costeras asociados a mantos algales. Dentro de las cinco especies de abulón explotadas en México, el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) es la única especie que cuenta con la biotecnología de cultivo completamente desarrollada. En México, existe evidencia de que las poblaciones naturales de abulón se encuentran en deterioro. Además, se desconoce el estado genético del recurso y no existen programas de crianza selectiva en cultivo. Por lo cual, es fundamental conocer el estado genético de las localidades silvestres para favorecer su conservación y mejorar la producción en cautiverio. El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética de *H. rufescens* en seis localidades silvestres (cuatro procedentes de California y dos de Baja California); y cinco lotes de cultivo producidos en granjas mexicanas. Para lo cual, un total de 453 muestras fueron genotipificadas con diez marcadores microsatélites especie-específicos y usadas para estimar los parámetros genéticos con diversos programas. La mayor diversidad genética, en términos de riqueza alélica y heterocigosidad observada, se encontró en las muestras silvestres; dentro de las cuales Van Damme 1999, San Miguel Island 2007 y Santo Tomás 2014 obtuvieron los valores más altos. Como era de esperarse, el valor promedio de riqueza alélica fue significativamente menor y el coeficiente de endogamia significativamente mayor en los lotes de cultivo, al ser comparados con las localidades silvestres. Respecto al Equilibrio de Hardy-Weinberg todas las localidades se encontraron en desequilibrio, relacionado con un déficit de heterocigotos. Los resultados muestran panmixia solamente en la localidad silvestre de Santo Tomás 2014 ($F_{IS} = 0.074$); el resto presentó endogamia moderada (0.326-0.508). Todas las comparaciones pareadas del índice de fijación (F_{ST}) fueron significativas, con valores bajos a moderados (0.062-0.254); con las mayores diferencias entre los lotes de cultivo. En todas las muestras se observan tres componentes genéticas con el análisis de STRUCTURE. En las localidades silvestres, una de las componentes se observó con bajo porcentaje de representación (<0.7%); mientras que, las otras dos componentes permitieron agrupar las muestras silvestres en dos grupos bien definidos. Esta agrupación coincide con los resultados del dendrograma de relaciones genéticas (grupo 1: CCY99-SMI07-SPT11-STT14; grupo2: VDM99-VDM07-PSJ16). Cuatro de los lotes de cultivo, correspondieron a la componente del grupo 2. Por otra parte, el lote PMB14 estuvo representado un 99.5% por la componente que tuvo bajo porcentaje dentro de las localidades silvestres. Lo anterior, evidencia el efecto de las prácticas acuícolas sobre la diversidad genética de los recursos pesqueros.

Palabras clave: *Haliotis rufescens*, microsatélites, diversidad genética, localidades silvestres, lotes de cultivo.

Abstract of the thesis presented by Paola Estrella Córdova Secundino, as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Aquaculture.

Genetic diversity of natural populations and culture of red abalone (*Haliotis rufescens*) in localities of California and Baja California

Abstract approved by:

Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz

The abalones are marine gastropods mollusks residents from the coasts, habitats related to algae mantles. For the five species of abalone in fishery in Mexico, the red abalone (*H. rufescens*) is the only specie with biotechnical methods entirely development for their production. In Mexico there is evidence that the abalone's populations are in decline in their genetic diversity. Furthermore the genetic status of wild resource in Mexico is unknown and a breeding program in farms doesn't exist. For this reasons the knowledge over the genetic status of localities is a key point to improve the conservation and exploitation in cautivity of resource. The aim of the present work was evaluate the genetic diversity of *H. rufescens* in six natural localities (five from California and two from Baja California) and five broodstocks from Mexican farms. A total of 453 samples were genotyped with ten species-specific microsatélite markers to estimate the genetic parameters with different computational programs. The highest value of genetic diversity in terms of allelic richness and observed heterocigocity was the samples that coming from wild localities, within these ones, the Van Damme 1999, San Miguel Island 2007 and Santo Tomás 2014 get the top values. In concordance with the predicted, the mean value of allelic richness was significantly low and the endogamic coefficient was significantly higher in the broodstocks, when was compared with the wild localities. Respect to Hardy-Weinberg equilibrium, all the localities was observed in disequilibrium, related with a heterocytogous deficit. The results shows panmixia only in the wild localities of Santo Tomás 2014 ($FIS = 0.074$); and the rest present a moderate endogamia (0.326-0.508). All the pair-wise comparisons of fixation index were significant, with moderately low values (0.062-0.254); with greater differences within broodstocks. In all the samples tree genetic components was observed with the STRUCTURE analysis. In the wild localities one of that components was low represented (<0.7%) while, the other components enable the grouping of sample in two well defined groups. This aggrupation match with the results of genetic relationship dendogram (group 1: CCY99-SMI07-SPT11-STT14; group 2: VDM99-VDM07-PSJ16).. Four of the broodstocks, correspond to group 2 component. In the other hand the PMB14 lot was represented in 99.5% for the component that has a low percentage in the wild localities. Above mentioned, is an evidence of the effect of aquaculture practices over the genetic diversity of fishery resources.

Keywords: *Haliotis rufescens*, microsatellite markers, genetic diversity, natural populations.

Dedicatoria

A la familia y seres queridos.

A las personas que se fueron, para nunca más volver.

A las frías noches estrelladas, llenas de dolor y melancolía.

A la tristeza, la soledad, al amor y el olvido.

La ciencia no es perfecta, con frecuencia se utiliza mal
No es más que una herramienta, pero es la mejor herramienta que tenemos
Se corrige así misma, está siempre evolucionando y se puede aplicar a todo
Con esta herramienta conquistamos lo imposible
-Carl Sagan

Agradecimientos

Por concederme una beca de posgrado para culminar este proyecto de tesis, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Por brindarme la oportunidad de aprender y desarrollar una maestría, agradezco al Centro de Educación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), especialmente a todos los miembros que laboran en el departamento de Acuicultura, por su apoyo y accesibilidad.

Agradezco a todos los miembros de este comité de tesis por aceptar este compromiso y ayudarme a cumplirlo.

Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz, agradezco haber sido su estudiante ya que con ella conocí la acuicultura. Gracias por contagiarme su pasión por la ciencia, por permitirme seguir aprendiendo de usted y con usted, mil gracias por mostrarme lo que es ser una mujer de ciencia y brindarme la oportunidad de desarrollar esta tesis y superar mis expectativas. Al Dr. Miguel Ángel del Río Portilla por su constante enseñanza, su pasión por transmitir conocimiento y motivarnos a aprender. A M.C. Carmen Elvira Vargas Peralta por brindarme su conocimiento dentro y fuera del laboratorio.

Gracias a todos mis compañeros, por brindarme grandes momentos durante mi estancia en la maestría. Especialmente a Brenda, Karina, Laura y Maleny ya que cada una a su manera me enseñó a dar y recibir amistad.

Tabla de contenido

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 <i>Haliotis</i> sp.	1
1.2 Pesquería de abulón en California, EUA.....	2
1.3 Pesquería de abulón en Baja California, México.....	3
1.4 Áreas y bancos de pesca.....	6
1.5 Abulón rojo (<i>Haliotis rufescens</i>).....	7
1.6 Producción acuícola de abulón rojo.....	8
1.7 Evaluación de la diversidad genética.....	10
1.8 Marcadores moleculares microsatélite (SSR).....	11
1.9 Microsatélites en abulón.....	12
1.10 Justificación.....	13
1.11 Hipótesis.....	14
1.12 Objetivos.....	15
1.12.1 Objetivo General.....	15
1.12.2 Objetivos particulares.....	15
Capítulo 2. Materiales y Métodos.....	16
2.1 Obtención, preservación y manejo de material biológico.....	16
2.2 Obtención y evaluación de DNA genómico.....	19
2.3 Amplificación de marcadores microsatélites.....	19

2.4 Asignación de genotipos.....	21
2.5 Cálculo de parámetros genéticos poblacionales.....	22
2.5.1 Diversidad genética	22
2.5.2 Estructura genética entre localidades	22
2.6 Análisis estadístico	23
 Capítulo 3. Resultados.....	 25
3.1 Obtención y evaluación de DNA genómico	25
3.2 Amplificación de marcadores microsatélites.....	26
3.3 Rangos alélicos y matrices de genotipos	27
3.4 Diversidad genética de <i>Haliotis rufescens</i> en localidades silvestres y lotes de cultivo	29
3.4.1 Diversidad genética por localidad	29
3.4.2 Diversidad genética de poblaciones silvestres vs lotes de cultivo	34
3.5 Diferenciación genética de <i>H. rufescens</i> en localidades silvestres y lotes de cultivo	35
3.6 Estructura genética poblacional de <i>Haliotis rufescens</i> en poblaciones silvestres y lotes de cultivo	36
3.7 Relaciones genéticas entre localidades silvestres.....	40
3.8 Relaciones genéticas entre lotes de cultivo.....	41
3.8 Migración genética	42
 Capítulo 4. Discusión.....	 44
4.1 Parámetros genéticos poblacionales.....	44
4.2 Diferenciación genética	49
4.3 Análisis de estructura genética	49
4.4 Migración y flujo genético	50
4.5 Recomendaciones	52
 Capítulo 5. Conclusiones	 54
Literatura citada	55

Anexos.....62

 Anexo A62

 Anexo B63

 Anexo C.....64

 Anexo D66

 Anexo E.....77

 Anexo F.....81

Lista de figuras

- Figura 1. Producción pesquera anual por captura de abulón en California, EUA. Recopilación de anuarios de Departamento de Pesca y Vida silvestre de California (*California Department of Fish and Wildlife*). 2
- Figura 2. Producción pesquera anual por captura de las diferentes especies de abulón en California, EUA. Línea roja: *H. rufescens*; línea rosa: *H. corrugata*; línea verde: *H. fulgens*; línea negra: *H. cracherodii*; línea gris: *H. sorenseni*. Recopilación del Departamento de Pesca y Vida silvestre de California (*California Department of Fish and Wildlife*). 3
- Figura 3. Producción pesquera anual por captura de abulón en México, representado el peso vivo en toneladas. Recopilación de Carta Nacional Pesquera y bases de Anuarios Estadísticos de Acuicultura y Pesca. 5
- Figura 4. Zonas de pesca de abulón (NOM-009-SAG/PESC-2015). 7
- Figura 5. Producción por acuicultura de abulón rojo en México, representando en el eje primario la producción de peso vivo en toneladas representado por las barras azules y en el eje secundario el valor de la producción en pesos mexicanos representados por la línea azul. Recopilado de los Anuarios de Acuicultura y Pesca. 9
- Figura 6. Producción acuícola de abulón rojo, *H. rufescens* en toneladas, reportada por la FAO para México y recopilación de los Anuarios Estadísticos de Pesca de Sernapesca de Chile (2016). Barra azul representa la producción chilena y la barra roja la producción mexicana. 9
- Figura 7. Distribución geográfica de las localidades muestreadas, localidades naturales en color azul y en color rosa las localidades de cultivo.18
- Figura 8. Concentraciones de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) e índices de pureza en función de las razones a) 260/280 para detectar contaminación por proteínas y b) 260/230 para fenoles. Puntos en color negro representan las muestras procesadas con el protocolo de sales y en color rojo las extracciones utilizando el protocolo comercial. Las líneas punteadas indican los rangos de valores aceptables para cada razón.....26
- Figura 9. Productos de amplificación del microsatélite Hr34 en la localidad PSJ16, visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en SB 1X a 80 volts por 55 minutos, cargando $3\mu\text{l}$ de producto de PCR con $2\mu\text{l}$ de Gel Red 2X, utilizando escalera Invitrogen™ de 100pb. ...27
- Figura 10. Producto de amplificación del microsatélite Hr2 en la localidad PSJ16, visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en SB 1X a 80 volts por 60 minutos, cargando $3\mu\text{l}$ de producto de PCR con $2\mu\text{l}$ de Gel Red 2X, utilizando escalera Sigma™ de 50pb.27
- Figura 11. Valores promedio en el número de alelos (Na) en 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con diez marcadores microsatélite, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$ 31

- Figura 12. Valores promedio en la riqueza alélica (R_a) en 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con diez marcadores microsatélite, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$ 31
- Figura 13. Valores promedio del número de alelos efectivos (N_e) en 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con diez marcadores microsatélite, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$ 32
- Figura 14. Valores promedio del número de a) heterocigosidad observada (H_o) y b) heterocigosidad esperada (H_e) en 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con diez marcadores microsatélite, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$ 33
- Figura 15. Valores promedio del coeficiente de endogamia (F_{IS}) en 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con diez marcadores microsatélite, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$ 33
- Figura 16. Comparación en a) número de alelos (N_a) y b) riqueza alélica (R_a) promedio entre localidades silvestres y lotes de cultivo de *H. rufescens*, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$ 34
- Figura 17. Comparación en a) Heterocigosidad observada (H_o) y b) coeficiente de endogamia (F_{IS}) promedio entre localidades silvestres y lotes de cultivo de *H. rufescens*, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$35
- Figura 18. Estimación del número de poblaciones sugeridos por STRUCTURE HARVESTER para las localidades de *H. rufescens* analizadas derivado de Δk para K de 1 a 14 posibles poblaciones.36
- Figura 19. Componentes genéticas de 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con K=2, los componente se representan por un color (rojo y verde), donde cada barra vertical constituye a un individuo y la proporción del color representa la cantidad de cada componente dentro del individuo.....37
- Figura 20. Componentes genéticas de once localidades de *H. rufescens* analizadas con K=2, los componente se representan por un color (rojo y verde), donde cada barra vertical constituye a un individuo y la proporción del color representa la cantidad de cada componente dentro del individuo.....38
- Figura 21. Componentes genéticas de 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con K=3, los componente se representan por un color (verde, azul y rojo), donde cada barra vertical representa a un individuo y la proporción del color representa la cantidad de cada componente dentro del individuo.....38

Figura 22. Relaciones genéticas entre poblaciones silvestres de <i>Haliotis rufescens</i> usando un dendrograma basado en distancias genéticas geométricas de Cavalli-Sforza y el método del vecino más cercano.	41
Figura 23. Relaciones genéticas entre localidades de cultivo de <i>Haliotis rufescens</i> usando un dendrograma basado en distancias geométricas de Cavalli-Sforza y el método del vecino más cercano, realizado con 8,000 simulaciones.	42
Figura 24. Migración de individuos por generación representada por números en color blanco, las flechas rojas indican el flujo y distancias geográficas en kilómetros entre los puntos en color amarillo.	43
Figura 25. Frecuencias alélicas del locus Hr1 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (<i>H. rufescens</i>).	66
Figura 26. Frecuencias alélicas del locus Hr2 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (<i>H. rufescens</i>).	67
Figura 27. Frecuencias alélicas del locus Hr6 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (<i>H. rufescens</i>).	68
Figura 28. Frecuencias alélicas del locus Hr9 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (<i>H. rufescens</i>).	69
Figura 29. Frecuencias alélicas del locus Hr16 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (<i>H. rufescens</i>).	70
Figura 30. Frecuencias alélicas del locus Hr17 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (<i>H. rufescens</i>).	71
Figura 31. Frecuencias alélicas del locus Hr23 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (<i>H. rufescens</i>).	72
Figura 32. Frecuencias alélicas del locus Hr31 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (<i>H. rufescens</i>).	73
Figura 33. Frecuencias alélicas del locus Hr32 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (<i>H. rufescens</i>).	75
Figura 34. Frecuencias alélicas del locus Hr33 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (<i>H. rufescens</i>).	76
Figura 35. Riqueza alélica por locus evaluada en las doce localidades de <i>Haliotis rufescens</i>	81
Figura 36. Número de alelos por locus evaluada en las doce localidades de <i>Haliotis rufescens</i>	82
Figura 37. Heterocigosidad observada por locus evaluada en las doce localidades de <i>Haliotis rufescens</i>	82

Lista de tablas

Tabla 1. Localidades muestreadas, separadas por poblaciones naturales y de cultivo. Se especifica el año del muestreo, el código de etiqueta y el tamaño de muestra (N). * indica que las muestras son semilla de abulón.....	17
Tabla 2. Distancias geográficas calculadas en kilómetros, entre el muestreo de las localidades silvestres de abulón rojo (<i>H. rufescens</i>).....	17
Tabla 3. Descripción de los 16 marcadores microsatélites especie específicos de <i>H. rufescens</i> desarrollados por Aguilar-Espinoza <i>et al.</i> (2014) utilizados en este estudio.	20
Tabla 4. Número de alelos ausentes y nuevos obtenidos para las doce localidades de <i>H. rufescens</i> analizadas con los 16 microsatélites reportados por Aguilar-Espinoza <i>et al.</i> (2014).	28
Tabla 5. Número de alelos nuevos por locus y por localidad de <i>H. rufescens</i> analizadas con los diez marcadores microsatélites.	29
Tabla 6. Parámetros genéticos poblaciones promedio usando diez marcadores microsatélite en poblaciones silvestres y lotes de cultivo de abulón rojo (<i>Haliotis rufescens</i>) de California y Baja California.	30
Tabla 7. Análisis de diferenciación genética entre pares de localidades basados en el estimador F_{ST} , datos de las localidades silvestres resaltadas en negrita. Todos los valores son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).	36
Tabla 8. Porcentaje de los componentes genéticos principales dentro de las 12 localidades de <i>H. rufescens</i> , resaltando en negritas las localidades silvestres.	39
Tabla 9. Mezcla final de los reactivos para la amplificación por PCR de los fragmentos específicos de DNA para cada cebador, utilizando enzima Taq polimeraza Bio-Rad.	62
Tabla 10. Ejemplo de asignación de genotipos para cada individuo de la localidad de Punta San José 2016 utilizando los 16 cebadores, primer alelo (A1), segundo alelo (A2).	63
Tabla 11. Consenso de la amplificación de los cebadores utilizados para evaluar la diversidad genética de las doce localidades muestreadas de <i>Haliotis rufescens</i> . El número indica a los individuos que no amplificaron dentro de cada localidad por locus.	64
Tabla 12. Alelos nuevos encontrados por locus, representados por el tamaño de cada alelo en pares de bases (pb).	65
Tabla 13. Poblaciones de abulón rojo (<i>Haliotis rufescens</i>) colectadas de diferentes localidades, número de individuos analizados por localidad (n), número de alelos (N_a), alelos efectivos (N_e), heterocigotos observados (H_o), heterocigotos esperados (H_e), riqueza alélica (RA), Equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.05^*$) y coeficiente de endogamia (F_{IS}).	77

Tabla 14. Comparación del resultados obtenidos entre los 9 loci que comparten del presente estudio contra los resultados de Aguilar-Espinoza <i>et al.</i> , (2014), contenido de información polimórfica (PIC) y alelos nulos. Se agrega el locus Hr33 para posteriores análisis.....	81
--	----

Capítulo 1. Introducción

1.1 *Haliotis* sp.

Los abulones son moluscos gasterópodos marinos que habitan las zonas costeras, adheridos entre superficies rocosas y hábitats crípticos asociados a mantos algales, pastos marinos y otros individuos invertebrados bentónicos. Reconocidos por tener una concha gruesa habitualmente ovalada con una serie de orificios moderadamente elevados y alineados sobre la región de la cavidad respiratoria. La diversidad de colores y características de la concha permiten diferenciar las especies de abulón (Guzmán del Prío, 1994; Cifuentes Lemus, Torres-García y Frías Mondragón, 1997; INAPESCA, 2006).

Las diferentes especies de *Haliótidos* presentan una distribución costera vertical variada con cierto traslape, la mayoría son dioicas, con un desove anual y ciclos reproductivos estacionales. La diferenciación sexual puede ser observada en las gónadas de los organismos maduros, los machos presentan una gónada de color claro (crema a blanco) en cambio la gónada de las hembras es oscura (café o verde), la fecundación se produce cuando los individuos liberan sus gametos al medio, obteniendo como resultado una larva libre y nadadora. Transcurridos de 4 a 15 días las larvas exploran el fondo para comenzar la metamorfosis hacia postlarva (Cox, 1962; Mateus, 1986; SEPESCA-CIBNOR, 1994; Rios, 2005).

De las especies de abulón conocidas a nivel mundial, aproximadamente 25 son explotadas comercialmente y de éstas sólo 12 son cultivadas (Hahn, 1989; Ponce-Díaz, Sánchez-Hernández, e Yuen-Sánchez, 2003). América del Norte de manera natural se beneficia por la presencia de nueve especies de abulón, de las cuales siete se distribuyen desde California, EUA hasta Baja California Sur, México. En México cinco de éstas especies son extraídas del medio natural debido a su valor económico y sólo el abulón rojo (*Haliotis rufescens*) cuenta con la biotecnología en acuicultura comercial completamente desarrollada. La pesquería del abulón ostenta gran importancia, debido a que tanto el músculo del organismo como su concha pueden ser comercializados. Sin embargo la pesquería presentan una tendencia decreciente, esto ha sido observado en las diversas especies de abulón alrededor del mundo (FND, 2010; SAGARPA, 2012, 2013a).

1.2 Pesquería de abulón en California, EUA

En las costas de California la pesquería de abulón comenzó en 1850 con el arribo de migrantes chinos (Cox, 1962). La industria prosperó y en 1879 la extracción de abulón en California rebasó las 1,860 toneladas anuales, principalmente representada por las especies *Haliotis fulgens* y *Haliotis cracherodii*. Sin embargo, hasta 1880 se reconoce la posible sobreexplotación y se establece un consulado en San Diego que permite llevar registro de las actividades pesqueras, así mismo el gobierno mexicano empieza a expedir licencias para embarcaciones. En 1900, la disponibilidad del recurso se vio limitada por lo que se implementaron lineamientos y sanciones para los transgresores. En 1905 y 1909, se aprueban leyes que restringen la extracción de abulón a temporadas y una prohibición para la extracción de abulón negro y azul, respectivamente (Cox, 1962; Mateus, 1986; Braje *et al.*, 2007).

Aunque la pesquería de abulón tenía años de existir, fue hasta 1916 cuando se realizaron registros por el Departamento de Pesca y Vida silvestre de California (*California Department of Fish and Wildlife*). Para 1929, se estimó que las embarcaciones japonesas dominaban la extracción de abulón, en su mayoría dada por *H. rufescens*. (Cox, 1962). Sin embargo durante los años de la segunda guerra mundial, la pesquería se vio disminuida a 75 toneladas aproximadamente (Figura 1).

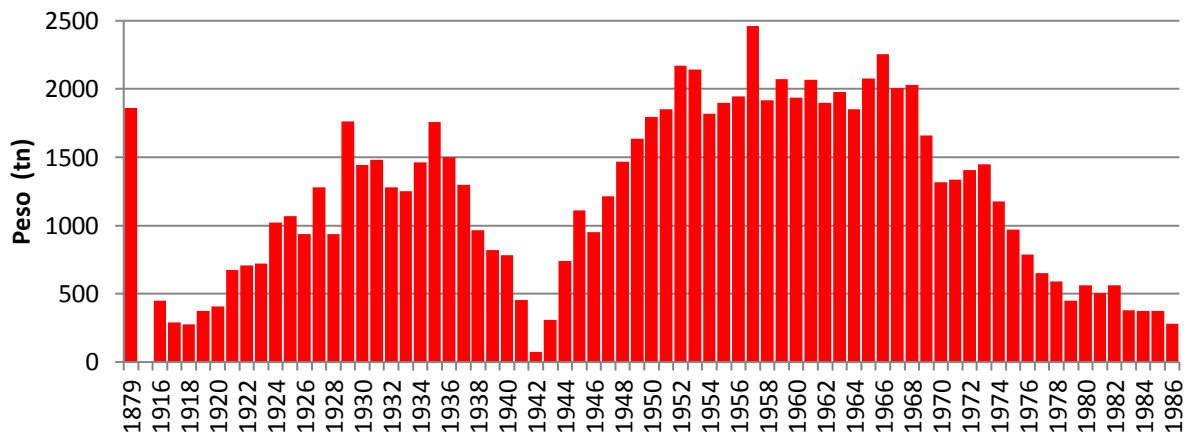


Figura 1. Producción pesquera anual por captura de abulón en California, EUA. Recopilación de anuarios de Departamento de Pesca y Vida silvestre de California (*California Department of Fish and Wildlife*).

En 1948, la pesquería de *H. corrugata* cobra relevancia y obtiene un volumen similar a la *Haliotis rufescens* y para 1952 supera la cantidad de extracción del abulón rojo; sin embargo, después de este año se observó una marcada disminución de los bancos naturales de *H. corrugata*, debido a la intensidad de pesca del recurso y a la disminución de la disponibilidad del alimento para ésta especie

(Figura 2). Sin embargo, aunque la extracción de *H. corrugata* fue muy importante para la producción, la pesca de *H. rufescens* fue el pilar de la industria abulonera en California (Cox, 1962).

Finalmente en 1980, debido a la presencia de la enfermedad denominada *síndrome del pie marchito* las poblaciones de abulón en California se vieron devastadas, lo cual obligó al gobierno a cerrar la pesquería del recurso (Braje *et al.*, 2007).

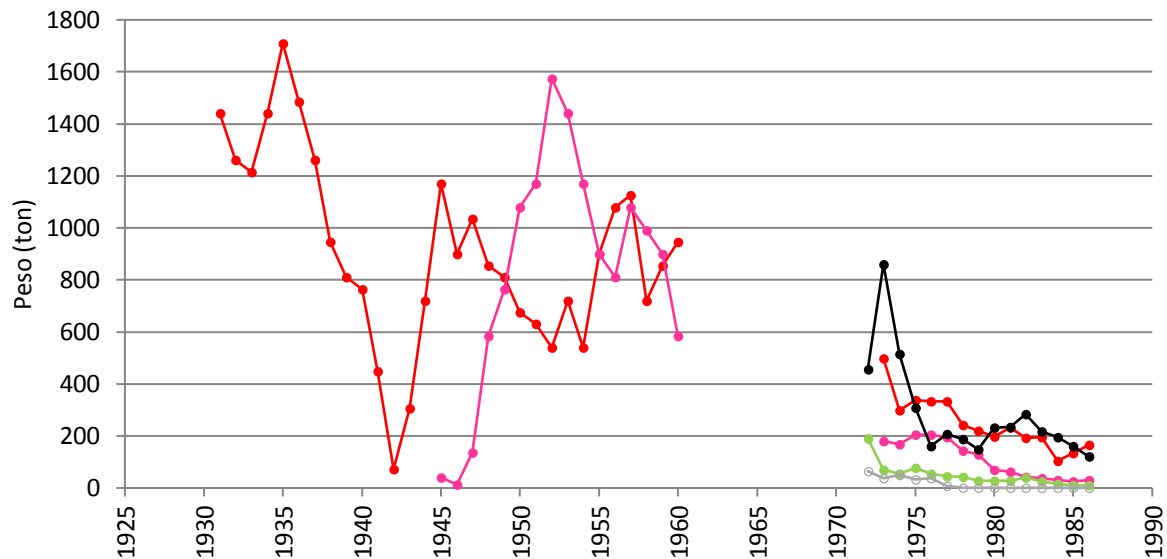


Figura 2. Producción pesquera anual por captura de las diferentes especies de abulón en California, EUA. Línea roja: *H. rufescens*; línea rosa: *H. corrugata*; línea verde: *H. fulgens*; línea negra: *H. cracherodii*; línea gris: *H. sorenseni*. Recopilación del Departamento de Pesca y Vida silvestre de California (*California Department of Fish and Wildlife*).

1.3 Pesquería de abulón en Baja California, México

En la península de Baja California la pesquería del abulón es una de las más antiguas, iniciada por migrantes chinos al igual que en California, aproximadamente diez años después (1860). Durante muchos años, la producción pesquera era enviada a San Diego, California, EUA para ser procesada y comercializada. Sin embargo, en 1929 el gobierno mexicano aprobó una ley que prohibía la exportación de abulón fresco, originando un aumento en la producción en México de 1,723 toneladas (3.8 millones de libras) a 3 356 toneladas (7.4 millones de libras) (Cox, 1962; Guzmán del Prío, 1994).

Tiempo después, en 1940, se inició la pesquería del recurso por sociedades cooperativas mexicanas y para 1947 el gobierno mexicano implementó una serie de lineamientos para regular la extracción, que

tiene como finalidad la protección del recurso abulón para los pescadores de Baja California. A partir de esta fecha, la pesquería había estado reservada sólo para las cooperativas, sin embargo la Ley de Pesca de 1992, bajo el principio de pesca responsable establece un nuevo régimen de concesiones y fomento de cultivo para todo el sector social y privado (Mateus, 1986; Ponce-Díaz *et al.*, 2003; INAPESCA, 2006)

Entre los años de 1984 y 1985 la caída de la pesquería coincidió con un cambio de la composición definida de las especies capturadas, debido a la disminución en la captura de abulón amarillo (*Haliotis corrugata*) y el aumento de extracción de abulón azul (*H. fulgens*). Esta disminución orilló a que las organizaciones pesqueras realizaran acuerdos internos para establecer medidas autoregulatorias. Estas medidas coinciden con una recuperación en los niveles de la pesquería entre los años 1988 y 1993 (Lluch-Cota y Ponce-Días, 2000), siendo en 1993, el recurso abulón el segundo producto pesquero generador de divisas en México (Viana, 2000).

El descenso abrupto del volumen de producción de abulón por pesquería, fue muy evidente desde 1994 (Figura 3). Por lo cual, en 1996, el INAPESCA y el sector social dedicado a la extracción de abulón desarrollaron e implementaron un plan de manejo para la recuperación de las poblaciones de abulón, bajo los siguientes objetivos: 1) detener la tendencia negativa en las biomásas, 2) incrementar el tamaño de las biomásas y 3) llevar las biomásas al nivel donde se maximiza la producción excedente. Del año 2000 al 2009 se evidenció una ligera recuperación de la pesquería, asociada al aumento en las biomásas de bancos de abulón azul y amarillo principalmente. Sin embargo, de 2009 a 2010 se observa una disminución en las capturas y biomasa en los bancos naturales, asociada a mortalidades masivas por enfermedades y cambios ambientales (SAGARPA, 2012). Por otra parte, aunque la Carta Nacional Pesquera no ha sido actualizada (última versión publicada en 2012 con datos de 2010), las bases de datos de los Anuarios Estadísticos de Acuicultura y Pesca 2011-2014 (Figura 3), evidencian que las capturas continúan disminuyendo.

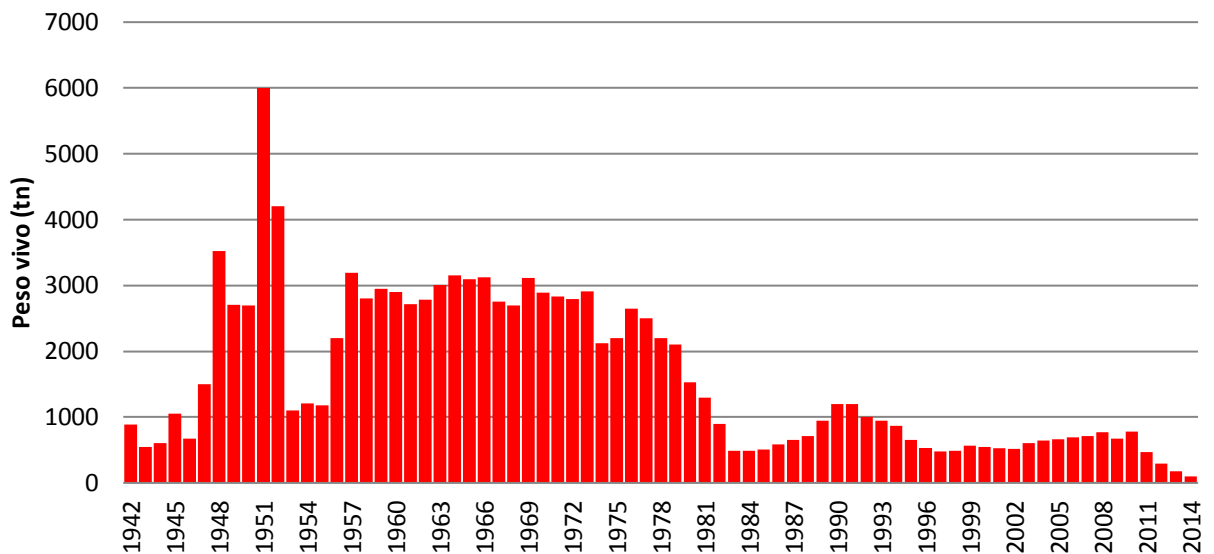


Figura 3. Producción pesquera anual por captura de abulón en México, representado el peso vivo en toneladas. Recopilación de Carta Nacional Pesquera y bases de Anuarios Estadísticos de Acuicultura y Pesca.

Estudios de dinámica poblacional realizados en los 90's muestran signos de deterioro a causa de la sobrepesca, con una drástica caída a de 1978 hasta 1984, esto expone un problema de reclutamiento por sobrepesca. Como se ha observado en otros países la disminución de la biomasa natural de estas especies, ha provocado que las pesquerías de abulón se encuentren en situación de riesgo (Guzmán del Prío, 1994).

Es de suma importancia resaltar que dentro de los lineamientos y estrategias de aprovechamiento del abulón en la Carta Nacional Pesquera (SAGARPA, 2012), se menciona la necesidad de continuar y reforzar la utilización e investigación de la biotecnología sobre las diferentes etapas del abulón, aplicar y monitorear las medidas de legislación y vedas, así como mantener y mejorar el marco jurídico de la conservación, para garantizar la recuperación de las poblaciones naturales y la actividad económica; Además de promover el cultivo comercial, fomentar el mejoramiento genético para formar, mejorar y aprovechar al máximo los lotes de cultivo (Guzmán del Prío, 1994; SAGARPA, 2012).

Desde 1960 hasta la fecha, la pesquería del abulón en México cuenta con cinco especies de abulón de importancia comercial, *Haliotis fulgens* (azul), *Haliotis corrugata* (amarillo), *Haliotis cracherodii* (negro), *Haliotis sorenseni* (chino) y *Haliotis rufescens* (rojo), consideradas entre las especies de *Haliótidos* con las tallas más grandes del mundo y destacando el abulón rojo (*H. rufescens*) por ser la especie que alcanza la mayor talla de todas (Cox, 1962; Guzmán del Prío, 1994; INAPESCA, 2006).

A pesar de la diversidad de abulones que alberga México, la Carta Nacional Pesquera Mexicana (SAGARPA, 2012), indica que las poblaciones naturales de abulón negro, chino y rojo, se encuentran en estado de deterioro; mientras que el abulón azul y amarillo en recuperación; aunque en la actualidad el volumen de producción por captura continua disminuyendo.

Sin embargo, a pesar de la disminución en el volumen de producción, posición 49 actualmente, el recurso sigue teniendo una gran importancia socio-económica en México, ubicándose en el lugar 29 por el valor de su producción, dado su alto precio en el mercado internacional (SAGARPA, 2013a).

1.4 Áreas y bancos de pesca

De acuerdo con el Diario Oficial de la Federación del 16 de marzo de 1994, se establecen épocas y zonas de veda para la captura de las especies de abulón, donde su distribución geográfica es dividida en cuatro zonas y cada una comprende un periodo de veda diferente.

La Zona I tiene un periodo de veda temporal del 1 de julio al 30 de noviembre, se limita desde la línea divisora internacional con Estados Unidos de Norte América hasta punta Malarrimo en Baja California Sur, incorporando bancos e islas cercanas. En las Zonas II y III la veda temporal es la misma en ambas, comprende el periodo del 1 de agosto al 31 de diciembre. Sin embargo, la Zona II está definida desde Punta Malarrimo hasta la coordenada 27° 47' 30" Norte; 114° 32' 20" Oeste, junto con todas las islas y bancos de abulón ubicados dentro del área. La Zona III se limita desde el primer tercio de bahía Asunción, Baja California Sur, incluyendo todos los bancos hasta Punta Holcomb en laguna San Ignacio, Baja California Sur, adosando todas las islas contiguas a la costa. Zona IV del 1 de septiembre al 31 de enero de cada año, que comprende todos los bancos de abulones así como islas inmediatas, desde Punta Holcomb en laguna San Ignacio hasta la de desembocadura del arroyo Conejo, ambas localidades en Baja California Sur (Figura 4). Sin embargo, las fechas de vedas pueden ser modificadas para temporadas específicas debido a anomalías u otros acontecimientos (DOF, 1994).

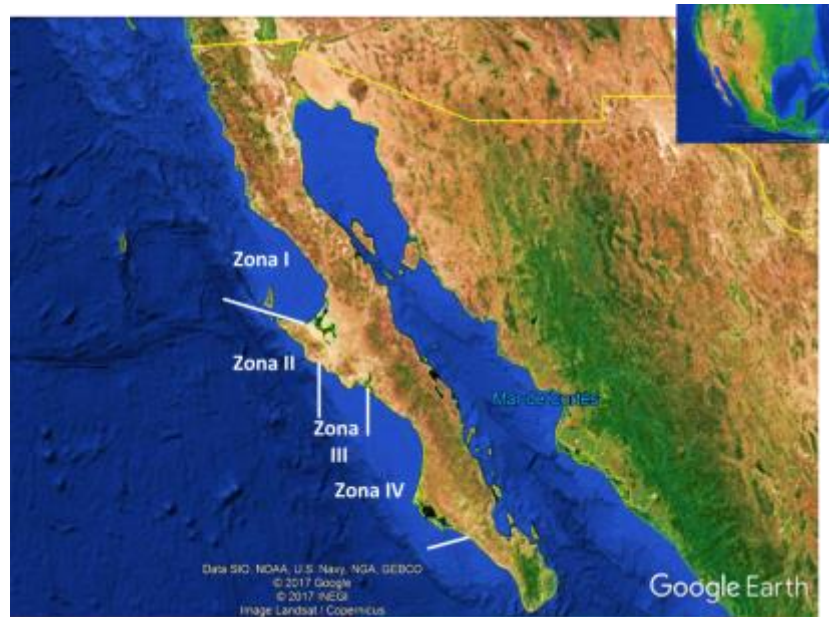


Figura 4. Zonas de pesca de abulón (NOM-009-SAG/PESC-2015).

1.5 Abulón rojo (*Haliotis rufescens*)

A pesar de la diversidad de abulones que alberga México, la importancia del abulón rojo (*H. rufescens*) radica en el hecho de ser la única especie en mexicana con la tecnología de cultivo comercial completamente desarrollada y validada; además, de poseer una de las mayores tasas de crecimiento y ser la especie de abulón más grande del mundo, llegando a alcanzar un peso máximo de 1.7 kg y hasta 33cm de longitud.

H. rufescens se distingue de otras especies de abulón, por poseer en el exterior de la concha un color rojo ladrillo con tres a cuatro poros respiratorios abiertos y moderadamente elevados, internamente exhibe una iridiscencia platinada y la marca del musculo usualmente es verde oscuro. La parte del cuerpo tiene un color negro, los epipodios y tentáculos cefálicos se extienden más allá del borde de la concha, en algunos casos la parte superior del epipodio presenta zonas blancas. Distribuida naturalmente desde Oregon California hasta Bahía Tortugas Baja California Sur, habitando la zona intermareal, con una mayor abundancia entre 8 y 25m, pero habitando desde los 4 m hasta los 180 m de profundidad, con tolerancias termales desde 7 hasta 27.5°C (Cox, 1962; Hahn, 1989; Guzmán del Próo, 1994; SEPESCA-CIBNOR, 1994; Díaz, Del Río-Portilla, Sierra, Aguilar y Re-Araujo, 2000; SAGARPA, 2013b).

Se considera que la distribución geográfica tiene implicaciones sobre la maduración sexual de las poblaciones naturales de abulón, debido a que han encontrado que individuos de localidades al sur de su distribución natural exhiben cierto grado de precocidad, relacionado con la temperatura del hábitat. Sin embargo, el 100% de una población silvestre de abulón rojo madura sexualmente entre tallas de 150 y 170 mm longitud de concha. Con tasas de fecundidad con valores máximos de 30×10^6 ovocitos en organismos silvestres maduros (Guzmán del Prío, 1994)

1.6 Producción acuícola de abulón rojo

El cultivo de abulón de especies mexicanas es una actividad atractiva ya que cuenta con gran demanda y una limitada oferta, además posee un mercado internacional establecido y un precio elevado de venta, capaz de generar divisas importantes para el país. Aunque el crecimiento de los abulones puede resultar lento para alcanzar su talla comercial (dos a cinco años), el precio que adquiere es lo suficientemente atractivo como para compensar la inversión inicial, los costos y el tiempo de operación del cultivo ya sea producido para engorda comercial o simplemente para programas de recuperación en el medio natural, con la finalidad de aumentar la biomasa de los bancos explotables (Oakes y Ponte, 1996; Flores-Aguilar, 2000; Viana, 2000).

Los primeros programas federales para desarrollar el cultivo de abulón rojo en México fueron realizados desde 1971, pero estos no fueron implementados comercialmente debido a que presentaron problemas en la supervivencia al momento de iniciar su etapa de juvenil bentónico (Guzmán del Prío, 1994). Posteriormente, en 1984 el gobierno mexicano realizó un convenio para establecer laboratorios productores de semilla de abulón en Eréndira, B.C. y Bahía Tortugas, B.C.S., con el fin de realizar repoblamiento de bancos naturales (Mateus, 1986). Pero es hasta 1992 que se registra la primera concesión de acuicultura comercial para el cultivo de abulón rojo (SAGARPA, 2012). Sin embargo, las bases de datos de los Anuarios Estadísticos de Acuicultura y Pesca reportan producciones acuícolas de abulón rojo a partir del 2005 (Figura 5). En el mismo año la carta nacional acuícola reporta la creación de tres laboratorios para la producción de semilla de abulón rojo (Vinet *et al.*, 2011; SAGARPA, 2013).

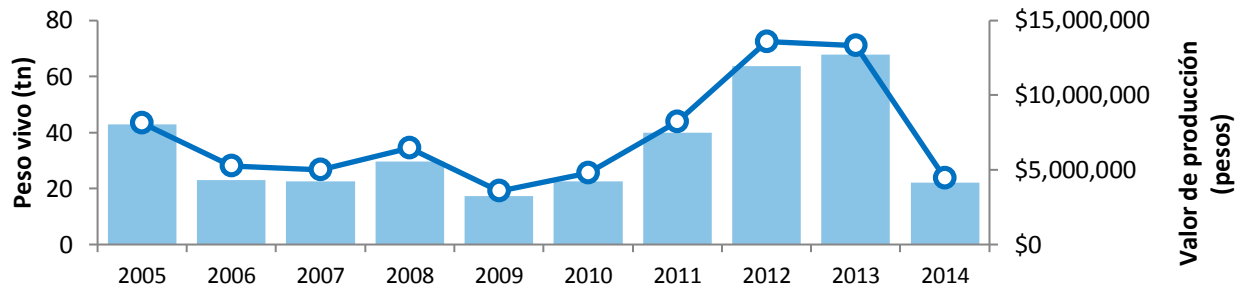


Figura 5. Producción por acuicultura de abulón rojo en México, representando en el eje primario la producción de peso vivo en toneladas representado por las barras azules y en el eje secundario el valor de la producción en pesos mexicanos representados por la línea azul. Recopilado de los Anuarios de Acuicultura y Pesca.

A pesar del esfuerzo que se emplea para el progreso de la acuicultura en México, es inevitable notar que su desarrollo avanza a un ritmo muy lento, independientemente de las excelentes condiciones naturales y los bajos costos de mano de obra en la región (Lafarga-De la Cruz, 2013). Esto se refleja en las estadísticas de producción de abulón por acuicultura que, en 2014, representa tan sólo el 5% de la producción total de abulón en México, con un valor mayor a \$4 millones de pesos (CONAPESCA, 2014). Este incipiente crecimiento de la industria abulonera mexicana es más notorio si se compara con la producción acuícola de abulón rojo en Chile (especie introducida en 1977 para desarrollo de cultivo comercial). La cual, según datos de la FAO, reporta producción desde 1996 y para 2014 su volumen fue de 1,130 toneladas, con un valor aproximado de \$104 millones de dólares (Figura 6; FAO, 2014). Según el Anuario Estadístico de Pesca publicado por Sernapesca-Chile en 2016, se estima una producción de abulón rojo de 1,274 toneladas obtenida apenas por diez industrias acuícolas.

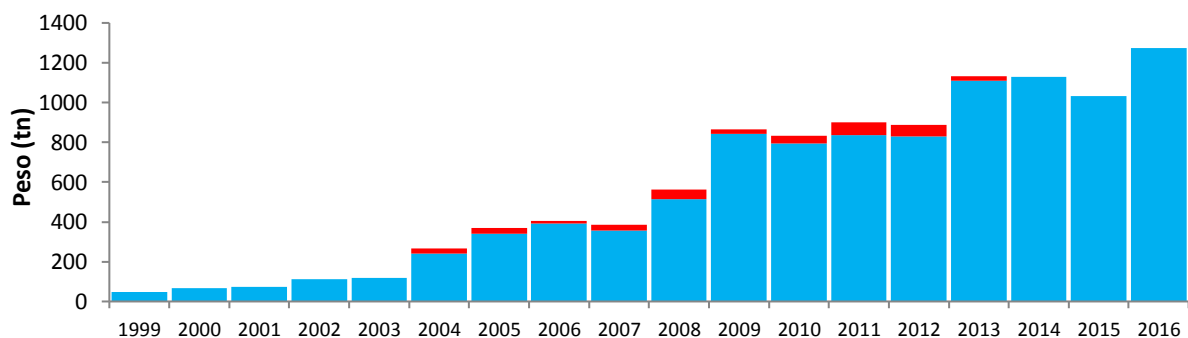


Figura 6. Producción acuícola de abulón rojo, *H. rufescens* en toneladas, reportada por la FAO para México y recopilación de los Anuarios Estadísticos de Pesca de Sernapesca de Chile (2016). Barra azul representa la producción chilena y la barra roja la producción mexicana.

En Chile, el sector académico en colaboración con el sector privado desde 1996 hasta el día de hoy desarrolla proyectos de investigación para enfrentar los desafíos de la industria de abulón en Chile, enfocados en las técnicas de cultivo, alimentación, control de enfermedades e infecciones y en años más recientes en un programa de mejoramiento genético mediante la crianza selectiva de abulones para lograr familias de abulones con mejores características de cultivo (UCN, 2015).

De igual manera en Islandia se han desarrollado investigaciones en centros de cultivo de abulón rojo con la finalidad de mejorar su producción. En su estudio, Steinarsson y Imsland (2003) sugieren que bajo el efecto de una adecuada alimentación con macroalgas de la región y el uso de la temperatura óptima en condiciones de cultivo de abulón rojo, pueden lograr un 170% del incremento de la biomasa por año y alcanzar una talla comercial en dos años partiendo de organismos de 16 mm de longitud. Es importante mencionar que los organismos utilizados en ese estudio son originarios de Morro Bay, California (1988). Sin embargo, no existen datos de producción acuícola reportados por este país ante la FAO.

1.7 Evaluación de la diversidad genética

Como ya se ha mencionado, el abulón es una especie atractiva para la acuicultura, relacionada con un poder adquisitivo y estatus socioeconómico alto en mercados internacionales. Aunado a esto, los organismos de cultivo poseen la oportunidad de entrar al mercado con una talla menor, en comparación con organismos de origen silvestre. Pero si no se realiza un manejo adecuado de los organismos en cultivo pueden desarrollarse implicaciones desfavorables reflejadas sobre la calidad, rendimiento y características fenotípicas no deseadas de la progenie. Así como acumulación de endogamia, asociado principalmente al limitado número de reproductores. Estos efectos negativos, son consecuencia de la pérdida de la diversidad de características genéticas o variantes alélicas dentro o entre poblaciones, también conocido como pérdida de la variabilidad genética. Sin embargo, la implementación de programas de mejoramiento genético permiten explotar el potencial biológico de las especies, pudiendo obtenerse un incremento de producción estimado entre el 5% y 23% por generación, que ayuden a asegurar competitividad de la industria (Elliott, 2000; Flores-Aguilar, 2000; Ibarra-Humphries, 2000; Martínez, 2005; Eguiarte *et al.*, 2010; Brokordt *et al.*, 2015).

Para optimizar los resultados de los programas de mejoramiento genético y evitar la disminución de diversidad genética en cultivos, es necesario conocer la salud genética de las poblaciones naturales y lotes de cultivo de la especie en cuestión, mediante la implementación de marcadores moleculares

para la evaluación de parámetros genéticos, como número de alelos, riqueza alélica y heterocigosidad. Siempre utilizando el mayor número posible de individuos silvestres y en cautiverio, además de complementar con información de las características fenotípicas (rasgos morfológicos) de la especie relevante para la acuicultura y su conservación. Lo anterior, facilitará la selección de organismos con adaptaciones de interés y permitirá mantener o mejorar la diversidad genética, sin poner en riesgo la integridad de los individuos generados en cultivo y del medio silvestre. Además el uso de marcadores moleculares permite realizar análisis de asignación parental entre individuos o grupos de individuos y conocer el pedigrí de los organismos en cultivo, lo cual facilita la selección asistida, con el fin de potenciar la acuicultura actual y futura (Elliott, 2000; Ibarra-Humphries, 2000; Centre *et al.*, 2001; Li, Park, Endo y Kijima, 2004; Martínez, 2005; Astorga, 2008; Slabbert, Bester y D'Amato, 2009).

1.8 Marcadores moleculares microsatélite (SSR)

Para evaluar la diversidad genética, una de las herramientas moleculares disponibles son los microsatélites o SSR (por sus siglas en inglés *Simple Sequence Repeats*), éstos consisten en secuencias repetidas en tándem, de dos a seis pares de bases con regiones adyacentes generalmente conservadas, que son utilizadas para el diseño de cebadores. Estos marcadores se caracterizan por ser altamente polimórficos, heredados de forma mendeliana como marcadores codominantes y abundantes en todas las especies, debido a que pueden distribuirse dentro del genoma de manera uniforme en regiones codificantes y no codificantes, en todos los cromosomas y todas las regiones del cromosoma. Además son técnicamente fáciles de obtener y altamente reproducibles, por lo cual son utilizados ampliamente para análisis de diversidad genética, asignación parental, selección asistida por marcadores (por sus siglas en inglés MAS), identificación de especies, razas e híbridos así como para el mapeo genético y desarrollo de caracteres cuantitativos de interés comercial ó QTL (por sus siglas en inglés *Quantitative Trait Loci*) (Zane, Bargelloni y Patarnello, 2002; Liu y Cordes, 2004; Martínez, 2005; Astorga, 2008).

En contraste con otras herramientas moleculares, los microsatélites facilitan el análisis parental, además permiten detectar los cambios genéticos entre lotes de cultivo y poblaciones naturales, para poder identificar los recursos genéticos con potencial para cultivo (Li *et al.*, 2004; Martínez, 2005).

1.9 Microsatélites en abulón

En 2004 en un estudio realizado por Li, Park, Endo y Kijima, lograron estimar la diversidad genética en *Haliotis discus* utilizando seis marcadores moleculares tipo microsatélites, en tres de lotes de cultivo y dos poblaciones naturales, con una pérdida del 76% de alelos por locus en la población de cultivo. La conclusión a la que llegaron fue, que las poblaciones de cultivo presentan una reducción significativa en su variabilidad genética. Observada en un bajo número de alelos por locus significativamente menor a los encontrados en las poblaciones naturales (5.4 contra 22.4); además de una baja heterocigosidad observada debido principalmente al limitado número de individuos reproductores que contribuyen a la prole.

Por otra parte, Kube *et al.* (2007) evaluaron la diversidad genética en la especie *Haliotis laevigata* mediante el uso de marcadores microsatélites, utilizando la cruce de hembras provenientes de poblaciones naturales con machos de granjas de cultivo. Los resultados obtenidos pudieron ayudar a definir las limitantes para la crianza de un gran número de familias y ofrecer un mejoramiento del 10% en crecimiento.

En el estudio realizado por Hara y Sekino (2007), al comparar la diversidad genética entre abulones *H. discus* de cultivo y silvestres, evaluada con nueve marcadores microsatélites, determinaron la pérdida de diversidad en poblaciones de cultivo, así como la disminución de la adaptación a nuevos entornos, debido a la reducción de la variabilidad alélica y bajos niveles de diversidad genética. Además, mencionan que, para estimar la cantidad máxima permisible de organismos cultivados para ser liberados, es necesario conocer el éxito de la contribución de los organismos liberados, evaluando los genotipos en las siguientes generaciones. Con la finalidad de aumentar la biomasa natural sin alterar la genética de las poblaciones.

En Sudáfrica, Slabbert, Bester y D'Amato (2009), evaluaron la diversidad genética de *H. midae* en tres lotes de cultivo y su respectiva descendencia (3 cohortes) además de dos localidades silvestres, utilizando seis marcadores microsatélite especie específicos. Donde, encontraron disminución de la variabilidad genética únicamente en una de las cohortes evaluadas, con una reducción del 63% en el número de alelos, debido a que sólo el 24% de los reproductores contribuyeron a la descendencia. Sin embargo, no determinaron pérdida de la diversidad genética en la mayoría de las cortes en comparación con las poblaciones silvestres, en términos de número de alelos, riqueza alélica o heterocigosidad. Para la asignación parental utilizaron tres de los seis marcadores, seleccionados por no presentar bandas inespecíficas, así como bajas frecuencias de alelos nulos, lo que permitió obtener una asignación parental del 82% de los individuos.

Aguilar-Espinoza, Valderrama-Aravena, Farlora, Lafarga De la Cruz y Gallardo-Escárate (2014) desarrollaron, a partir de secuencias expresables, 29 loci microsatélite especie específicos para *Haliotis rufescens*. Los cuales fueron utilizados para evaluar una población chilena de cultivo y una mexicana, determinando pérdida de variación alélica en 16 y 4 loci de la población chilena y mexicana, respectivamente. Este estudio es el primero en reportar marcadores microsatélites especie específicos para *H. rufescens* los cuales pueden ser aplicados en programas de mejora genética acuícola, análisis parental y conservación de las poblaciones naturales de ésta especie.

Como se ha observado, el recurso pesquero abulón se ha visto en decremento a lo largo del tiempo. Por lo cual Gaffney *et al.*, (1996) con la finalidad de ayudar en la recuperación de las localidades silvestres de *H. rufescens*, realizaron un estudio de composición genética utilizando cuatro aloenzimas, con las cuales evaluaron tres localidades silvestres y cuatro lotes de organismos producidos bajo condiciones controladas. Concluyendo con la posibilidad de poder utilizar los organismos de cultivo para repoblamiento; siempre y cuando, en los reproductores se mantenga una diversidad genética adecuada. Así como utilizar programas de crianza para minimizar la endogamia, evitando introducir genotipos raros y mantener un monitoreo del programa de repoblamiento, con la finalidad de proveer la autosustentabilidad de las poblaciones naturales (Burton y Tegner, 2000). Esto puede ser logrado debido a la composición genética constante a lo largo de las costas de California, ocasionada por al alto flujo genético entre las localidades geográficas (Gruenthal, Acheson y Burton, 2007; De Wit y Palumbi, 2013)

En general el uso de microsatélites para evaluar diversidad genética de poblaciones de abulón, es sustentado por diversos estudios, debido a que la información que estos marcadores generan ayudan a explicar los patrones de flujo génico, las variables y los parámetros demográficos así como definir estructuras familiares (Milligan *et al.*, 1994).

1.10 Justificación

México cuenta con una gran diversidad de recursos pesqueros de importancia socio-comercial. Dentro de los cuales, el recurso abulón rojo (*Haliotis rufescens*) endémico de la región California y Baja California, es la única especie de abulón que cuenta con una biotecnología de cultivo y engorda completamente desarrollada y validada. Además, de que su producción por acuicultura posee el potencial de crecer dentro y fuera del país.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos que se han realizado por preservar el recurso abulón rojo en su ambiente natural y promover la acuicultura del mismo, su disponibilidad sigue siendo limitada debido al impacto negativo de la pesca, las enfermedades, el cambio climático y la destrucción de su hábitat. Aunado a esto, el desconocimiento del estado genético del recurso en México, así como la ausencia de un programa de crianza en cultivo, no permiten que el recurso sea aprovechado de manera eficiente. Además, de que en la actualidad se presentan problemas en granja, como cambios en la proporción de sexos, disminución en supervivencia larval y susceptibilidad a enfermedades, las cuales afectan la biomasa final de producción.

Por lo cual, para impulsar el desarrollo de la industria abulonera regional, tanto pesquera como acuícola, es necesario evaluar la diversidad genética del recurso disponible en el ambiente y en cautiverio. Asimismo, conocer la estructura geográfica de la población silvestre de este recurso, es crucial para el manejo y repoblamiento de bancos naturales de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) seriamente dañada por la sobre-explotación que se dio en el auge de las pesquerías de abulón, tanto en California EUA, como en México. Este conocimiento permitirá la implementación adecuada de programas de crianza basados en marcadores moleculares proporcionando la oportunidad de seleccionar organismos con características productivas específicas de interés (crecimiento, supervivencia, resistencia a enfermedades, maduración sexual tardía). Asimismo, permitirá mantener o aumentar la diversidad genética en cultivo y producir organismos similares a los silvestres para no erosionar la diversidad genética de los bancos sujetos a repoblamiento.

El presente estudio surge de la necesidad de conocer la diversidad genética de *Haliotis rufescens*, con la finalidad de evaluar la composición genética del recurso y brindar información genética básica para impulsar el progreso de la acuicultura de abulón rojo con programas de crianza y de mejoramiento genético. Adicionalmente, brindará las bases para el desarrollo de estrategias de repoblamiento que favorezcan la preservación de este valioso recurso, así como el aumento de la biomasa de los bancos naturales.

1.11 Hipótesis

La composición genética entre poblaciones naturales de abulón rojo (*H. rufescens*), a lo largo de su distribución geográfica, es homogénea y por lo tanto no hay estructura poblacional.

En lotes de cultivo de abulón rojo (*H. rufescens*), existe una pérdida de diversidad genética en comparación con la encontrada en poblaciones naturales.

1.12 Objetivos

1.12.1 Objetivo General

Evaluar la diversidad y estructura genética del abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en poblaciones naturales (California y Baja California) y en lotes de cultivo (Baja California), mediante el uso de marcadores microsatélite.

1.12.2 Objetivos particulares

1. Evaluar la diversidad y estructura genética de abulón rojo en poblaciones naturales de California y Baja California, utilizando marcadores microsatélites.
2. Determinar la diversidad genética en lotes de cultivo de abulón rojo producido en tres granjas de Baja California y compararla con la diversidad de las poblaciones naturales.

Capítulo 2. Materiales y Métodos

2.1 Obtención, preservación y manejo de material biológico

El presente estudio se desarrolló con muestras de origen silvestre procedentes de seis localidades dentro de la distribución natural del abulón rojo *Haliotis rufescens*; asimismo se colectaron cinco lotes de cultivo en tres granjas acuícolas instaladas en Baja California, México (Figura 7; Tabla 1). Todas las muestras provenientes de California EUA son de origen silvestre, fueron tomadas por personal del Departamento de Pesca y Vida Silvestre de California (California Department of Fish and Wildlife) y donadas por el Dr. James D. Moore al CICESE.

El muestreo de tejido para el análisis genético de los individuos silvestres se realizó en organismos mayores a 15 cm (talla comercial) de los cuales se recolectó una porción de tejido epipodial. En el caso de los organismos provenientes de granja se utilizaron individuos de tallas entre los 7 y 10 cm de longitud, de los cuales también se recolectó tejido epipodial, adicionalmente se recolectaron organismos de 10 mm de longitud, procedentes de un lote de semilla de Eréndira (PMB15).

La selección del tejido epipodial fue con la finalidad de disminuir el riesgo de muerte de los abulones, lo que garantiza la preservación del individuo y un rendimiento adecuado en la extracción de DNA genómico (Slabbert y Roodt-Wilding, 2006; HLeap, Cárdenas y García-Vallejo, 2009; Nardelli, Túnez, Centrón y Cassini, 2011).

Debido principalmente a la disponibilidad del recurso de forma silvestre, así como el número de reproductores asignados por las granjas para la manipulación y colecta de tejido. Todas las localidades contaron con fechas de colecta distintas, además de un número diferente de individuos muestreados. A cada localidad se le asignó un código de referencia, el cual permitió un análisis práctico, que consta de tres letras relacionadas con el nombre del sitio y dos números que hacen referencia al año del muestreo (Tabla 1). Posteriormente estos códigos de las localidades se utilizaron para ubicar geográficamente cada área de muestreo en un mapa generado con el software Google Earth. Dentro de este, se identificaron con puntos de colores para discriminar entre las localidades naturales en color azul y de cultivo en color rosa (Figura 7).

Tabla 1. Localidades muestreadas, separadas por poblaciones naturales y de cultivo. Se especifica el año del muestreo, el código de etiqueta y el tamaño de muestra (N). * indica que las muestras son semilla de abulón.

Localidades	Año de muestreo	Código	N
Silvestres			
Crescent City, CA.	1999	CCY99	29
Van Damme, CA.	1999	VDM99	50
Van Damme, CA.	2007	VDM07	50
San Miguel island, CA.	2007	SMI07	50
Salt Point, CA.	2011	SPT11	50
Santo Tomás, B.C.	2014	STT14	35
Punta San José, B.C.	2016	PSJ16	14
Cultivo			
El Rosario, B.C.	2012	ROS12	47
San Quintín, B.C.	2012	SQN12	56
Eréndira, B.C.	2013	PMB13	31
Eréndira, B.C.	2014	PMB14	58
Eréndira, B.C.*	2015	PMB15	50

La estimación de las distancias geográficas entre las localidades silvestres se consiguieron trazando un perfil costero entre cada punto, con la herramienta “Ruta” de la aplicación Google Earth, la información fue registrada en la Tabla 2.

Tabla 2. Distancias geográficas calculadas en kilómetros, entre el muestreo de las localidades silvestres de abulón rojo (*H. rufescens*).

Código de localidad	Distancia (km)
CCY - VDM	325
VDM - SPT	86
SPT - SMI	573
SMI - STT	588
STT - PSJ	12

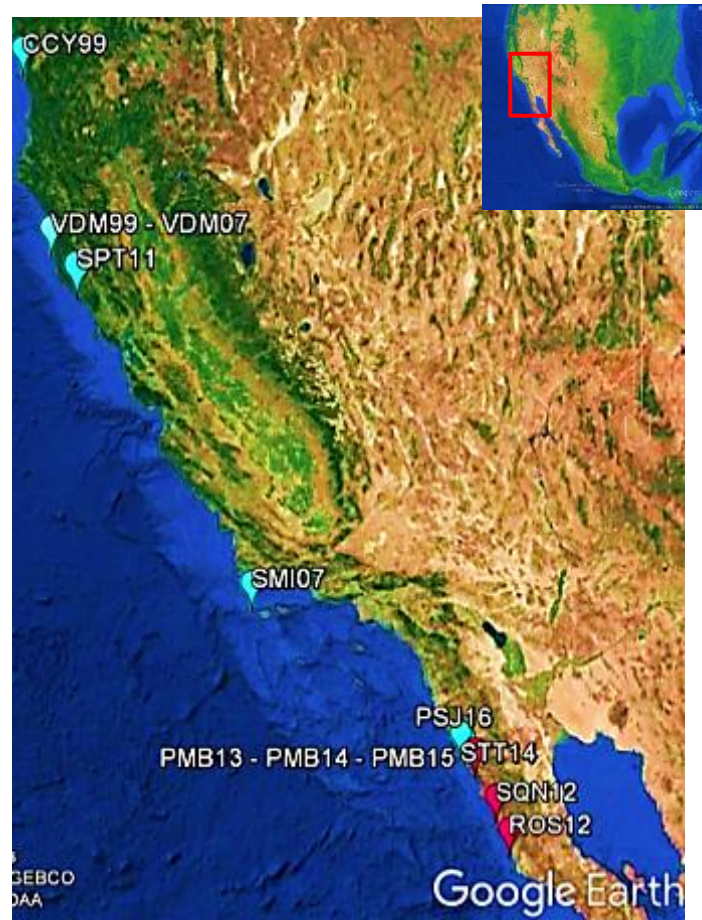


Figura 7. Distribución geográfica de las localidades muestreadas, localidades naturales en color azul y en color rosa las localidades de cultivo.

Las muestras se preservaron en etanol al 95% y se conservaron a una temperatura de -80°C (Dawson, Raskoff y Jacobs, 1998; Cabrera y Munsterman, 2002; HLeap *et al.*, 2009; Nardelli *et al.*, 2011). Previo a exponer las muestras a temperatura ambiente, los tubos que contienen el tejido fueron puestos en un congelador a -40°C , para descongelar gradual de las muestras, evitando poner en riesgo la integridad del tejido.

Para retirar el exceso de etanol mediante evaporación, es necesita exponer el tejido un par de minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, dentro de un mortero el tejido debe ser congelado con nitrógeno líquido, para facilitar el macerado hasta conseguir la consistencia de polvo fino. Finalmente, el tejido debe ser depositado dentro de un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml.

2.2 Obtención y evaluación de DNA genómico

Para la obtención de DNA genómico a partir de tejido, se utilizó el método de sales descrito por Sambrook y William (2001) para todas las localidades, exceptuando la localidad de cultivo Eréndira, B.C. 2014 (PMB14) y la localidad silvestre de Punta San José B.C. 2016 (PSJ16), las cuales fueron procesadas utilizando el protocolo comercial *DNAeasy® Blood y Tissue* (QIAGEN®, Valencia, CA), siguiendo los pasos de extracción descritos por el fabricante. Adicionalmente, a todas las muestras se les realizó una digestión con RNAsas por un tiempo de 60 minutos a una temperatura de 37°C, con la finalidad de eliminar el RNA de la muestra y obtener una lectura más precisa de la cantidad de DNA (Lopera-Barrero *et al.*, 2008; Miller, Van Rooyen, Sweeney, Whiterod y Weeks, 2013).

La cuantificación del DNA extraído ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) se realizó con un espectofotómetro marca NanoDrop™2000 (ThermoFisher Scientific), mediante la lectura de absorbancias de una longitud de onda específica de 260 nm. Además determinó la pureza del DNA, por fenoles con la razón 260/230 en rangos aceptables entre de 2.0 a 2.2 y proteínas en 260/280 con rango de pureza admisible en 1.8 a 2.0 (Thermo Scientific, 2011).

La calidad de los productos de las extracciones de DNA genómico, se evaluaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 1X o SB 1X (Zhang, Wang y Wang, 2011) a 90 volts por 45 min, teñidos con bromuro de etidio (BrEt) o GelRed™ de Biotium (Huang, Baum y Fu, 2010; Crisafuli, Ramos y Rocha, 2015). Posteriormente cada gel se observó en el fotodocumentador Gel Doc™ XR+ Imager (Bio-Rad).

2.3 Amplificación de marcadores microsatélites

Una vez cuantificado el DNA se realizaron diluciones específicas para cada muestra, donde todas las muestras se llevaron a una concentración final de $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. A partir de estas diluciones se procedió a realizar la amplificación de los microsatélites utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*).

Los 16 marcadores microsatélites utilizados en este estudio son especie específicos de *Haliotis rufescens* y fueron desarrollados por Aguilar-Espinoza y colaboradores (2014) (Tabla 3), el criterio de elección en este estudio para definir los 16 microsatélites a utilizar dependió de que el índice de contenido polimórfico (PIC) fuese alto, así como de un valor alto en el número de alelos (Na).

La reacción para amplificar cada microsatélite constó de un volumen final de 16.33 μL por muestra, la concentración final de cada reactivo utilizado en la PCR fue de 1X para la solución amortiguadora A, 0.2 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ para BSA, 0.2mM dNTP's, 0.1 U de Taq polimerasa (Kapa Biosystems®) y 0.5 μM para cada par de cebadores correspondiente (Anexo A; Tabla 9) (Tabla 3). A cada tubo se le agregó volumen necesario para que la concentración de DNA templado de cada muestra estuviera alrededor de 8 a 13 ng de DNA total.

Tabla 3. Descripción de los 16 marcadores microsatélites especie específicos de *H. rufescens* desarrollados por Aguilar-Espinoza *et al.* (2014) utilizados en este estudio.

Locus	Contig	Motivo de repetición	Acceso NCBI ¹	Secuencia de cebadores ² (5'-3')	Tamaño esperado (pb ³)	Ta ⁴ (°C)
Hr1	12187	(ATC) ₆	JQ867470	F:CAGCATAGGCTCCCGTTGCCA R:GGGGTGTGCCTGCCAGT	148	63
Hr2	5673	(AG) ₅	JQ867481	F: GGTGTGTGCGGTGGGGTAGC R: AGCAACTTCCCACATTGTCAGGGG	194	65
Hr6	3764	(AGC) ₉ A(AACAGC) ₂	JQ867494	F: ATCGCCGGCCAGACAGTGGA R: TGTCCCTGCGGCTGTTGCTG	169	63
Hr9	4892	(AC) ₆	JQ867497	F: ATGCTCCAAAAAGTGGGGTTCT R: CCCTGACATGGCATGCTGCT	177	61
Hr12	12613	(ACTGGG) ₅	JQ867473	F: GGACGAGGGACAAAGCACTGA R: AGCCAGTGTCCACTGTCCTGT	188	61
Hr16	4633	(AGC) ₅	JQ867477	F: TGACAACCCTGGAGTTGCCGT R: ACGGAGCAAGAGGCAGAGGC	175	59
Hr17	12110	(ATC) ₇	JQ867478	F: CTGCACCGGTGGCGTGATGT R:ACACAAATGTTGTTCAACGCGAACACT	180	63
Hr22	3435	(ACAT) ₉	JQ867484	F: GTCACACACTCCATTCAAGTAAACCA R: AGCAGTACATCTTGGGAGGTGA	240	59
Hr23	4491	(AAT) ₃ ...(ACT) ₁₂	JQ867485	F: CCACCAAGGATTTGTTCCCTTCTGT R: TGATGACGTGCCCTGTCGCT	160	62
Hr28	12505	(AT) ₅ ...(AT) ₄ (AACTAT) ₂	JQ867490	F: CGATGGCATGCCTACTGGCT R: ACAGTAGCTGTTGACAAGTGGGT	224	61
Hr29	4729	(ATT) ₆	JQ979089	F: TCAGCATCCAGCAAAGAGGGCT R: AGGACAGATCCAGGGCTTGCT	229	69
Hr30	8983	(AT) ₅ ...(ATATG) ₂	JQ979090	F: TTCCACTGCAGAAGCGCCCA R: TGGTGGGACACCAAACGGGTG	182	65
Hr31	3243	(ATC) ₉	JQ979088	F: GGCTGCAAGACATTGTGGCCT R:CGGATAACACAACACTGGTTAACTGGAGG	182	65
Hr32	1081	(ACATAT) ₂ (AC) ₅	JQ979086	F: ACGGCCAGATGGGCGTCATTG R: TGTGTTTCATGGCTCAGCCTTTCTGT	267	63
Hr33	2872	(AC) ₅ (ACTGAG) ₂ ...(ATC) ₃ ...(AAG) ₃	JQ979087	F: TGCAATGTATGTGGGCATGTG R: TGCAATAGTCATGGCATCTTCATC	330	66
Hr34	7620	(ACTAT) ₅	JQ979091	F: TTTGTTATCAGGTCGGCATC R: TGTCAAACATGCCTATTGCT	222	54

¹Número de acceso en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), ²secuencia de nucleótidos de cada cebador delantero (F) y reverso (R), ³tamaño esperado en pares de bases (pb), ⁴temperatura de anillamiento en grados centígrados.

Los marcadores microsatélites se amplificaron utilizando los termocicladores Veriti® (Applied Biosystems), MJ mini™ y Gene Cycler™ (Bio-Rad), bajo las siguientes condiciones modificadas descritas por Aguilar-Espinoza *et al.*, (2014): Incubación a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos donde cada ciclo debe contener una desnaturalización de 94°C por 40 segundos, una hibridación de 40 segundos con temperatura de anillamiento correspondiente a cada par de cebadores (Tabla 4) y una extensión de 72°C por 40 segundos, más una extensión final de 72°C por 5 minutos una vez finalizados todos los ciclos.

Para corroborar la amplificación exitosa de los marcadores se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1.5% o 2.0% en Buffer TBE 1X o SB 1X a 80 volts por 60 o 70 minutos, teñido con bromuro de etidio (BrEt, Sigma) (0.5 µg ml⁻¹) o Gel red, Biotium (30X). La visualización de la amplificación se realizó utilizando el fotodocumentador Gel Doc™ XR+ Imager (Bio-Rad) (Tabla 3).

2.4 Asignación de genotipos

Para la asignación de genotipos y generación de matrices de genotipos, se empleó la electroforesis capilar de alta resolución, mediante un sistema automatizado llamado QIAxcel® Advanced System (QIAGEN®, Valencia, CA) capaz de detectar concentraciones de 600ng hasta 0.6ng de producto de PCR a través de múltiples capilares (Wang *et al.*, 2009; Technologies, 2014).

Lotes de muestras fueron preparadas en placas de 96 pocillos, conteniendo de 7 a 8 µL del producto de PCR a analizar más 3 a 4 µL de diluyente, debido a requerimientos del fabricante. Una vez finalizadas las corridas, el programa generó los reportes con los electroferogramas de los caules se eliminan posibles interferencias o ruidos en las señales, para la correcta en la toma de decisiones al asignar el genotipo de cada individuo.

A partir de estos reportes, las matrices de genotipos de cada localidad se generaron utilizando los resultados de cada individuo (tamaño y número de alelos que posee cada organismo). Cada matriz contiene un total de 16 marcadores microsatélites (con dos alelos cada uno) para cada individuo dentro cada población; la ausencia de fragmento detectado se representó con un cero (Anexo B; Tabla 10).

2.5 Cálculo de parámetros genéticos poblacionales

2.5.1 Diversidad genética

El cálculo de los parámetros genéticos que describen a las poblaciones, fueron realizados con el programa GenAEx (Genetic Analysis in Excel), el cual es un paquete complemento de Excel que permite analizar una amplia gama de datos genéticos poblacionales (Peakall y Smouse, 2012). El uso de la herramienta GenAEx permitió realizar el cálculo de parámetros como el número total de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o), identificación de alelos privados (AP), para cada locus analizado en la población, así como la media de todos los locus dentro de la población.

La riqueza alélica (RA) por locus y muestra se estimó utilizando el programa Fstat 2.9.3.2 para marcadores genéticos codominantes, se estimó, el cual considera el tamaño mínimo de muestra empleando el método de rarefacción (Goudet, 2002).

El cálculo del Equilibrio de Hardy Weinberg (EHW) de cada locus y cada población, así como la estimación del coeficiente de endogamia (F_{IS}) se realizó con el programa de genética poblacional GENEPOP (Raymond y Rousset, 1995). El análisis se realizó con 10,000 demorizaciones, 1,000 *batches* y 10,000 iteraciones por *batch*, adicionalmente para ajustar el valor crítico de significancia se realizó una corrección de Bonferroni.

Por último, la diferenciación genética entre pares de poblaciones (F_{ST}) o el análisis molecular de varianza (AMOVA) se estimó utilizando el paquete Arlequin, considerando 10,000 permutaciones para calcular las diferencias por parejas de localidades ya utiliza para el análisis múltiples locus o datos de frecuencias alélicas (Excoffier y Lischer, 2010).

2.5.2 Estructura genética entre localidades

Con los datos obtenidos de los múltiples loci y el programa STRUCTURE versión 2.2.3, se realizó un análisis para conocer la estratificación genética de los individuos. Mediante la evaluación de diferentes componentes genéticos (ΔK), el modelo utilizado por STRUCTURE infirió la verosimilitud para realizar la asignación de grupos de acuerdo a su semejanza genética, sin considerar la procedencia geográfica del individuo (Pritchard, Stephens y Donnelly, 2000). En los análisis de estructura se consideraron

500,000 simulaciones con 500,000 interacciones y un modelo “*admixture*” que considera una mayor complejidad, permite identificar posibles hibridaciones y supone que los genotipos pudieran estar mezclados ancestralmente (Juyó-Rojas, 2012). Para determinar el número final de componentes genéticos (ΔK), las primeras simulaciones se realizaron considerando dos grupos adicionales para todas las localidades analizadas, con el propósito de evitar subestimar el número de componentes. Todas las simulaciones se realizaron con 10 interacciones entre cada ΔK .

El análisis de los archivos de salida de STRUCTURE versión 2.2.3, se realizó utilizando STRUCTURE HARVESTER, que mediante el método “*Evanno*” (Evanno, Regnaut y Goudet, 2005) detecta el número de componentes genéticos (K) que mejor se ajustan al conjunto de datos, utilizando la media de los valores de máxima verosimilitud (Earl y VonHoldt, 2012).

Para calcular las distancias entre genéticas entre las poblaciones se utilizó el programa *Populations* versión 1.2.2.1 (Langella, 2001) que trabaja con las frecuencias genéticas incluyendo las basadas en microsatélites. Los árboles filogenéticos se elaboraron con base en las distancias genéticas geométricas de Cavalli-Sforza, que permiten observar similitudes entre poblaciones que muestran semejanza respecto a las frecuencias alélicas (Demarchi, 2009). Además, se utilizó el algoritmo del vecino más cercano (“*Neighbor-Joining*”) considerando un total de 8,000 simulaciones “*bootstraps*” por locus, con la finalidad de proporcionar certeza a la topología obtenida. Y la visualización gráfica del árbol filogenético (dendrograma) se realizó con el programa FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2006).

Para evaluar el número de migrantes por generación entre pares de poblaciones a partir de las frecuencias alélicas y las distancias geográficas, se utilizó el programa genético denominado MIGRATE versión 3.2.1.(Beerli, 2012), asumiendo un modelo de migración asimétrica y diferentes tamaños de las subpoblaciones.

2.6 Análisis estadístico

Las diferencias o similitudes entre localidades y grupos de localidades se calcularon utilizando el programa STATISTICA versión 10© (StatSoft, Inc.) para los parámetros genéticos como el número total de alelos (N_a), riqueza alélica (R_a), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y coeficiente de endogamia (F_{IS}). De inicio, se realizaron pruebas de normalidad de Shapiro Wilk y homocedasticidad de varianza de Levene, en caso de cumplir con los supuestos se realizó un ANOVA de una vía y finalmente la prueba a posteriori de Tukey ($p < 0.05$), la cual permite agrupar las muestras.

Para los parámetros genéticos que no cumplieron con las pruebas de normalidad, se realizaron la prueba no paramétrica de comparaciones múltiples de Kruskal-Wallis. En el caso de los valores del coeficiente de endogamia (F_{IS}), para conocer si los valores realmente son diferentes de cero, se realizó una prueba t-Student, considerando como hipótesis nula que el promedio de coeficiente de endogamia de cada localidad es igual a cero ($F_{IS} = 0$).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Obtención y evaluación de DNA genómico

Se realizó extracción de DNA en todos los individuos colectados (N = 520muestras), pero no todas las muestras fueron usadas para la amplificación de los fragmentos ya que en algunos casos la cantidad de DNA fue menor a la requerida para realizar la reacción de PCR y en otros las razones de calidad del DNA se encontraban por fuera de los valores recomendables.

En promedio la cantidad de DNA extraído fue de $518.9 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$, donde las mayores concentraciones de DNA se encuentran dentro de las muestras procesadas con el método de Sambrook y William (2001) o de sales ($2500 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$), con una concentración media de $569.0 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$, por el contrario el promedio de DNA extraído con el protocolo comercial fue de $199.9 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$.

La pureza del DNA de acuerdo la razón 260/230 de fenoles mostró que solo el 41.6% de las muestras se encontraron dentro del rango admisible de 2.0 a 2.2 (Figura 8b), de las cuales solo el 2.5% pertenecen al protocolo comercial. Por otra parte, la pureza de DNA de acuerdo a la razón 260/280 para identificación de contaminación por proteínas indicó que el 89.2% de las muestras se encontraron dentro del valor aceptable de 1.8 a 2.0 (Figura 8a). Las muestras fuera del rango aceptable correspondieron a muestras procesadas con el método de sales de Sambrook y William (2001).

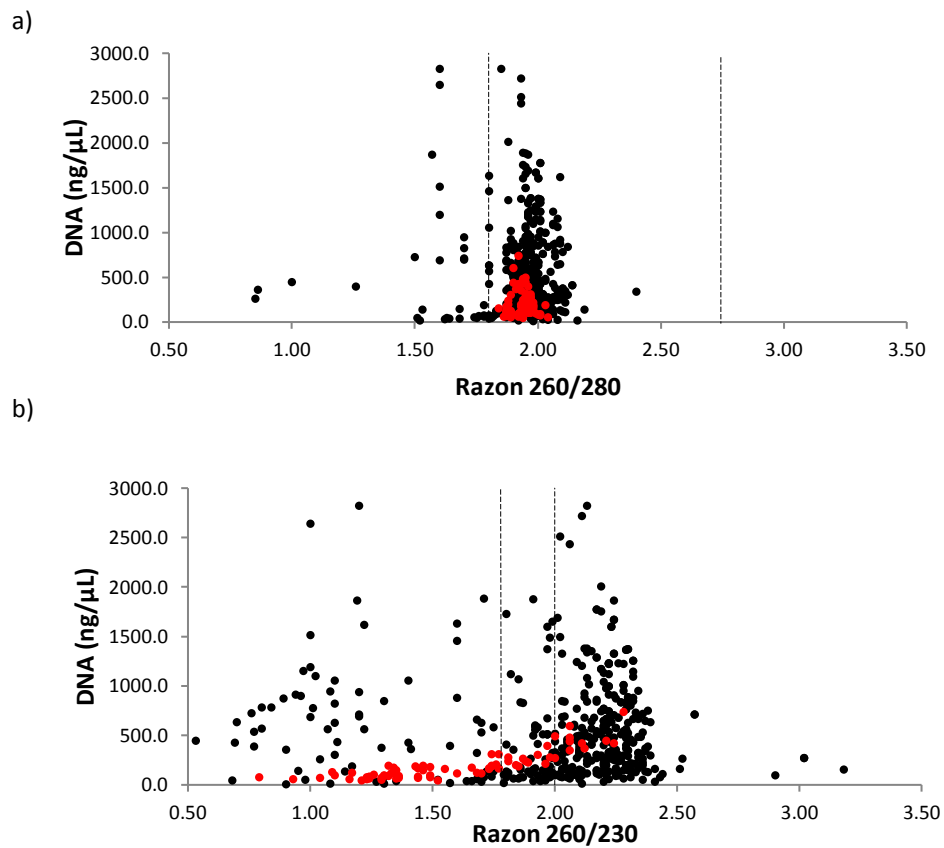


Figura 8. Concentraciones de DNA ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) e índices de pureza en función de las razones a) 260/280 para detectar contaminación por proteínas y b) 260/230 para fenoles. Puntos en color negro representan las muestras procesadas con el protocolo de sales y en color rojo las extracciones utilizando el protocolo comercial. Las líneas punteadas indican los rangos de valores aceptables para cada razón.

3.2 Amplificación de marcadores microsatélites

De las 520 muestras iniciales solo se utilizaron 488 muestras de DNA para la amplificación de los microsatélites, donde la mayoría de los individuos presentaron amplificaciones del fragmento dentro del tamaño esperado. Sin embargo, se presentó ausencia de amplificación en algunos organismos dentro de las localidades en unos microsatélites. Ejemplificando lo mencionado, se presentan dos imágenes de los geles con los productos de PCR para los microsatélites Hr34 con un tamaño esperado del fragmento entre 222 y 241pb (Figura 9) y el Hr2 con un tamaño esperado del fragmento entre 189 y 211pb (Figura 10), ambos corresponden a la localidad mexicana Punta San José del 2016 (PSJ16).

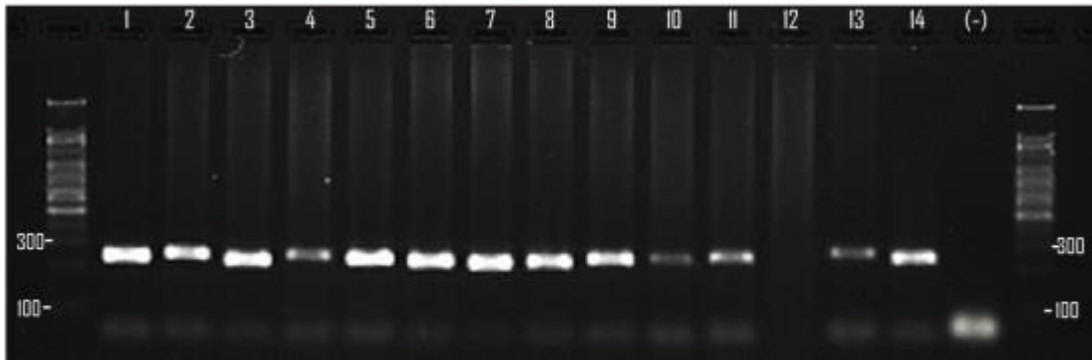


Figura 9. Productos de amplificación del microsatélite Hr34 en la localidad PSJ16, visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en SB 1X a 80 volts por 55 minutos, cargando 3 μ l de producto de PCR con 2 μ l de Gel Red 2X, utilizando escalera Invitrogen™ de 100pb.

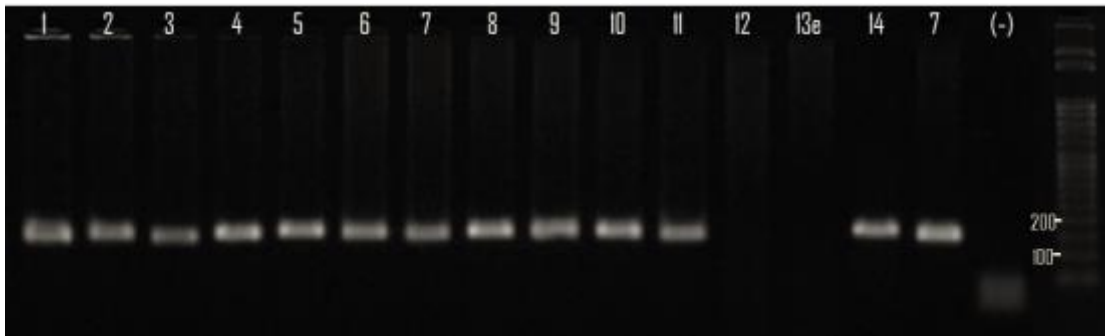


Figura 10. Producto de amplificación del microsatélite Hr2 en la localidad PSJ16, visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en SB 1X a 80 volts por 60 minutos, cargando 3 μ l de producto de PCR con 2 μ l de Gel Red 2X, utilizando escalera Sigma™ de 50pb.

En la figura 9, se observa que el individuo número 13 presentó una amplificación exitosa con el microsatélite Hr34, sin embargo no se obtuvo ningún producto con el Hr2 (Figura 10), en cambio el organismo número 12 en ambos casos no presentó amplificación de los fragmentos esperados.

3.3 Rangos alélicos y matrices de genotipos

Según el rango alélico para cada loci, pudo observarse en este estudio la presencia de alelos nuevos en la mayoría de los microsatélites. La Tabla 4 muestra el número de alelos ausentes y nuevos encontrados por locus estudiado, con base en lo reportado por Aguilar-Espinoza *et al.* (2014),

considerando las 12 localidades evaluadas. Y el único marcador que no presenta ausencia de alelos reportados o presencia de alelos nuevos es el locus Hr30.

Tabla 4. Número de alelos ausentes y nuevos obtenidos para las doce localidades de *H. rufescens* analizadas con los 16 microsatélites reportados por Aguilar-Espinoza *et al.* (2014).

Locus	Número de alelos ausentes	Número de alelos nuevos	Total de alelos en este estudio	Total de alelos reportados
Hr1	0	5	23	18
Hr2	0	10	38	28
Hr6	0	15	26	11
Hr9	0	12	29	17
Hr12	0	17	36	18
Hr16	1	8	23	16
Hr17	0	6	18	12
Hr22	0	1	15	14
Hr23	0	7	24	17
Hr28	2	9	41	34
Hr29	2	6	24	20
Hr30	0	0	21	21
Hr31	2	2	20	20
Hr32	0	14	40	25
Hr33	0	18	32	14
Hr34	2	1	19	20
Total	9	131	429	305

Ya que la amplificación de cada microsatélite varía entre población e individuo, se estableció que cada individuo amplificara en al menos el 80% de los marcadores. En los marcadores microsatélites se descartaron los que no cumplieran con al menos el 70% de los individuos amplificados. Se utilizó el consenso de las matrices, para determinar que el número total de marcadores para evaluar la diversidad genética de las 12 localidades fuese de diez microsatélites (Anexo C; Tabla 11).

De estos diez marcadores usados para los análisis, se identificaron por tamaño (pb) el número de alelos nuevos presentes (Anexo C; Tabla 12), con la finalidad de observar que poblaciones cuentan con la presencia de estos alelos (Tabla 5), de igual manera se realizó la esquematización visual de las frecuencias de todos los alelos encontrados en cada marcador por cada localidad (Anexo D; Figura 25 a 34). Esto permite apreciar el cambio de la frecuencia de un mismo alelo dentro de todas las localidades, e incluso identificar su ausencia.

Tabla 5. Número de alelos nuevos por locus y por localidad de *H. rufescens* analizadas con los diez marcadores microsatélites.

Locus	Código de las localidades											
	CCY99	VDM99	VDM07	SMI07	SPT11	STT14	PSJ16	ROS12	SQN12	PMB13	PMB14	PMB15
Hr1			1								5	
Hr2	1			1	1						9	
Hr6	1		3	4	3						9	6
Hr9											12	
Hr16	1		2								8	
Hr17	2			1							6	
Hr23				1	1						7	
Hr31				1							1	
Hr32			1								14	
Hr33	1		1	1	2		4				10	

3.4 Diversidad genética de *Haliotis rufescens* en localidades silvestres y lotes de cultivo

3.4.1 Diversidad genética por localidad

Los parámetros genéticos poblacionales fueron calculados con un total de 453 individuos, el número de individuos muestreados para cada localidad varió desde los 12 (PSJ16) a 51 organismos (PMB14) (Tabla 6). La localidad con el mayor número de alelos (N_a) fue VDM99 con un promedio de 13 alelos, mientras que PSJ16 fue la localidad que presentó en menor número (6) de alelos; por lo cual al comparar este parámetro entre localidades se observan diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p < 0.05$) (Figura 11), además PSJ16 es estadísticamente diferente de STT14 y el lote de cultivo PMB14, con 12 alelos cada una. Por otra parte, el valor de riqueza alélica (R_a) vmenor se observó en ROS12 (5.6) y el mayor en VDM99 (8.3). Al comparar la R_a entre localidades, se observa que la localidad ROS12 (5.6) es estadísticamente diferente de VDM99 (8.3) y STT14 (8.0) ($p < 0.05$); además que VDM99 (8.3) es estadísticamente diferentes del segundo valor mínimo de PSJ16 (5.7) ($p < 0.05$) (Figura 12). Respecto al número de alelos efectivos (N_e), VDM99 presento el valor más alto con un promedio de 7.8 alelos; mientras que, PSJ16 presentó el valor mínimo promedio de 3.8 alelos, siendo estas las únicas con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) (Figura 13). Por otra parte, el mayor número de alelos privados (A_P) lo presentó el lote de cultivo de Eréndira PMB14 que

presentó 69 alelos nuevos únicos. Mientras que CCY99 y los lotes de cultivo ROS12 y SQN12 no presentaron ningún alelo privado o exclusivo que las diferencia del resto.

Tabla 6. Parámetros genéticos poblaciones promedio usando diez marcadores microsatélite en poblaciones silvestres y lotes de cultivo de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) de California y Baja California.

Población	Año	Código	N	Na	Ra	Ne	AP	Ho	He	EHW	F _{IS}
Silvestre											
Crescent City, CA	1999	CCY99	27	8	6.1	4.5	0	0.492	0.761	***	0.370*
Van Damme, CA	1999	VDM99	45	13	8.3	7.8	7	0.570	0.854	***	0.342*
Van Damme, CA	2007	VDM07	42	10	6.7	5.4	5	0.544	0.795	***	0.326*
San Miguel island, CA	2007	SMI07	33	10	7.3	6.0	1	0.501	0.815	***	0.399*
Salt Point, CA	2011	SPT11	32	10	6.9	5.9	1	0.486	0.818	***	0.419*
Santo Tomás, B.C.	2014	STT14	33	12	8.0	6.9	8	0.788	0.837	***	0.074
Punta San José, B.C.	2016	PSJ16	12	6	5.7	3.8	4	0.426	0.695	***	0.425*
Cultivo											
El Rosario, B.C.	2012	ROS12	45	9	5.6	4.3	0	0.455	0.692	***	0.353*
San Quintín, B.C.	2012	SQN12	46	8	5.9	4.3	0	0.396	0.732	***	0.468*
Eréndira, B.C.	2013	PMB13	31	8	6.2	5.0	2	0.484	0.764	***	0.381*
Eréndira, B.C.	2014	PMB14	51	12	7.7	6.6	69	0.418	0.838	***	0.508*
Eréndira, B.C.	2015	PMB15	44	10	6.0	4.4	3	0.397	0.740	***	0.473*

Número de individuos colectados por localidad (N), número de alelos (Na), riqueza alélica (Ra), alelos efectivos (Ne), alelos privados (AP), heterocigotos observados (Ho), heterocigotos esperados (He), significancia estadística del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y coeficiente de endogamia (F_{IS}); * estadísticamente significativo ($p < 0.05$) y *** altamente significativo ($p < 0.001$)

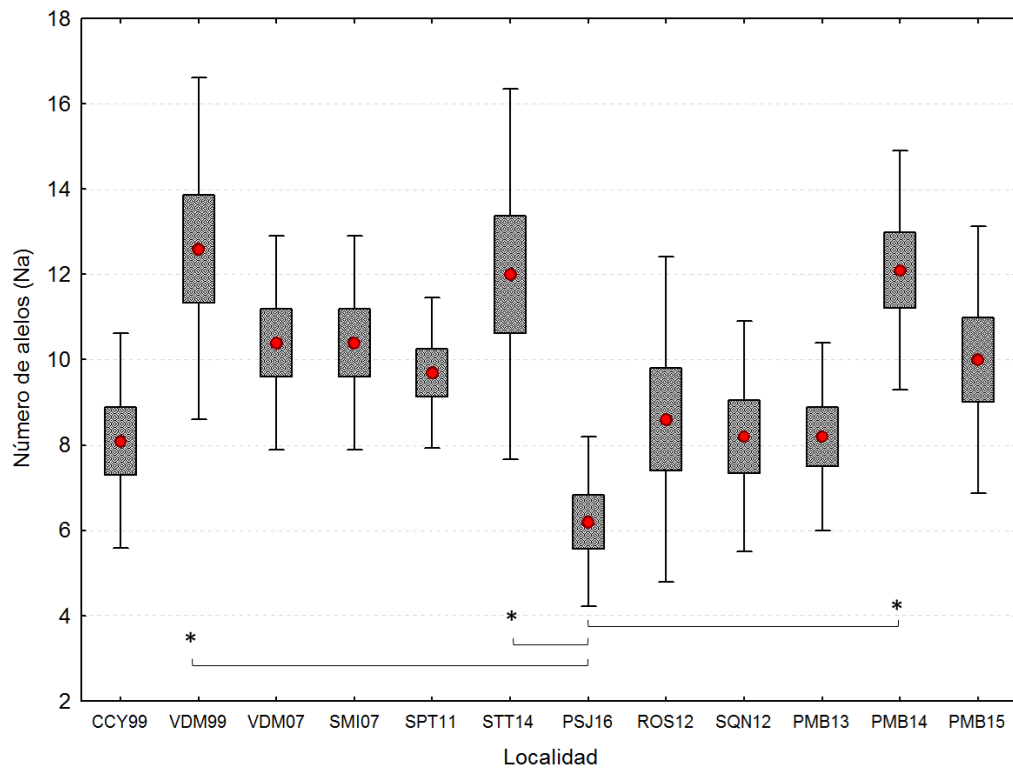


Figura 11. Valores promedio en el número de alelos (Na) en 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con diez marcadores microsatélite, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$

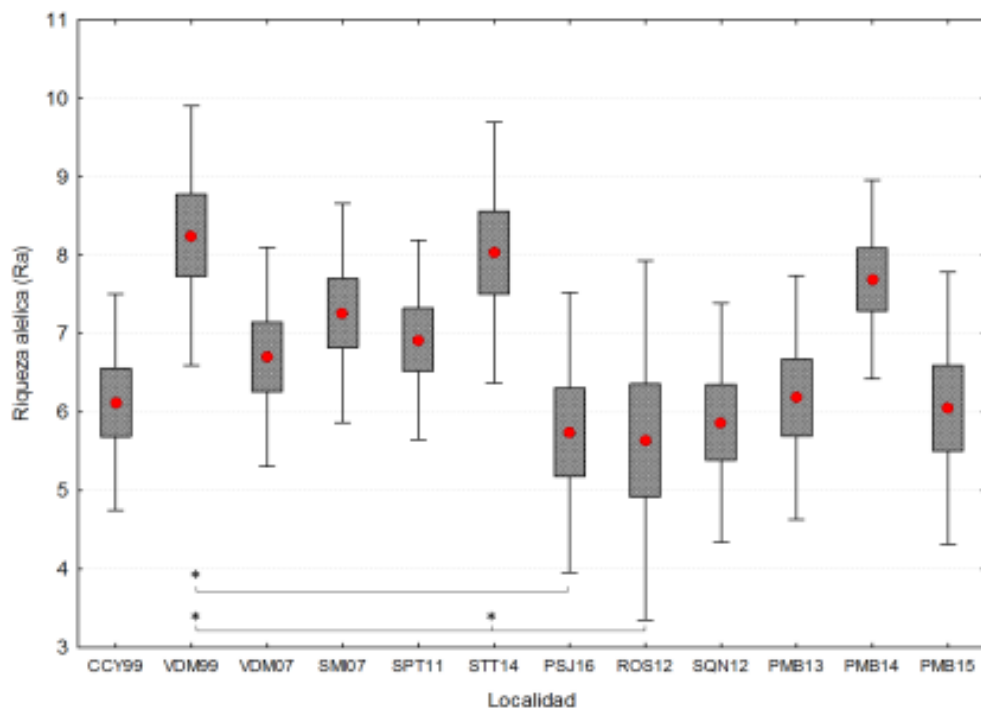


Figura 12. Valores promedio en la riqueza alélica (Ra) en 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con diez marcadores microsatélite, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$

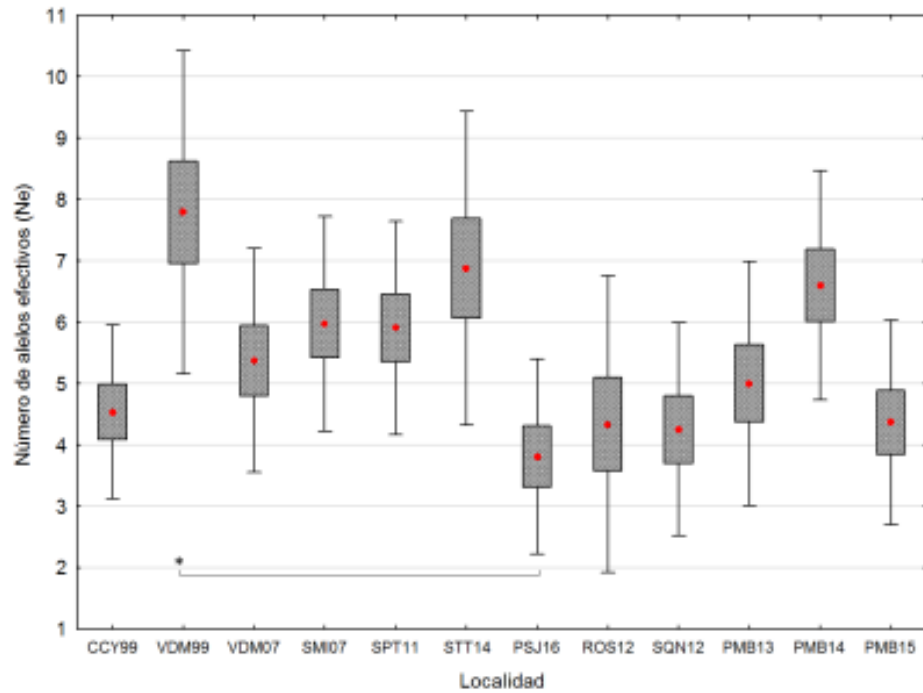


Figura 13. Valores promedio del número de alelos efectivos (N_e) en 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con diez marcadores microsatélite, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$

En todas las localidades de abulón rojo la heterocigosidad observada (H_o) promedio fue significativamente menor que la heterocigosidad esperada (H_e) ($p < 0.001$). Dando como resultado un desequilibrio de Hardy-Weinberg en todas ellas. Los valores de H_o promedio variaron de 0.396 (SQN12) a 0.788 (STT14). Sin embargo, debido a la alta variabilidad entre los diez marcadores evaluados, al comparar las 12 localidades no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.1457$) (Figura 14a). Mientras que, la localidad con la mayor H_e fue VDM99 (0.854). En cambio, la menor H_e se encontró en la localidad ROS12 (0.692). En este caso, existen diferencias significativas en la H_e entre localidades ($p = 0.008$) (Figura 14b). Siendo las localidades VDM99 y PSJ16 las que presentaron diferencias altamente significativas.

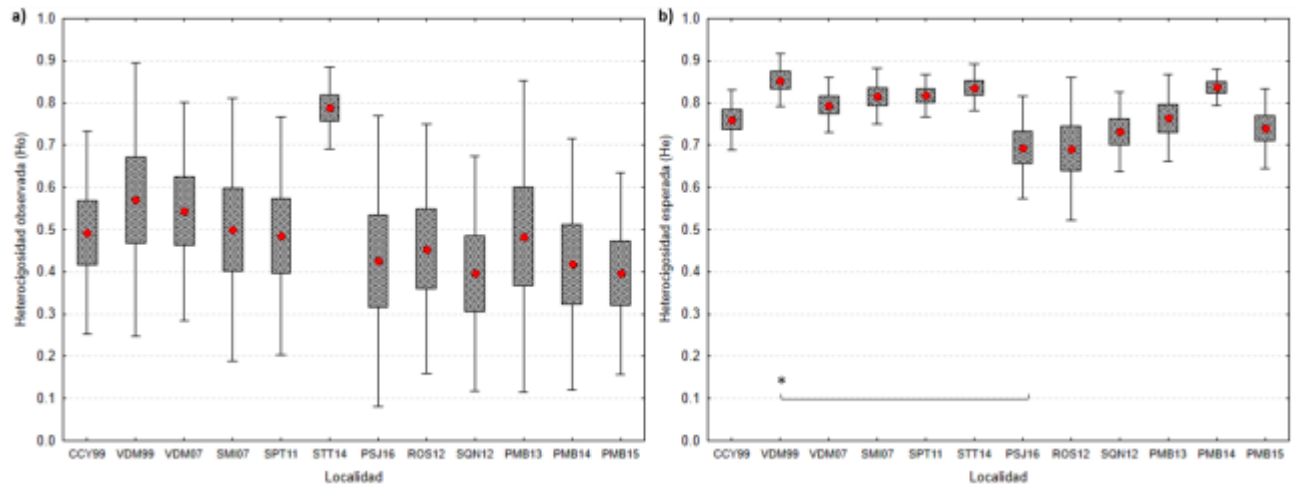


Figura 14. Valores promedio del número de a) heterocigosidad observada (H_o) y b) heterocigosidad esperada (H_e) en 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con diez marcadores microsatélite, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$

Por otra parte, en los valores del coeficiente de endogamia (F_{IS}) observamos que el lote de cultivo con el valor más alto (0.508) fue PMB14 (N=51), en contraste con STT14 (N=33) que presentó el menor valor de endogamia (0.074) (Tabla 6; Figura 15). A pesar de que no se observan diferencias entre los valores de F_{IS} entre localidades ($p=0.1524$), STT14 es la única localidad que se encuentra en panmixia (reproducción aleatoria), el resto de las localidades tuvieron valores promedio con tendencia moderada a la endogamia (promedio = 0.405 con 0.05 de desviación estándar).

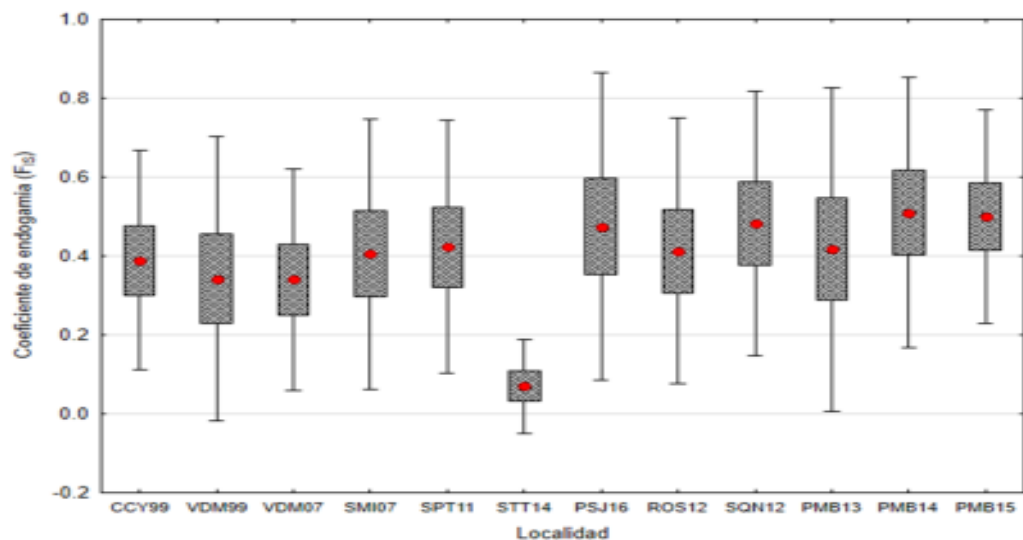


Figura 15. Valores promedio del coeficiente de endogamia (F_{IS}) en 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con diez marcadores microsatélite, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$

3.4.2 Diversidad genética de poblaciones silvestres vs lotes de cultivo

Comparando el número de alelos promedio (N_a) de *H. rufescens* obtenidos en las localidades silvestres contra los lotes de cultivo, se observó una disminución del 4.6%, la cual no fue significativamente diferente ($p=0.337$) (Figura 16a). Sin embargo, la riqueza alélica ($p=0.026$) y la heterocigosidad observada ($p=0.025$), se observa que en los lotes de cultivo estos parámetros son significativamente menores que las localidades silvestres (Figura 16b); (Figura 17a). Mientras que, el coeficiente de endogamia (F_{IS}) fue significativamente mayor en los lotes de cultivo ($p = 0.010$) (Figura 16b).

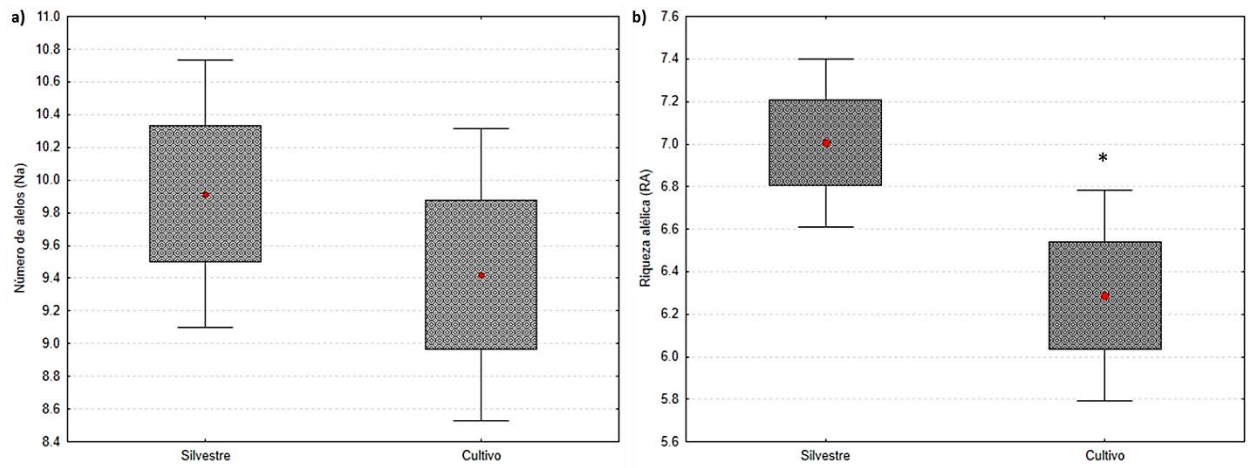


Figura 16. Comparación en a) número de alelos (N_a) y b) riqueza alélica (R_a) promedio entre localidades silvestres y lotes de cultivo de *H. rufescens*, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$

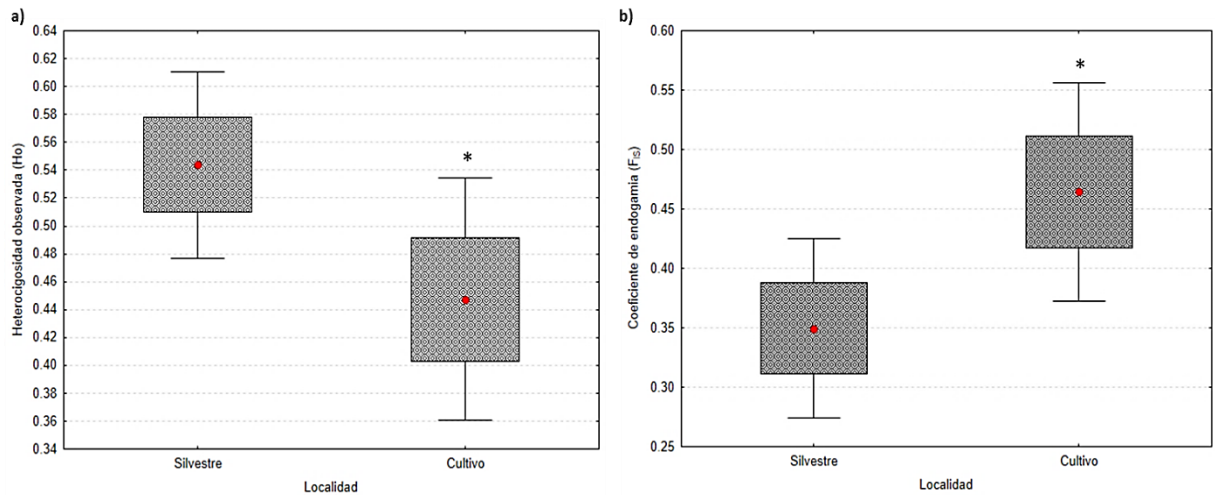


Figura 17. Comparación en a) Heterocigosidad observada (H_o) y b) coeficiente de endogamia (F_{IS}) promedio entre localidades silvestres y lotes de cultivo de *H. rufescens*, el punto rojo representa la media y las líneas representan la desviación estándar. Comparaciones múltiples según su significancia: * = $p < 0.05$.

3.5 Diferenciación genética de *H. rufescens* en localidades silvestres y lotes de cultivo

Los valores de F_{ST} de 0.062 a 0.254 muestran que todas las poblaciones son estadísticamente diferentes entre ellas ($p < 0.05$). Encontrándose, en promedio las mayores diferencias entre los lotes de cultivo con valores de F_{ST} (0.127-0.233); mientras que entre poblaciones silvestres la variación fue entre 0.062 a 0.242, siendo el lote de cultivo PMB14 el que presentó los valores de diferenciación más altos (0.134-0.233), con respecto al resto de las localidades silvestres y lotes de cultivo.

Particularmente, entre las localidades silvestres, se encontró que VDM99 mostró menor grado de diferenciación (0.062-0.136). Y por el contrario, CCY99 y PSJ16 ($F_{ST}=0.242$) mostraron mayor grado de diferenciación, éstas últimas son las más distantes geográficamente y espacialmente, con 1,584 km de distancia (Tabla 2), además de 17 años de diferencia entre muestreos. Y de ellas, PSJ16 mostró los valores mayores de F_{ST} (0.083-0.242).

Finalmente, las diferencias entre las localidades silvestres y lotes de cultivo se encuentran entre (0.094-0.254), siendo CCY99 la localidad con mayor grado de diferenciación en comparación con los lotes de cultivos (0.161-0.254), además de presentar el mayor valor de F_{ST} (0.254) cuando se comparó con ROS12 (Tabla 7).

Tabla 7. Análisis de diferenciación genética entre pares de localidades basados en el estimador F_{ST} , datos de las localidades silvestres resaltadas en negrita. Todos los valores son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Código de las localidades												
	CCY99	VDM99	VDM07	SMI07	SPT11	STT14	PSJ16	ROS12	SQN12	PMB13	PMB14	PMB15
CCY99	-											
VDM99	0.136	-										
VDM07	0.176	0.081	-									
SMI07	0.084	0.099	0.112	-								
SPT11	0.105	0.084	0.126	0.091	-							
STT14	0.124	0.062	0.111	0.101	0.084	-						
PSJ16	0.242	0.083	0.131	0.191	0.184	0.148	-					
ROS12	0.254	0.120	0.158	0.190	0.188	0.163	0.200	-				
SQN12	0.224	0.108	0.155	0.174	0.137	0.128	0.196	0.180	-			
PMB13	0.204	0.113	0.144	0.149	0.148	0.146	0.195	0.141	0.151	-		
PMB14	0.161	0.137	0.171	0.149	0.150	0.134	0.205	0.233	0.205	0.186	-	
PMB15	0.214	0.094	0.101	0.158	0.154	0.110	0.153	0.127	0.181	0.156	0.199	-

3.6 Estructura genética poblacional de *Haliotis rufescens* en poblaciones silvestres y lotes de cultivo

Para inferir la relación genética de las localidades, se implementó un análisis exploratorio utilizando el programa STRUCTURE (versión 2.2.3). En el primer análisis, se consideró la existencia de 1 a 14 componentes genéticos. Posteriormente, utilizando el criterio de agrupación, que sugiere la presencia de dos componentes principales ($K=2$) (Figura 18), se realizó el segundo análisis de las doce localidades, éste permitió conocer el porcentaje genético de los dos componentes dentro de cada individuo (Figura 19).

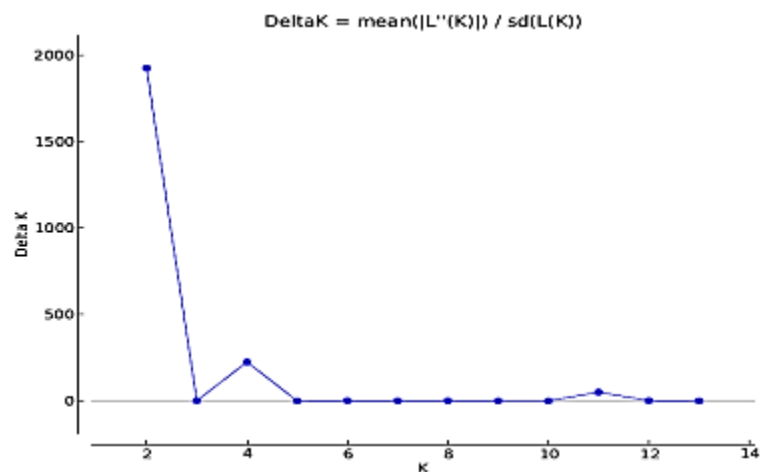


Figura 18. Estimación del número de poblaciones sugeridos por STRUCTURE HARVESTER para las localidades de *H. rufescens* analizadas derivado de Δk para K de 1 a 14 posibles poblaciones.

Éste mostró que, en la mayoría de las localidades, predomina el componente rojo, por lo cual es posible agrupar a CCY99, VDM99, VDM07, SMI07, STT14, PSJ16, ROS12, SQN12, PMB13 y PMB15 dentro del Grupo 1. En del cual, la presencia del componente verde que varía desde 0.2% hasta el 2.4% dependiendo de la localidad. Mientras que, los organismos correspondientes al lote de cultivo PMB14, está representa por un 99.8% del componente verde, siendo diferente del resto (Figura 19).

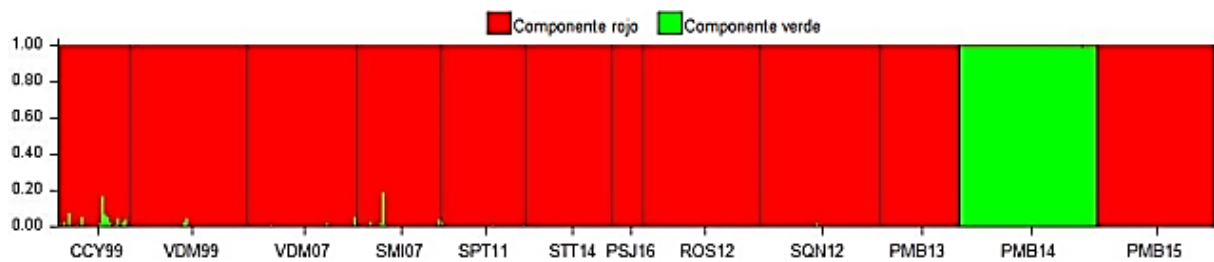


Figura 19. Componentes genéticas de 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con K=2, los componentes se representan por un color (rojo y verde), donde cada barra vertical constituye a un individuo y la proporción del color representa la cantidad de cada componente dentro del individuo.

Debido a la baja resolución obtenida, se optó por excluir del análisis a el lote de cultivo PMB14 ya que como se ha visto desde la asignación de los genotipos y el gran número de alelos privados (AP=69; Tabla 6) se considera como una localidad genéticamente diferente, por lo cual puede estar provocando un sesgo en el análisis global y por ello no se aprecian las diferencias, observadas con el estimador F_{ST} , entre las localidades del Grupo 1.

Por lo anterior, se realizó un tercer análisis consideró desde 1 hasta 13 componentes genéticos (K) dentro de once localidades (eliminando PMB14). Donde el criterio de agrupación de "Evanno" sugirió la presencia de dos componentes principales. Por consiguiente, se realizó el cuarto análisis con un K=2, en el que se observan dos grupos (Figura 20), el primer grupo pertenece a las localidades compuestas principalmente del componente rojo, que incluyen a CCY99, SMI07, SPT11 y STT14, donde CCY99 está constituida por un 99.6% del componente rojo. Consecuentemente, el segundo grupo se conforma por las localidades VDM99, VDM07, PSJ16, ROS12, SQN12, PMB13 y PMB15 que en su mayoría presentan el componente verde y PSJ16 posee la mayor representación del componente con un 99.4% (Figura 20).

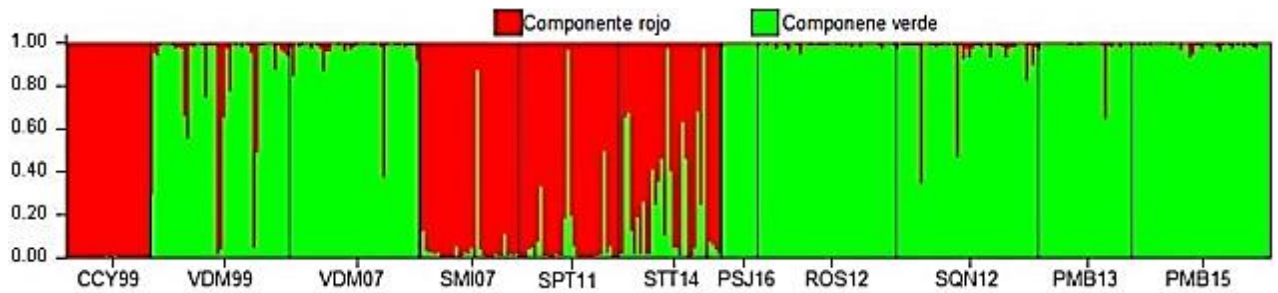


Figura 20. Componentes genéticas de once localidades de *H. rufescens* analizadas con $K=2$, los componentes se representan por un color (rojo y verde), donde cada barra vertical constituye a un individuo y la proporción del color representa la cantidad de cada componente dentro del individuo.

Dado lo anterior, se optó por realizar un análisis más, en el cual se consideró 3 componentes genéticos ($K=3$). Mostrando que los lotes de cultivo ROS12, SQN12, PMB13 y PMB15 comparten una organización de componentes similar a la localidad silvestre de Van Damme, California para los dos años que se tienen de muestreo (VDM99 y VDM07), así como con la localidad silvestre mexicana PSJ16 (Figura 21), lo cual permite designarlas dentro de un mismo grupo mayormente influenciado por el componente azul. En cambio, localidades de California CCY99, SMI07 y SPT11 presentan componentes afines a la localidad STT14 en México, definidas principalmente por el componente verde, permitiendo agruparlas. Finalmente, las muestras provenientes del lote de cultivo denominado PMB14 están definidas principalmente por el componente rojo sin embargo, aún puede notarse la presencia de los componentes verde y azul dentro de la localidad con un 0.3% y 0.2% respectivamente (Figura 21 y Tabla 8).

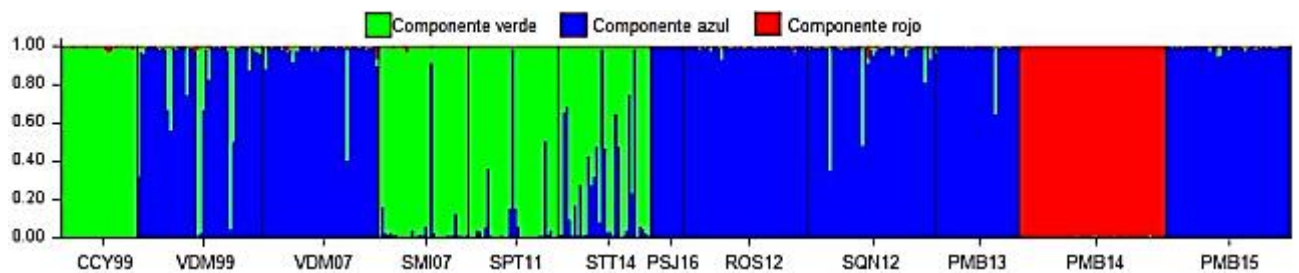


Figura 21. Componentes genéticas de 12 localidades de *H. rufescens* analizadas con $K=3$, los componentes se representan por un color (verde, azul y rojo), donde cada barra vertical representa a un individuo y la proporción del color representa la cantidad de cada componente dentro del individuo.

A pesar de que el componente rojo no fue gráficamente apreciable en la figura 21 por su bajo porcentaje de participación en la composición genética, se encontró presente en todas las localidades

analizadas. En CCY99 la presencia del componente rojo es tan solo de un 0.7%, en cambio el 99% los sus individuos estuvieron conformados por el componente verde y tan sólo un 0.2% de componente azul. Presentando SPT11, PSJ16 y PMB13 el menor valor (0.2%) de influencia del componente genético rojo (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de los componentes genéticos principales dentro de las 12 localidades de *H. rufescens*, resaltando en negritas las localidades silvestres.

Código de localidad	Componente		
	Verde	Azul	Rojo
CCY99	99.0%	0.2%	0.7%
VDM99	13.2%	86.5%	0.4%
VDM07	2.6%	97.0%	0.5%
SMI07	94.8%	4.7%	0.4%
SPT11	92.1%	7.6%	0.2%
STT14	75.3%	24.5%	0.3%
PSJ16	0.3%	99.5%	0.2%
ROS12	0.7%	99.1%	0.3%
SQN12	3.9%	95.7%	0.4%
PMB13	1.7%	98.1%	0.2%
PMB14	0.3%	0.2%	99.5%
PMB15	0.7%	99.0%	0.3%

Respecto a la composición genética en las localidades a través del tiempo, se observó que Van Damme en ambos años, presenta influencia principalmente por el componente azul, sin embargo es notorio el cambio de proporciones de los componentes que la conforman ya que en 1999 se observa un 13.2% del componente verde, el cual disminuye su proporción dentro de los individuos hasta un 2.6% en los ocho años subsecuentes, así como un pequeño aumento del 0.4% al 0.5% del componente rojo (Tabla 8 y Figura 21).

En localidades del mismo año, en ambos casos, pude observarse una diferenciación genética. En 1999 la localidad de Crescent City (CCY99) está definida por el componente verde en un 99.0%, seguida de un 0.7% del componente rojo, en cambio, la localidad Van Damme (VDM99) se encuentra conformada

en un 86.5% del componente azul. Entre las localidades del 2007, se observa que Van Damme (VDM07) permanece conformada mayoritariamente por el componente azul (97.0%) mientras que la localidad de Isla San Miguel Island (SMI07) se encuentra influenciada en un 94.8% por el componente verde con un 4.7% del componente azul (Figura 21).

3.7 Relaciones genéticas entre localidades silvestres

De acuerdo al análisis de relaciones genéticas entre localidades silvestres, basado en distancias genéticas geométricas de Cavalli-Sforza y considerando la ubicación geográfica de cada una, no es posible identificar algún patrón de agrupación con respecto a la distribución latitudinal de la especie. Sin embargo, el dendograma generado muestra dos grupos principales, el primer grupo se encuentra conformado por cuatro localidades de las cuales tres provienen de California (CCY99, SMI07 y SPT11) y una de México (STT14), con una distancia geográfica máxima de 1,571 km entre las localidades más distantes (CCY99 y STT14). El segundo grupo está constituido por tres localidades, de las cuales dos pertenecen geográficamente al mismo punto en California, pero diferentes años (VDM07 y VDM99) y la tercera localidad es la más sureña mexicana (PSJ16), teniendo una distancia aproximada de 1,259 km entre ellas.

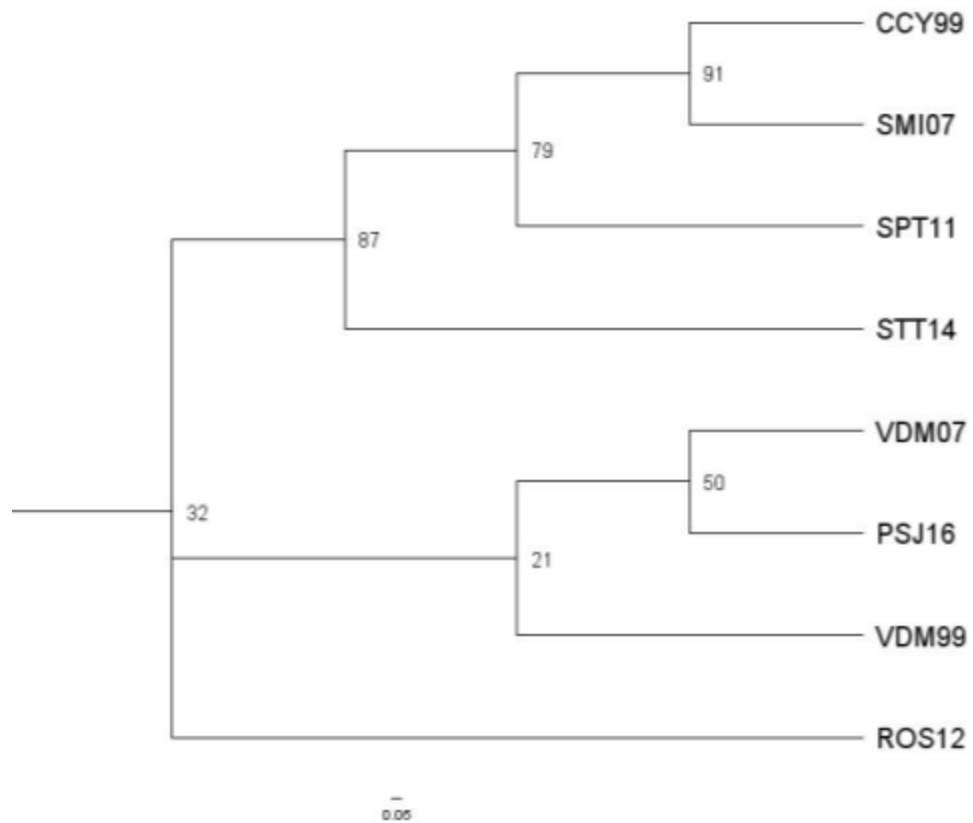


Figura 22. Relaciones genéticas entre poblaciones silvestres de *Haliotis rufescens* usando un dendrograma basado en distancias genéticas geométricas de Cavalli-Sforza y el método del vecino más cercano.

3.8 Relaciones genéticas entre lotes de cultivo

Un segundo análisis de relaciones genéticas se realizó con los lotes de cultivo, los cuales presentan un clado principal donde se agrupan los lotes de cultivo ROS12, SQN12, PMB13 y PMB15 (Figura 23). De acuerdo al análisis de agrupación poblacional realizado con STRUCTURE, el principal componente genético de las localidades de cultivo es azul con una pequeña influencia del componente verde (Figura 21).

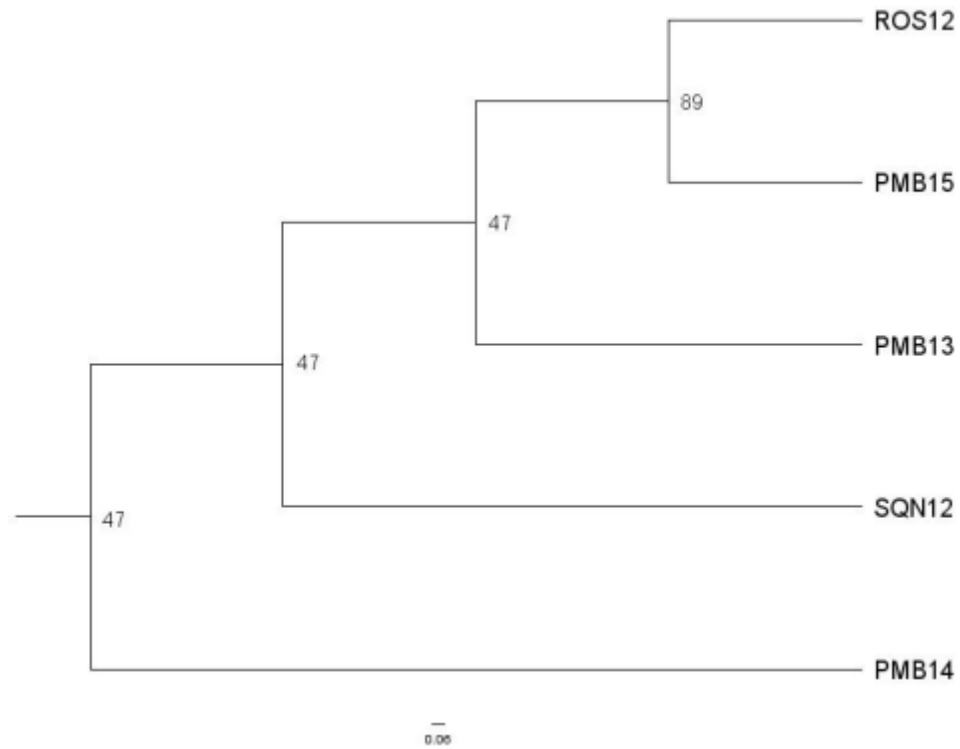


Figura 23. Relaciones genéticas entre localidades de cultivo de *Haliotis rufescens* usando un dendrograma basado en distancias geométricas de Cavalli-Sforza y el método del vecino más cercano, realizado con 8,000 simulaciones.

3.8 Migración genética

Utilizando las frecuencias alélicas y distancias geográficas se logró estimar el número de migrantes por generación entre las localidades del mismo año CCY99 vs VDM99 con una distancia de 325km y VDM07 vs SMI07 con una distancia de 659km, se observó que ambas localidades presentan una migración de 0.0003 individuos por generación independientemente de la distancia que existe entre ellas. Así mismo, se determinó que el flujo significativo de individuos es de localidades norteñas hacia localidades sureñas, indicado con el sentido de la flecha roja en el mapa (Figura 24).



Figura 24. Migración de individuos por generación representada por números en color blanco, las flechas rojas indican el flujo y distancias geográficas en kilómetros entre los puntos en color amarillo.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Parámetros genéticos poblacionales

En este estudio, para evaluar la diversidad genética de *H. rufescens* en California y Baja California, se utilizaron los marcadores microsatélite especie específicos desarrollados por Aguilar-Espinoza *et al.*, (2014), con los cuales se observó un aumento del rango alélico establecido por el autor, ocasionado por la presencia de alelos nuevos que no habían sido reportados (Tabla 5) debido a que se analizó un mayor número de poblaciones e individuos; seis localidades silvestres y cinco lotes de cultivo dando un total de 441 abulones (Tabla 6), contra las evaluadas por Aguilar-Espinoza *et al.*, (2014) de una población silvestre de México y dos lotes de cultivo de Chile con un total de 96 abulones.

Asimismo, en el estudio de Aguilar-Espinoza *et al.*, (2014), el locus Hr33 no fue utilizado para el cálculo de los parámetros genéticos dado que resultó monomórfico con un alelo exclusivo para Chile y otro para México. En nuestro caso, este locus presentó de 9 a 14 alelos por localidad, con un total de 19 alelos en las 12 localidades evaluadas en este estudio (Anexo C; Tabla 12). Otro aspecto importante a considerar es la diferencia en las metodologías usadas para el análisis de fragmentos ya que en este estudio se utilizó electroforesis capilar de alta resolución mientras que Aguilar-Espinoza *et al.*, (2014) evaluaron el polimorfismo en geles de poliacrilamida, los cuales tienen una menor resolución, además de ser más complicados de analizar.

También, es necesario mencionar que el recurso abulón rojo fue introducido a Chile desde 1977 de organismos provenientes de California y Baja California (Flores-Aguilar, Gutiérrez, Ellwanger y Searcy-Bernal, 2007) y no se han realizado nuevas introducciones de organismos a este país desde entonces; dando como consecuencia una pérdida de diversidad genética en cultivos de abulón rojo en Chile (Lafarga-De La Cruz, Del Río-Portilla y Gallardo-Escárate, 2010). Actualmente se están buscando los medios para aumentar el acervo (“pool”) genético del abulón rojo en Chile mediante la introducción de nuevos parentales silvestres, o bien, a través de estrategias de hibridación interespecífica (comunicación personal con Rodrigo Sepúlveda, Jefe de Producción de Cultivos de Abalón de Camanchaca, Chile).

En el presente estudio, se pueden apreciar alelos privados (exclusivos) y alelos raros (baja frecuencia). La presencia de alelos exclusivos se observó en nueve de las 12 localidades evaluadas (Tabla 6) y la mayor incidencia fue encontrada en el lote de cultivo PMB14 (AP=69). Estos alelos exclusivos se reportan generalmente dentro de las granjas en bajas frecuencias (< 0.100), asociados al limitado

número de reproductores y a las estrategias de reproducción utilizadas en centros de cultivo (Evans, Bartlett, Sweijd, Cook y Elliott, 2004). Sin embargo, en nuestro estudio en algunos casos estos alelos exclusivos se presentaron en frecuencias moderadas a altas (0.100 a 0.600) (Anexo D). Por ejemplo, para el locus Hr33 en la localidad silvestre PSJ16 existe el alelo exclusivo con un tamaño de 168pb y una frecuencia de 0.636, por lo cual las frecuencias alélicas de los alelos privados difieren con el comportamiento reportado. La presencia de alelos exclusivos le infiere la ventaja a la localidad o lote, de ser potencial reservorio de alelos nuevos, por lo cual estas poblaciones o lotes podrían ser utilizados en programas de crianza mediante cruzamientos dirigidos para aumentar la diversidad genética de la progenie (Cadima, Veramendi y Gabriel, 2013; Lafarga-de la Cruz, Aguilar-Espinoza y Gallardo-Escárte, 2015)

Aunque estos alelos raros se presentan en pocas localidades silvestres, esto no significa que no estén presentes en las demás, simplemente que al poseer bajas frecuencias el tamaño de muestra tendría que aumentarse para poder detectarlos. Además, en el presente estudio estos alelos raros están principalmente dentro de los alelos no detectados en las poblaciones estudiadas por Aguilar-Espinoza *et al.* (2014).

Por ahora no es posible relacionar la presencia de estos alelos no registrados con alguna característica fenotípica, la selección de reproductores por características de interés comercial puede ser la razón más probable por la cual se presenta la diferencia de frecuencias alélicas en el lote PMB14. Además se estima que un desove masal en granja de abulón aproximadamente el 40% de los individuos son los que contribuyen, lo cual está relacionado generalmente con los diferentes grados de maduración de cada individuo (Elliott, 2000; Martínez, 2005). Exceptuando el lote PMB14, en general los alelos más comunes en el medio silvestre son similares a los más comunes en granja, concordando con lo reportado en cultivos de *H. rubra* en Australia y *H. midae* en Sudafrica (Evans *et al.*, 2004).

Comparando el número de alelos promedio (N_a) de *H. rufescens* obtenidos en las localidades silvestres contra los lotes de cultivo, se observa una disminución del 4.6%. Sin embargo, no es significativamente diferente (Figura 16a). Algo similar fue reportado en *H. midae* al comparar el N_a entre lotes y localidades silvestres, en este caso se observa una pérdida del 9.1%, la cual no es significativa, debido a que es la primera generación filial (F1) utilizando reproductores tomados del medio silvestre (Slabbert *et al.*, 2009). Por lo cual, reportaron que la diversidad genética dentro de la granja fue representativa de la diversidad en el medio natural, en lotes donde más del 90% de los individuos usados en los desoves contribuyen a la descendencia (Slabbert *et al.*, 2009). Sin embargo, estos autores también reportaron que en uno de los lotes de cultivo observaron una reducción del 63% en el número de alelos promedio respecto de sus parentales silvestres. En concordancia con otras

especies de abulones en cultivo donde se han observado pérdidas significativas en la diversidad genética: *H. discus* con una reducción del 76%, en *H. midae* varía entre un 37.5% a 40% y en lotes de *H. rubra* se presenta una pérdida de hasta el 35% de los alelos silvestres (Evans *et al.*, 2004; Hara y Sekino, 2007; Li, Shu yu y Tian, 2007).

Considerando el número de alelos de las localidades silvestres presentes en los nueve locus, que comparte el presente estudio con el desarrollado por Aguilar-Espinoza *et al.* (2014), es posible identificar un decremento del 36.32% en la población mexicana y un 56.22% en la población chilena, ambas pérdidas evidentemente mayores a la encontrada para los lotes de cultivo que se evaluaron en este estudio. Esto puede deberse en parte a la naturaleza del marcador genético, así como, a la cantidad y diversidad del muestreo ya que al tener un tamaño de muestra mayor, el número de alelos observados aumenta, brinda la posibilidad de detectar alelos de bajas frecuencias y puede modificar la distribución de frecuencias (Bashalkhanov, Pandey y Rajora, 2009; Cadima *et al.*, 2013).

Debido a que la cantidad de alelos varía dependiendo del número de individuos analizados, es necesario realizar la comparación de la riqueza alélica (R_a), la cual permite contrastar muestras de diferentes tamaños, además de ser un estimador importante de la diversidad genética, donde los valores mayores están asociados con la capacidad de la población de responder a situaciones adversas. Al comparar la riqueza alélica de los lotes de cultivo contra las localidades silvestres se observa una tendencia de disminución significativa (Figura 16b), llegando a obtener una disminución del 10% de la riqueza alélica. Al igual que con el número de alelos, la riqueza alélica en otras especies de *Haliotis* se ve disminuida al ser comparada entre lotes de cultivo y poblaciones silvestres. Por ejemplo, en *H. discus* existe el reporte de una pérdida de riqueza del 35 al 36% en organismos de granja (Hara y Sekino, 2007; Bashalkhanov, Pandey y Rajora, 2009; Marchant, Haye, Marín y Winkler, 2009)

En el análisis por localidades, el presente estudio no determinó diferencias significativas entre los valores promedio de heterocigosidad observada (H_o) para los 10 marcadores microsatélite analizados (Figura 14a) debido a la alta variabilidad de los datos. Sin embargo, es evidente que en las localidades silvestres los valores promedios de H_o , son ligeramente mayores que en los lotes de cultivo. Lo cual se refuerza al comparar las localidades silvestres y los lotes de cultivo, donde se observan diferencias significativas ($p = 0.025$) (Figura 17a). Por el contrario, según los estudios para las especies *H. midae* y *H. rubra*, los valores de H_o obtenidos para las muestras de granja y sus contrapartes silvestres son muy similares (Evans *et al.*, 2004). Los niveles de heterocigosidad observada pueden ser mantenidos altos al generar estrategias de reproducción adecuadas y dar seguimiento al pedigrí de los lotes de reproductores, evitando así mismo una alta consanguinidad y manteniendo el coeficiente de endogamia bajo (Lafarga-De La Cruz *et al.*, 2010). Por otra parte, al analizar la heterocigosidad

esperada (H_e) entre poblaciones silvestres y lotes de cultivo (Figura 14b) se observa que en las poblaciones naturales estos valores son más altos. En concordancia con nuestras observaciones, Hara y Sekino (2007) al realizar una comparación similar considerando la heterocigosidad esperada (H_e) determinan diferencias significativas con una disminución en los lotes de cultivo.

Al comparar los valores de heterocigosidad observada (H_o) contra la esperada (H_e), en este estudio, se identifica que los valores de H_e en todas las localidades son mayores a los obtenidos para H_o (Tabla 6). Por lo cual, en términos de riqueza alélica y heterocigosidad, puede sugerirse una pérdida de la diversidad genética dentro de los lotes de cultivo al ser comparados con las poblaciones silvestres de *H. rufescens*, en concordancia con otros estudios en haliótidos y en la misma especie (Li *et al.*, 2004; Gutierrez-Gonzalez y Perez-Enriquez, 2005; Lafarga-De La Cruz *et al.*, 2010)

En este estudio, elaborado para conocer la diversidad genética de *Haliotis rufescens* utilizando diez marcadores moleculares microsatélites especie específicos, se determinó que en promedio todas las localidades silvestres y lotes de cultivo se encuentran fuera del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), coincidiendo con los resultados obtenidos para lotes de cultivo de esta especie en Chile y una población silvestre mexicana evaluados por Aguilar-Espinoza *et al.* (2014).

Analizando cada loci para las doce poblaciones de *H. rufescens*, se estableció que 89.2% de los 120 casos en este trabajo (12 poblaciones por 10 marcadores) se encuentran fuera del EHW (Anexo E; Tabla 13). Con una fuerte tendencia de desequilibrio sobre los lotes de cultivo al igual que lo observado en otros estudios (Evans *et al.*, 2004; Hara y Sekino, 2007). En contraste a lo reportado por Aguilar-Espinoza *et al.* (2014), quienes mencionan una discordancia del equilibrio en 59% de los 58 casos analizados. En nuestro estudio, la mayoría de los casos en equilibrio corresponden a localidades silvestres (CCY99, SMI11, STT14 y PSJ16). Sin embargo, es notoria la presencia esporádica de un lote de cultivo (PMB13). Además es la primera ocasión en la cual se reporta un valor para el locus Hr33 ya que a pesar de ser desarrollado por Aguilar-Espinoza *et al.* (2014) no fue utilizado para el análisis de diversidad genética en su estudio, dado que en su caso resultó monomórfico en los lotes de cultivo chilenos (comunicación personal Dra. Lafarga).

Otros estudios en *H. rufescens* realizados con microsatélites heterólogos, mencionan el desequilibrio en el 40% de los marcadores en poblaciones silvestres y en lotes de cultivo en un 82% de los casos, evaluando cuatro lotes con siete microsatélites (Gruenthal *et al.*, 2007; Lafarga-De La Cruz *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2007). Valores similares del número de loci en desequilibrio se reportan para *H. discus hannai* en distintos estudios, con un 25.7%, 46% y 71.4% de los casos analizados (Li *et al.*, 2004, 2007; Hara y Sekino, 2007). En *H. rubra* existe el registro de desequilibrio en el 52% de los casos analizados, causados

dentro de los lotes de cultivo en la misma proporción tanto por exceso de heterocigotos como exceso de homocigotos, contrastando con las localidades silvestres donde todas las desviaciones son por déficit de heterocigotos. En cambio, en *H. midae* el 41.7% de los casos de desviación son debidos al déficit de heterocigotos. (Evans *et al.*, 2004)

En general, en el presente estudio, la mayoría los loci que se encuentran fuera de equilibrio (nueve de diez) son causados por un déficit de heterocigotos y coincide con lo reportado anteriormente por otros autores (Evans *et al.*, 2004; Gruenthal *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2004, 2007). Donde, sólo en el locus Hr23 es producido por exceso de heterocigotos (Hara y Sekino, 2007).

Los resultados de este estudio muestran panmixia solamente en una localidad silvestre mexicana STT14 (F_{IS} promedio para diez marcadores = 0.074; Tabla 6). Sin embargo, al comparar los valores de F_{IS} entre todas las localidades silvestres y lotes de cultivo no se encontraron diferencias significativas debido a la alta variabilidad entre marcadores (Figura 15). Resultados similares son reportados en el estudio de Lafarga-De La Cruz *et al.*, (2010) aunque se tiene la presencia de lotes en panmixia éstos no son estadísticamente diferentes a los lotes que tienden hacia la endogamia, por la gran variación entre los marcadores evaluados. Aguilar-Espinoza *et al.* (2014) reportaron valores promedio de F_{IS} de 0.245 y 0.282, utilizando 29 marcadores polimórficos, con tendencia hacia la endogamia en los lotes de cultivo chilenos y la población silvestre mexicana de *H. rufescens*. Si tomamos en cuenta solamente los nueve marcadores comunes entre nuestro estudio y el realizado por Aguilar-Espinoza *et al.* (2014) es posible observar que los valores promedio de F_{IS} calculados en nuestro estudio son menores que los encontrados por Aguilar-Espinoza *et al.* (2014). Los valores de F_{IS} en ambos estudios varían de 0.038 y 0.452 y al igual que para otras especies de abulón, los valores de F_{IS} en su mayoría tienden hacia la endogamia, en *H. discus* se tiene que en el 65.7% de los casos son diferentes de cero (Li *et al.*, 2007). Algo similar a lo obtenido en este estudio ya que el 63.3% de los valores calculados de F_{IS} (76 de los 120 casos) tienden hacia la endogamia.

Al comparar el valor promedio del coeficiente de endogamia entre las poblaciones silvestres y los lotes de cultivo, observamos un aumento significativo en los lotes de cultivo (Figura 17b). Dicho aumento está relacionado con el bajo número de reproductores, principalmente machos, que aportan a la progenie (Lafarga-de la Cruz *et al.*, 2015; Selvamani, Degnan y Degnan, 2001), además de que los procesos de selección artificial no dirigida basada en fenotipos deseables, con características como alto crecimiento, en familias de medios hermanos o hermanos completos pueden generar alta endogamia (Elliott, 2000; Evans *et al.*, 2004; Hara y Sekino, 2007; Li *et al.*, 2007; Martínez, 2005).

4.2 Diferenciación genética

Con el valor de F_{ST} es posible estimar las diferencias o similitudes entre poblaciones utilizando las frecuencias alélicas. Al igual que en otras especies, como *H. discus* y *H. rubra*, las mayores diferencias se encuentran entre los lotes de cultivo, seguido de la comparación entre poblaciones silvestres y cultivo (Evans *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004). Aunque todos los lotes de cultivo presentan una alta divergencia genética, con valores de F_{ST} entre 0.127 y 0.233, las diferencias no llegan a ser tan grandes como para considerar que provienen de líneas de antepasados de linajes diferentes (Aguilar-Espinoza *et al.*, 2014; Hara y Sekino, 2007).

A pesar de que el presente estudio desarrollado en *H. rufescens*, muestra valores bajos de diferenciación en las frecuencias alélicas entre las localidades silvestres, estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0.005$) por lo cual las poblaciones son distintas entre ellas; Aunque en algunos casos (VDM99/STT14), los valores de diferenciación llegan a ser casi tan pequeños ($F_{ST} = 0.062$) como los reportados para otras especies, donde las poblaciones no son estadísticamente diferentes ($F_{ST} = 0.041$), debido al flujo genético presente en la fase planctónica (Li *et al.*, 2004).

4.3 Análisis de estructura genética

La falta de estructura genética entre las poblaciones de *H. rufescens* puede observarse por ausencia de aislamiento independientemente de la distancia entre las localidades geográficas (Gruenthal *et al.*, 2007; De Wit y Palumbi, 2013), la dispersión de individuos entre las localidades es el mecanismo que reduce la diferenciación genética y limita la formación de estructura en las poblaciones (Putman y Carbone, 2014). La ausencia de relación entre las distancias geográficas y genéticas también se pueden apreciar en la especie *H. cracherodii* (Hamm y Burton, 2000) en donde localidades distantes geográficamente mantienen un flujo genético.

Con más de 1,500 km de distancia geográfica entre las localidades CCY99 y STT14, puede observarse cierto grado de similitud genética dentro de los individuos de ambas localidades. Las similitudes que comparte cada individuo se expresa de manera gráfica por componentes genéticos en distintos colores (Figura 21), los cuales permiten agrupar por semejanzas a cada localidad. Estas semejanzas son simbolizadas con árboles filogenéticos utilizando distancias genéticas (Figura 22 a 23). Donde el lote de cultivo ROS12 fue considerado como grupo externo para mejorar la resolución del dendograma, dadas las diferencias genéticas con las poblaciones silvestres (Figura 22).

Las agrupaciones mostradas son representadas por clados, manteniendo semejanza con los resultados obtenidos por el análisis de componentes y los valores de diferenciación genética. Por lo cual dentro de las localidades silvestres en primer clado denominado, se observa que las menores diferencias en frecuencias alélicas están entre las localidades CCY99 y SMI07, quienes además presentan el menor valor de diferenciación ($F_{ST}=0.084$) (Tabla 7) y ambas están mayormente influenciadas por representación del componente verde en 99.0% y 94.8% (Tabla 8), respectivamente. La presente agrupación mantiene parecidos a lo reportada por Gruenthal *et al.* (2007), quienes a pesar de construir el dendrograma con resultados de AFLP, obtuvieron una agrupación similar. Mencionando ausencia de estructura geográfica, siendo San Miguel Island y Crescent City sus localidades más distantes, con lo cual sugieren diferencias genéticas en las poblaciones.

Sucesivamente en el presente estudio, la localidad con mayor semejanza dentro del clado principal es SPT11, con una influencia de la componente verde del 92.1% y finalmente STT14 con un 75.3% de influencia de la componente. El segundo clado dentro de las localidades silvestres está formado por la localidad Van Damme 1999 y 2007 además de Punta San José 2016, quienes están influenciadas principalmente por la componente azul (Figura 22) desde un 86.5% hasta un 99.5% (Tabla 8). Ya que VDM07 y PSJ16 presentan mayor influencia de la misma componente, estas se agrupan dentro de una división del clado con un bajo valor de diferenciación ($F_{ST}=0.083$) (Tabla 7). Sin embargo es muy probable que esta agrupación pudiese cambiar al aumentar el tamaño de individuos muestreados en PSJ16 (Bashalkhanov *et al.*, 2009), además, el porcentaje de coincidencia de las simulaciones es bajo (Figura 22).

Dentro del dendrograma de los lotes de cultivo se aprecia un comportamiento similar ya que los lotes con menor diferenciación ROS12 y PMB15 ($F_{ST}=0.127$) (Tabla 7) forman la primera agrupación, quienes están representadas por un 99.0% de la componente azul (Tabla 8). Además, el lote PMB14 quien está conformado por la componente roja (Figura 21), se encuentra fuera del clado principal ya que es el lote que presenta los mayores valores de F_{ST} al ser comparados con los otros lotes (Tabla 7).

4.4 Migración y flujo genético

Al comparar las localidades silvestres de 1999, Crescent City (CCY99) y Van Damme (VDM99), se observa que en promedio para los 10 loci analizados, VDM99 cuenta con una mayor diversidad genética, debido a que presenta mayores valores en número de alelos (N_a), riqueza alélica (RA), heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) (Tabla 6). Sin embargo, estas no son

significativamente diferentes a los valores obtenidos para CCY99 con un ($p > 0.05$) en todos los casos (Figura 11 a 14). Con respecto a los valores de endogamia (F_{IS}) ambas localidades presentan tendencia hacia la consanguinidad sin embargo, la localidad CCY99 es ligeramente mayor (Tabla 7).

Con el análisis de los diagramas de barras producidas por STRUCTURE, es posible visualizar ausencia de estructura genética de ambas poblaciones (Figura 21), además, ayuda a identificar de forma gráfica la migración de individuos determinado por la proporción de los componentes genéticos dentro de las localidades. Van Damme tiene una influencia de ambas componentes genéticas (verde y azul), indicio de que ambas localidades pueden compartir ancestros en común (Martínez-Matus, 2016; Porrás-Hurtado *et al.*, 2013). Además, esto puede ser sustentado, al confirmar la migración de individuos de la localidad CCY99 hacia VDM99 (Figura 21), haciendo la inferencia de migración larval influenciado principalmente por corrientes (Hamm y Burton, 2000). Por lo cual es de esperar mayor influencia organismo migrantes de la localidad CCY99 dentro de las frecuencias alélicas de los organismos de VDM99.

Respecto a Van Damme 2007 (VDM07) y San Miguel island (SMI07), puede observarse que la localidad SMI07 a pesar de tener un menor número de individuos evaluados presenta el mismo número de alelos que VDM07, pero una mayor riqueza, número de alelos efectivos e índice de endogamia. Respecto a heterocigosidad observada VDM07 tiene valores mayores, de cualquier forma ninguno de estos valores llega a ser significativamente diferente (Tabla 7).

De acuerdo al flujo de migrantes determinado (Figura 24), la presencia de la componente azul dentro de la localidad SMI07 está determinada por los migrantes que puede aportar la localidad VDM07; Por lo cual, a pesar de que la localidad Van Damme presenta influencia de la componente verde, es más probable que el aporte de migrantes sea de la localidad CCY99, debido a la que el flujo de migración detectado en ambos casos es de norte hacia sur.

La poca de divergencia genética al comparar localidades de *H. rufescens* del mismo año, radica en su amplia temporada de desove, así como la capacidad de la especie para reproducirse continuamente durante el año, en comparación con otras especies de abulón. Que le provee un mayor rango de dispersión plantónica, influenciada por la hidrodinámica costera local ya que la larva tiene una baja capacidad de movimiento horizontal dentro de la columna de agua (Gutierrez-Gonzalez y Perez-Enriquez, 2005; Hamm y Burton, 2000; Miyake, Kimura, Horii y Kawamura, 2017).

La conectividad entre las localidades silvestres de *H. rufescens* se ha demostrado con diferenciaciones genéticas moderadas en longitudes de aproximadamente 600km (Burton y Tegner, 2000). Esta

información es consistente con lo encontrado en este estudio, debido a que se puede demostrar la conectividad de las localidades, debido al aporte de migrantes en distancias desde 300km hasta un poco más de 600km, mostrando niveles moderados a bajos de diferenciación genética.

Analizando la localidad Van Damme en dos escalas temporales (VDM99 y VDM07) se aprecia que, a pesar de existir diferencias significativas, estas diferencias son de las más pequeñas dentro de las doce localidades analizadas ($F_{ST}=0.81$) (Tabla 8). En cambio, el estudio de Gruenthal *et al.* (2007) quienes analizan dos muestras la localidad Van Damme (la primera consta de adultos de talla comercial y la segunda de abulones pequeños a los cuales denominaron juveniles), no encontraron diferencias entre las muestras. Además, los tiempos generacionales de las poblaciones de Van Damme analizados por Gruenthal *et al.* (2007) son menores en comparación con el presente estudio, lo cual puede explicar la ausencia de diferenciación, además de que probablemente los adultos pudieran ser padres de los juveniles.

Respecto al dendrograma, ambas fechas de Van Damme en este estudio, se agrupan dentro de un mismo clado y en el análisis por componentes se observa un aumento del 10.5% de la componente azul en tiempo (86.5% al 97.0%) (Tabla 8), lo cual podría estar asociado con la pérdida de riqueza alélica y heterocigosidad observada (Gutierrez-Gonzalez y Perez-Enriquez, 2005; Li *et al.*, 2004) (Tabla 7).

4.5 Recomendaciones

Como culminación del trabajo, se puede recomendar el uso de un número menor de microsatélites, para motivar su aplicación dentro de los programas de selección genética de *Haliotis rufescens*.

La elección de los microsatélites debe realizarse considerando que estos puedan ser técnicamente replicables y fiables en cualquier laboratorio, además de amplificar en la mayoría de los organismos que deben ser analizados (Martínez, 2005). Por lo cual la selección inicia partiendo de los diez marcadores microsatélites utilizados para el análisis de diversidad genética en este estudio (Anexo C; Tabla 11). Apartir de este momento, se considerará que el marcador debe presentar un alto índice de contenido polimórfico, bajas frecuencias de alelos nulos por locus, alta riqueza alélica y heterocigosidad observada (Díaz-Viloria, Pérez-Enríquez, Cruz-Hernández y Aguilar-Osuna, 2013; Li *et al.*, 2004).

El índice de Contenido Polimórfico (por sus siglas en inglés PIC) se recomienda en valores cercanos a 1.0 ya que entre menor sea el índice, menor diversidad detectada dentro las poblaciones (Cadima *et al.*, 2013). Los valores de alelos nulos deben permanecer bajos para evitar distorsionar la estructura poblacional debido a una asunción equivocada de exceso de homocigotos. En general menores a 0.20 y preferentemente no mayores a 0.30 ya que este es considera un valor alto de frecuencia de alelos nulos (Díaz-Viloria *et al.*, 2013; Gruenthal *et al.*, 2007; Lafarga-De La Cruz *et al.*, 2010).

En la Tabla 14 (Anexo F), puede observarse que el valor de PIC de este estudio al ser comparado con lo obtenido por (Aguilar-Espinoza *et al.*, 2014), en la mayoría de los casos aumenta por locus, lo cual está relacionado con el número de individuos analizados además de la técnica de asignación del genotipo presenta mayor sensibilidad en este estudio. Por lo cual se podría esperar identificar una mayor diversidad (Cadima *et al.*, 2013). Respecto al número de alelos nulos por locus, se observa un aumento de los valores en el presente estudio sin embargo, sólo uno de los locus analizados sobrepasa el valor considerado como inaceptable (Hr32).

Otras características a considerar para la elección de los mejores marcadores, es la presencia del mayor número de alelos posibles así como una alta riqueza y heterocigosidad esperada (Anexo G; Figura 35 a 37), lo cual implicaría mayor diversidad, por ende mayores posibilidades dentro los organismos para sobrevivir a la presión selectiva, así como un uso de menos loci para realizar análisis de parentesco y una mejor evaluación de la diversidad (Castro *et al.*, 2004; Díaz-Viloria *et al.*, 2013; Hara y Sekino, 2007)

Utilizando estos criterios, es posible llegar a la recomendación de seis loci microsatélite (Hr1, Hr6, Hr16, Hr23 y Hr31), los cuales pudieran ser utilizados para análisis parental y diseño de pedigrí. Ya que está demostrado que el uso de dos marcadores no es suficiente para realizar un análisis parental en *H. fulgens* (Gutierrez-Gonzalez y Perez-Enriquez, 2005), por el contrario, en *H. corrugata* y en *H. discus hannai* el uso de al menos seis marcadores es viable para la asignación parental, aun cuando en la granja no se lleve un registro de pedigrí; Además de existir el antecedente en rodaballo (*Scophthalmus maximus*), el cual fue evaluado con 12 microsatélites, pero también realizaron la recomendación de seis marcadores altamente polimórficos (Castro *et al.*, 2004; Díaz-Viloria *et al.*, 2013; Li, Park y Kijima, 2003).

Capítulo 5. Conclusiones

- En 453 muestras de abulón rojo, evaluadas con diez marcadores microsatélite especie-específicos se encontró un total de 273 alelos, de los cuales 95 son alelos nuevos.
- La mayor diversidad genética, en términos de riqueza alélica y heterocigosidad observada, se encontró en las muestras silvestres en comparación con los lotes de cultivo; dentro de las cuales Van Damme 1999, San Miguel Island 2007 y Santo Tomás 2014 tuvieron los valores más altos.
- Todas las localidades se encontraron en desequilibrio de Hardy-Weinberg relacionado principalmente con un déficit de heterocigotos.
- El valor promedio del coeficiente de endogamia fue significativamente mayor en los lotes de cultivo en comparación con las localidades silvestres. Únicamente la localidad silvestre de Santo Tomás 2014 presentó reproducción aleatoria ($F_{IS} = 0.074$), el lote de cultivo Eréndira 2014 tuvo el índice de endogamia más alto ($F_{IS} = 0.508$) y el resto presentó endogamia moderada (0.326-0.473).
- Todas las comparaciones pareadas del índice de fijación (F_{ST}) entre localidades fueron significativas, con valores de bajos a moderados (0.062-0.254). Encontrándose las mayores diferencias entre los lotes de cultivo al compararse con silvestres (0.161-0.254).
- El análisis de estructura y las relaciones genéticas en las localidades silvestres evidencian dos grupos: 1) CCY99-SMI07-SPT11-STT14 y 2) VDM99-VDM07-PSJ16.
- En el análisis de estructura cuatro de los lotes de cultivo, muestran mayor similitud a la componente genética que define al grupo 2. Sin embargo, el lote PMB14 es diferente del resto (silvestres y cultivo), evidenciando el efecto de las prácticas acuícolas sobre la diversidad genética de los recursos pesqueros.
- Para localidades silvestres muestreadas el mismo año (CCY99-VDM99 y VDM07-SMI07), se encontró un bajo flujo de migrantes (0.008) en dirección norte-sur, independiente de la geográfica entre las localidades (325 vs 695 km).
- Para la localidad Van Damme (VDM) de 1999 y 2007, se determinaron diferencias en las frecuencias alélicas y una pérdida de diversidad genética.
- La información genética generada en este estudio, permite asentar las bases para identificar bancos naturales de *Haliotis rufescens* que ayuden a aumentar la variabilidad genética y el número de organismos heterocigotos en los lotes de cultivo, para evitar los efectos negativos que conlleva la reproducción de organismos altamente emparentados.

Literatura citada

- Aguilar-Espinoza, A., Valderrama-Aravena, N., Farlora, R., Lafarga De la Cruz, F. y Gallardo-Escárate, C. (2014). Development of novel polymorphic EST-SSR markers in Californian abalone *Haliotis rufescens* and genetic analysis in wild and hatchery-bred populations. *Aquaculture Research*, 45(12), 1942-1952. <http://doi.org/10.1111/are.12141>
- Astorga, M. P. (2008). Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. *Cultivo y manejo de moluscos bivalvos en América Latina*, 277-287.
- Bashalkhanov, S., Pandey, M. y Rajora, O. P. (2009). A simple method for estimating genetic diversity in large populations from finite sample sizes. *BMC Genetics*, 10(1), 84. <http://doi.org/10.1186/1471-2156-10-84>
- Beerli, P. (2012). Migrate. *Tutorialis e Manuais*. <http://doi.org/10.1897/04-483R.1>
- Braje, T. J., Erlandson, J. M., Rick, T. C., Erlandson, J. M. y Rick, T. C. (2007). An Historic Chinese Abalone Fishery on California's Northern Channel Islands. *Society for Historical Archaeology*, 41(4), 117-128. Recuperado a partir de <http://www.jstor.org/stable/25617470>
- Brokordt, K. B., Winkler, F. M., Farías, W. J., González, R. C., Castaño, F., Fullsack, P. y Herbinger, C. M. (2015). Changes of heritability and genetic correlations in production traits over time in red abalone (*Haliotis rufescens*) under culture. *Aquaculture Research*, 46(9), 2248-2259. <http://doi.org/10.1111/are.12382>
- Burton, R. S. y Tegner, M. J. (2000). Enhancement of red abalone *Haliotis rufescens* stocks at San Miguel Island: Reassessing a success story. *Marine Ecology Progress Series*, 202(1996), 303-308. <http://doi.org/10.3354/meps202303>
- Cabrera, O. y Munsterman, L. (2002). Definición de las condiciones de temperatura y almacenamiento adecuadas en la detección de ADN de *Leishmania* por PCR en flebotominos. *Biomédica*, 22, 296-302. Recuperado a partir de <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1167>
- Cadima, X., Veramendi, S. y Gabriel, J. (2013). Uso de marcadores moleculares microsatélite para el análisis de la diversidad genética de papa nativa de Bolivia Using simple sequence repeats molecular markers to analyze the genetic diversity of potato landraces from Bolivia Introducción. *J Selva Andina Res Soc.*, 4(1), 18-30.
- Castro, J., Bouza, C., Presa, P., Pino-Querido, A., Rianza, A., Ferreiro, I., ... Martínez, P. (2004). Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture*, 242(1-4), 119-135. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.010>
- Centre, K., Sciences, B. y Wales, N. S. (2001). How Closely Correlated Are Molecular and Quantitative Measures of Genetic Variation? a Meta-Analysis, 55(6), 1095-1103. <http://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb00629.x>

- Cifuentes Lemus, J. L., Torres-García, M. D. P. y Frías Mondragón, M. (1997). *Océano y sus recursos, X. Pesquerías*. D.R. © 1997 Fondo De Cultura Económica. Recuperado a partir de [http://www.biblioises.com.ar/Contenido/000/010/82 el oceano y sus recursos pesquerias X.pdf](http://www.biblioises.com.ar/Contenido/000/010/82%20el%20oceanoy%20sus%20recursos%20pesquerias%20X.pdf)
- Cox, K. W. (1962). *California abalones, family Haliotidae (No. 114-123)*. Department of Fish and Game, the Resources Agency, State of California. Recuperado a partir de http://content.cdlib.org/view?docId=kt738nb1zxxydoc.view=entire_text
- Crisafuli, F. A. P., Ramos, E. B. y Rocha, M. S. (2015). Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain. *European biophysics journal: EBJ*, 44(1-2), 1-7. <http://doi.org/10.1007/s00249-014-0995-4>
- Dawson, M. N., Raskoff, K. A. y Jacobs, D. K. (1998). Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses. *Molecular marine biology and biotechnology*, 7(2), 145-52. Recuperado a partir de http://www.researchgate.net/publication/11805771_Field_preservation_of_marine_invertebrate_tissue_for_DNA_analyses._Molecular_Marine_Biology_and_Biotechnology_7_145-152
- De Wit, P. y Palumbi, S. R. (2013). Transcriptome-wide polymorphisms of red abalone (*Haliotis rufescens*) reveal patterns of gene flow and local adaptation. *Molecular Ecology*, 22(11), 2884-2897. <http://doi.org/10.1111/mec.12081>
- Demarchi, D. (2009). Microsatélites, distancias genéticas y estructura de poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de Antropología Biológica*, 11(1), 73-88. Recuperado a partir de <http://www.revistas.unlp.edu.ar/index.php/raab/article/view/269>
- Díaz-Viloria, N., Pérez-Enríquez, R., Cruz-Hernández, P. y Aguilar-Osuna, D. (2013). Herencia mendeliana en microsatélites de abulón amarillo *Haliotis corrugata*. *Interciencia*, 38, 455-460.
- Díaz, F., Del Río-Portilla, M. A., Sierra, E., Aguilar, M. y Re-Araujo, A. D. (2000). Preferred temperature and critical thermal maxima of red abalone *Haliotis rufescens*. *Journal of Thermal Biology*, 25(3), 257-261. [http://doi.org/10.1016/S0306-4565\(99\)00032-7](http://doi.org/10.1016/S0306-4565(99)00032-7)
- DOF. (1994). AVISO por el que se da a conocer el establecimiento de épocas y zonas de veda para la pesca de diferentes especies de la fauna acuática en aguas de jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos. *Diario oficial de la Federación*, 16-03-1994. Recuperado a partir de http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4678590&yfecha=16/03/1994
- Earl, D. A. y 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. <http://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Eguiarte, L. E., Aguirre-planter, E., Scheinvar, E., González, A., Sagarpa, Control, E. L., ... Torres, R. A. (2010). Los estadísticos F de Wright 5. *Nature*, 13(suplemento 2), 1-30. <http://doi.org/10.1086/519795>
- Elliott, N. G. (2000). Genetic improvement programmes in abalone: what is the future? *Aquaculture Research*, 31(1), 51-59. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2109.2000.00386.x>

- Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611-2620. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Evans, B., Bartlett, J., Sweijd, N., Cook, P. y Elliott, N. G. (2004). Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture*, 233(1-4), 109-127. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.09.037>
- Excoffier, L. y Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- FAO. (2014). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Global Aquaculture Production 1950-2014. Recuperado a partir de <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>
- Flores-Aguilar, R. A. (2000). Cultivo intensivo de abulón. En G. Ponce-Días, E. Serviere-Zaragoza y E. Yuen-Sánchez (Eds.), *Memorias del Taller: Cultivo Intensivo y Repoblamiento del Abulón* (pp. 61-67). CIBNOR.
- Flores-Aguilar, R. A., Gutiérrez, A., Ellwanger, A. y Searcy-Bernal, R. (2007). Development and Current Status of Abalone Aquaculture in Chile. *Journal of Shellfish Research*, 26(3), 705-711. [http://doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[705:DACS0A\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[705:DACS0A]2.0.CO;2)
- FND. (2010). Monografía Abulón. *Financiera Nacional de Desarrollo Agropecuario, Rural, Forestal y Pesquero*. Recuperado a partir de <https://ferrusca.files.wordpress.com/2013/03/monograf3ada-abulc3b3n-marzo-10.pdf>
- Gaffney, P. M., Rubin, V. P., Hedgecock, D., Powers, D. A., Morris, G. y Hereford, L. (1996). Genetic effects of artificial propagation: signals from wild and hatchery populations of red abalone in California. *Aquaculture*, 143(3-4), 257-266. [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(96\)01278-1](http://doi.org/10.1016/0044-8486(96)01278-1)
- Goudet, J. (2002). FSTAT A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Department of Ecology y Evolution, Biology Building, UNIL, CH-1015 LAUSANNE, Switzerland. Recuperado a partir de <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Gruenthal, K. M., Acheson, L. K. y Burton, R. S. (2007). Genetic structure of natural populations of California red abalone (*Haliotis rufescens*) using multiple genetic markers. *Marine Biology*, 152, 1237-1248. <http://doi.org/10.1007/s00227-007-0771-4>
- Gutierrez-Gonzalez, J. L. y Perez-Enriquez, R. (2005). A genetic evaluation of stock enhancement of blue abalone *Haliotis fulgens* in Baja California, Mexico. *Aquaculture*, 247(1-4), 233-242. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.021>
- Guzmán del Prío, S. A. (1994). *Biología, ecología y dinámica de población del abulón (Haliotis spp.) de Baja California, México*. Instituto Politecnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
- Hahn, K. O. (1989). Nutrition and growth of abalone. En K. O. Hahn (Ed.), *Handbook of culture of*

abalone and other marine gastropods (pp. 135-156). CRC Press Inc.

- Hamm, D. . y Burton, R. . (2000). Population genetics of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the central California coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 254(2), 235-247. [http://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00283-5](http://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00283-5)
- Hara, M. y Sekino, M. (2007). Genetic Differences Between Hatchery Stocks and Natural Populations in Pacific Abalone (*Haliotis discus*) Estimated Using Microsatellite DNA Markers. *Marine Biotechnology*, 9(1), 74-81. <http://doi.org/10.1007/s10126-006-6060-2>
- HLeap, J. S., Cárdenas, H. y García-Vallejo, F. (2009). Preservación no criogénica de tejido y extracción de ADN : una aplicación para peces cartilagosos. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 4(4), 545-555.
- Huang, Q., Baum, L. y Fu, W. L. (2010). Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clinical Laboratory*.
- Ibarra-Humphries, A. M. (2000). Mejoramiento genético en la roducción de abulón. En G. Ponce-Días, E. Serviere-Zaragoza y E. Yuen-Sánchez (Eds.), *Memorias del Taller: Cultivo Intensivo y Repoblamiento del Abulón* (pp. 31-47). CIBNOR.
- INAPESCA. (2006). *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México. Evaluación y Manejo*. Instituto Nacional de la Pesca Pitágoras No. 1320, Santa Cruz Atoyac Delegación Benito Juárez, C.P. 03310, México, D.F. Tels.: (55) 5604-9169 y 5688-1469, Fax: (55) 5688-8418. Recuperado a partir de http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/pelagicos/libro_Rojo.pdf
- Juyó-Rojas, D. K. (2012). *Diversidad genética y estructura poblacional en genotipos diploides de papa*. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Agronomía Bogotá, Colombia. Recuperado a partir de <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>
- Kube, P. D., Appleyard, S. A. y Elliott, N. G. (2007). Selective Breeding Greenlip Abalone (*Haliotis Laevigata*): Preliminary Results and Issues. *Journal of Shellfish Research*, 26(3), 821-824. [http://doi.org/10.2983/0730-8000\(2007\)26\[821:SBGAHL\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.2983/0730-8000(2007)26[821:SBGAHL]2.0.CO;2)
- Lafarga-De la Cruz, F. (2013). *Estandarización de procedimientos para la caracterización de recursos acuáticos y su inserción en el Posgrado en Ciencias de la Acuicultura*.
- Lafarga-de la Cruz, F., Aguilar-Espinoza, A. y Gallardo-Escárte, C. (2015). Parentage assignment in hybrid abalones (*Haliotis rufescens* × *Haliotis discus hannai*) based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture Research*, 46(1), 216-225. <http://doi.org/10.1111/are.12169>
- Lafarga-De La Cruz, F., Del Río-Portilla, M. Á. y Gallardo-Escárte, C. (2010). Genetic Variability of Cultured Populations of Red Abalone in Chile: An Approach Based on Heterologous Microsatellites. *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 709-715. <http://doi.org/10.2983/035.029.0323>
- Langella, O. (2001). Populations: Gene frequencies. Bioinformatics.org. Recuperado a partir de http://www.bioinformatics.org/groups/?group_id=84

- Li, Q., Park, C., Endo, T. y Kijima, A. (2004). Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Aquaculture*, 235(1-4), 207-222. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.018>
- Li, Q., Park, C. y Kijima, A. (2003). Allelic transmission of microsatellites and application to kinship analysis in newly hatched Pacific abalone larvae. *Fisheries Science*, 69(5), 883-889. <http://doi.org/10.1046/j.1444-2906.2003.00703.x>
- Li, Q., Shu, J. yu, R. y Tian, C. (2007). Genetic variability of cultured populations of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai Ino*) in China based on microsatellites. *Aquaculture*, 38, 981-990. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01764.x>
- Liu, Z. J. y Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1-4), 1-37. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.027>
- Lluch-Cota, D. B. y Ponce-Días, G. (2000). Situación actual y perspectivas de la pesquería de abulón. En G. Ponce-Días, E. Serviere-Zaragoza y E. Yuen-Sánchez (Eds.), *Memorias del Taller: Cultivo Intensivo y Repoblamiento del Abulón* (pp. 1-16). CIBNOR.
- Lopera-Barrero, N. M., Povh, J. a, Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B. y Silva Lopes, T. Da. (2008). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Ciencia e investigación agraria*, 35(1), 77-86. <http://doi.org/10.4067/S0718-16202008000100008>
- Marchant, S., Haye, P. A., Marín, S. A. y Winkler, F. M. (2009). Genetic variability revealed with microsatellite markers in an introduced population of the abalone *Haliotis discus hannai Ino*. *Aquaculture Research*, 40(3), 298-304. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02089.x>
- Martínez-Matus, E. (2016). *Diversidad genética y éxito reproductivo del Jurel de Castilla Seriola lalandi (Valenciennes , 1833) en cautiverio*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada , Baja California.
- Martínez, P. (2005). Aplicaciones de la genética para la mejora de la acuicultura. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, 21, 225-238.
- Mateus, H. (1986). *Los Abulones de México* (Primera ed). México: Secretaría de Pesca.
- Miller, A. D., Van Rooyen, A., Sweeney, O. F., Whiterod, N. S. y Weeks, A. R. (2013). The development of 10 novel polymorphic microsatellite markers through next generation sequencing and a preliminary population genetic analysis for the endangered Glenelg spiny crayfish, *Euastacus bispinosus*. *Molecular Biology Reports*, 40(7), 4415-4419. <http://doi.org/10.1007/s11033-013-2531-5>
- Milligan, B. G., J. L.-M. y A. E. S. (1994). Conservation genetics beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular.pdf*. Recuperado a partir de http://www.researchgate.net/publication/230010718_Conservation_genetics_beyond_the_maintenance_of_marker_diversity._Mol_Ecol_3423-435
- Miyake y., Kimura, S., Horii, T. y Kawamura, T. (2017). Larval Dispersal of Abalone and Its Three Modes:

- a Review. *Journal of Shellfish Research*, 36(1), 157-167. <http://doi.org/10.2983/035.036.0116>
- Nardelli, M., Túnez, J. I., Centrón, D. y Cassini, M. H. (2011). Técnicas de muestreo no invasivas aplicadas al estudio genético de mamíferos. *Interciencia*, 36, 404-411.
- Oakes, F. R. y Ponte, R. D. (1996). The abalone market: Opportunities for cultured abalone. *Aquaculture*, 140(1-2), 187-195. [http://doi.org/10.1016/0044-8486\(95\)01189-7](http://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01189-7)
- Peakall, R. y Smouse, P. (2012). Quick Start GenAlEx 6.5. *The Australian National University, Canberra ACT 0200, Australia*, 3(2006), 288-295. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- Ponce-Díaz, G., Sánchez-Hernández, S. y Yuen-Sánchez, E. (Eds.). (2003). *Estudio de la Cadena Productiva de Abulón. Conapesca*.
- Porras-Hurtado, L., Ruiz y., Santos, C., Phillips, C., Carracedo, Ángel y Lareu, M. V. (2013). An overview of STRUCTURE: Applications, parameter settings, and supporting software. *Frontiers in Genetics*, 4(MAY), 1-13. <http://doi.org/10.3389/fgene.2013.00098>
- Pritchard, J. K., Stephens, M. y Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2), 945-959. Recuperado a partir de <http://www.genetics.org/content/155/2/945>
- Putman, A. I. y Carbone, I. (2014). Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecology and Evolution*, 4(22), 4399-4428. <http://doi.org/10.1002/ece3.1305>
- Rambaut, A. (2006). FigTree v1.4.3. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
- Raymond, M. y Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Recuperado a partir de <http://genepop.curtin.edu.au/index.html>
- Rios, P. A. P. (2005). Aplicación y evaluación de metodologías para el cultivo primario de células y explantes de órganos de abalón rojo (*Haliotis rufescens*). *Universidad Austral de Chile Facultad De Ciencias Veterinarias Instituto De Patología Animal*.
- SAGARPA. (2011). *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2011*.
- SAGARPA. (2012). Segunda Sección Secretaría De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación. D.O.F. *Carta Nacional Pesquera*, (IV). Recuperado a partir de <http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/carta-nacional-pesquera/Carta-Nacional-Pesquera-2012.pdf>
- SAGARPA. (2013a). *Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca Edición 2013. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca Dirección General de Planeación, Programación y Evaluación (Vol. 58)*. Recuperado a partir de WWW.CONAPESCA.GOB.MX
- SAGARPA. (2013b). Segunda Sección Secretaría De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación. *Carta Nacional Acuícola*. Recuperado a partir de

<http://www.inapesca.gob.mx/portal/publicaciones/carta-nacional-acuicola>

- Sambrook, J. y William, D. R. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volumen 1*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ed.) (ilustrada). New York, USA.
- Selvamani, M. J. P., Degnan, S. M. y Degnan, B. M. (2001). Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: Parentage assignment in aquaculture. *Marine Biotechnology*, 3(5), 478-485. <http://doi.org/10.1007/s1012601-0062-X>
- SEPESCA-CIBNOR. (1994). *Desarrollo Científico y Tecnológico del Cultivo del Abulón*.
- Slabbert, R., Bester, A. y D'Amato, M. (2009). Analyses of genetic diversity and parentage within a South African hatchery of the abalone *Haliotis midae* Linnaeus using microsatellite markers. *Journal of Shellfish Research*, 28(2), 369-375. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.2983/035.028.0220>
- Steinarsson, A. y Imsland, A. K. (2003). Size dependent variation in optimum growth temperature of red abalone (*Haliotis rufescens*). *Aquaculture*, 224(1-4), 353-362. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00241-2](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00241-2)
- Technologies, A. (2014). QIAxcel® — Pure Excellence QIAxcel Advanced System Designed to speed up and RNA analysis. Recuperado a partir de <https://www.google.com.mx/url?sa=tyrct=jyq=yesrc=sysource=webycd=2ycad=rjauact=8yved=0ahUKEwiw4LTko47MAhVHPiYKHckBBoEQFggqMAEyurl=https://www.qiagen.com/resources/download.aspx?id=0247e097-450c-4c2a-93fe-7cf144e4d281ylang=enyusg=AFQjCNEdcxYvGjFg0gSzOna4L>
- Thermo Scientific, D. (2011). NanoDrop: Assessment of Nucleic Acid Purity. *Protocols and Product Manuals*, (42), 1-2.
- UCN. (2015). Proyecto concluye que es posible y rentable hacer mejoramiento genético en abalones. Recuperado a partir de <http://www.noticias.ucn.cl/destacado/proyecto-concluye-que-es-posible-y-rentable-hacer-mejoramiento-genetico-en-abalones/>
- Viana, M. T. (2000). La nutrición en el cultivo de abulón. En G. Ponce-Días, E. Serviere-Zaragoza y E. Yuen-Sánchez (Eds.), *Memorias del Taller: Cultivo Intensivo y Repoblamiento del Abulón* (pp. 49-59). CIBNOR.
- Wang, X., Rinehart, T., Wadl, P., Spiers, J., Hadziabdic, D., Windham, M. y Trigiano, R. (2009). A new electrophoresis technique to separate microsatellite alleles*. *African Journal of Biotechnology*, 8(11), 2432-2436. <http://doi.org/10.4314/ajb.v8i11.60628>
- Zane, L., Bargelloni, L. y Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: A review. *Molecular Ecology*, 11, 1-16. <http://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x>
- Zhang, J. H., Wang, F. y Wang, T. Y. (2011). A simple and effective SuperBuffer for DNA agarose electrophoresis. *Gene*, 487(1), 72-74. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2011.05.018>

Anexos

Anexo A

Tabla 9. Mezcla final de los reactivos para la amplificación por PCR de los fragmentos específicos de DNA para cada cebador, utilizando enzima Taq polimeraza Bio-Rad.

Concentración inicial	Compuesto	Concentración final	Muestra 1 X (μL)
10 X	Buffer A	1 X	1.60
10 μg/μL	BSA	0.2 μg/μL	0.30
10 mM	dNTP's	0.2 mM	1.30
10 μM	Cebador 1	0.5 μM	0.40
10 μM	Cebador 2	0.5 μM	0.40
5 U/μL	Taq polimerasa	0.1 U/μL	0.10
50 ng/μL	DNA genómico	8-13 ng/μL	2.80
	Agual PCR		9.43
		Volumen de Rx final	16.33

Anexo B

Tabla 10. Ejemplo de asignación de genotipos para cada individuo de la localidad de Punta San José 2016 utilizando los 16 cebadores, primer alelo (A1), segundo alelo (A2).

Individuo	<i>Contig</i>																															
	4729		3243		3764		1081		5673		2872		7620		8983		12187		4892		12613		4633		12110		3435		4491		12505	
	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
o	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
1	177	192	177	192	0	0	271	271	193	193	0	0	228	228	0	0	150	162	185	185	192	206	176	176	183	195	233	261	155	170	229	283
2	180	186	180	186	169	181	270	270	191	199	172	240	228	228	0	0	135	150	179	179	180	192	176	176	180	192	225	249	158	158	229	265
3	174	183	174	183	172	172	269	269	193	193	172	172	226	226	0	0	147	162	179	179	198	212	173	173	174	183	233	253	149	149	227	247
4	171	186	171	186	0	0	269	269	192	192	168	168	226	226	0	0	147	156	179	185	192	192	173	173	183	183	233	233	152	170	227	249
5	177	177	177	177	169	175	269	269	193	193	168	168	226	226	0	0	132	153	177	185	174	198	176	176	180	180	233	233	150	167	225	263
6	177	177	177	177	172	181	270	270	193	193	168	168	226	226	0	0	147	156	179	185	174	190	176	176	177	186	229	257	158	158	229	265
7	177	192	177	192	169	187	270	270	193	193	168	168	226	226	0	0	132	144	177	177	186	210	176	176	180	180	237	237	158	179	227	265
8	177	195	177	195	166	166	269	269	193	193	168	168	226	226	0	0	147	159	179	185	174	186	176	176	180	180	233	261	164	164	227	249
9	177	177	177	177	0	0	272	272	193	193	170	170	226	226	0	0	132	150	185	185	174	198	176	176	180	180	233	253	158	176	227	249
10	177	195	177	195	166	166	269	269	194	194	168	168	226	226	0	0	135	147	179	187	174	194	173	173	183	183	233	249	158	158	227	249
11	174	183	174	183	167	172	270	270	193	193	168	168	226	226	0	0	150	162	181	187	174	198	173	182	183	183	237	253	158	176	231	249
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	171	180	171	180	169	187	270	270	194	194	170	170	226	226	0	0	150	159	181	189	192	192	179	179	180	192	0	0	152	170	223	231

Anexo C

Tabla 11. Consenso de la amplificación de los cebadores utilizados para evaluar la diversidad genética de las doce localidades muestreadas de *Haliotis rufescens*. El número indica a los individuos que no amplificaron dentro de cada localidad por locus.

Código de localidad	Locus															
	Hr1	Hr2	Hr6	Hr9	Hr12	Hr16	Hr17	Hr22	Hr23	Hr28	Hr29	Hr30	Hr31	Hr32	Hr33	Hr34
Silvestre																
CCY99			7								5	29	1			29
VDM99						1		3	1		5	13		6		
VDM07	2					1		11	1	5	2	47		1	1	1
SMI07	1							6			15	35	2			35
SPT11	2	1			4		2	4		1	10	35	6		3	35
STT14	6				35					35	7	21	1	2	4	
PSJ16			3					1			4	14			1	
Cultivo																
ROS12			1		1	1			4		1	1				
SQN12				6	5			13		6	1	7				
PMB13			1		2	1					3	8	1			
PMB14					1	10		58		6	32	58				58
PMB15		1		2	5		1	12		9	47	47	16*	1		47

Anexo D

Locus Hr1 (12187)	Alelos N	Localidades silvestres							Lotes de cultivo				
		CCY99 28	VDM99 46	VDM07 41	SMI07 32	SPT11 31	STT14 29	PSJ16 12	ROS12 46	SQN12 47	PMB13 31	PMB14 54	PMB15 46
132				0.012				0.125	0.011				
135								0.083	0.022		0.016		0.011
138			0.011								0.065		
141			0.011				0.016		0.022		0.113		0.033
144	0.054	0.033		0.207		0.016		0.042	0.054		0.306		0.098
147		0.076		0.232	0.063			0.208	0.283	0.043	0.048		0.098
150	0.018	0.196		0.146	0.016		0.210	0.017	0.208		0.129		0.380
153	0.018	0.152		0.037	0.063		0.210	0.069	0.042		0.065		0.087
156	0.143	0.076		0.061	0.109		0.129		0.054	0.649	0.177		0.011
159	0.250	0.130		0.073	0.234		0.113	0.034	0.054	0.053	0.065		0.065
162	0.054	0.087		0.146	0.172		0.097	0.052	0.174	0.032	0.065		0.065
165	0.071	0.098		0.037	0.063		0.097	0.190	0.022		0.016	0.009	0.076
168	0.089	0.054		0.012	0.156		0.081	0.207	0.065	0.085		0.046	0.087
171	0.143	0.043		0.024	0.047		0.016	0.172	0.033	0.043		0.046	0.011
174	0.036	0.011			0.047		0.016	0.121	0.011	0.011		0.204	0.022
177	0.089	0.022			0.016			0.138	0.011	0.043		0.241	0.011
180	0.018				0.016							0.120	0.011
183	0.018											0.028	
186				0.012								0.074	
189												0.111	
192												0.065	
195												0.019	
198												0.009	
	Número total de alelos	13	14	12	12	11	9	9	14	9	10	13	14

Figura 25. Frecuencias alélicas del locus Hr1 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (*H. rufescens*).

Locus Hr2 (5673)	Alelos N	Localidades silvestres						Lotes de cultivo					
		CCY99 28	VDM99 46	VDM07 43	SMI07 33	SPT11 32	STT14 34	PSJ16 12	ROS12 46	SQN12 47	PMB13 31	PMB14 53	PMB15 45
185							0.015						
187							0.015						
189			0.022				0.029						
190			0.065										
191			0.065					0.042					
192			0.076				0.015	0.083					
193			0.185					0.667					
194			0.065	0.058				0.167					
195			0.043	0.244			0.029						0.011
196			0.098	0.302			0.044		0.022				0.467
197			0.011	0.128			0.044			0.043	0.129		0.333
198			0.087	0.081			0.059		0.750	0.255	0.306		0.056
199			0.054				0.029	0.042		0.362	0.419		0.022
200			0.054		0.030				0.152	0.277	0.113		0.022
201			0.011	0.012	0.348					0.064			0.022
202			0.033	0.035	0.121		0.029		0.043				0.011
203			0.011	0.070	0.106		0.015						0.022
204			0.022	0.023	0.030	0.063	0.029		0.011		0.016		0.022
205				0.023		0.109	0.088						0.011
206				0.023		0.172	0.162		0.022		0.016		
207			0.011			0.094	0.162						
208	0.018		0.022		0.030	0.094	0.015						
209	0.107		0.033		0.061	0.141							
210	0.357		0.022		0.030	0.094	0.015						
211	0.268		0.011		0.076	0.078	0.015						
213	0.054				0.061	0.125	0.103						
214					0.015		0.029						
217	0.125				0.061	0.016	0.029						
220	0.071				0.030	0.016							
225												0.019	
227							0.029						
230												0.057	
231												0.208	
232												0.245	
233												0.189	
234												0.094	
235												0.113	
237												0.075	
Número total de alelos		7	21	11	13	11	22	5	6	5	6	8	11

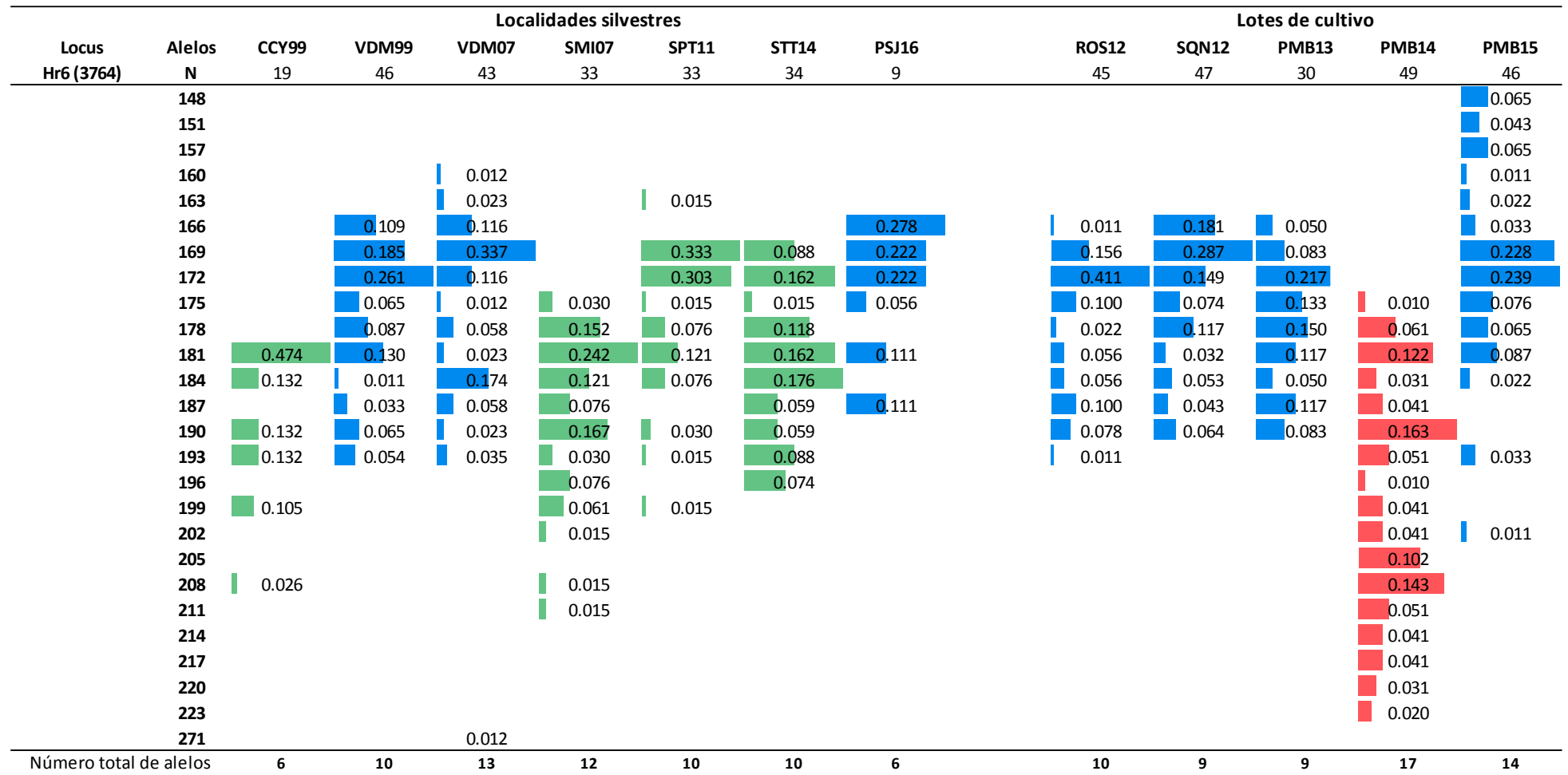


Figura 27. Frecuencias alélicas del locus Hr6 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (*H. rufescens*).

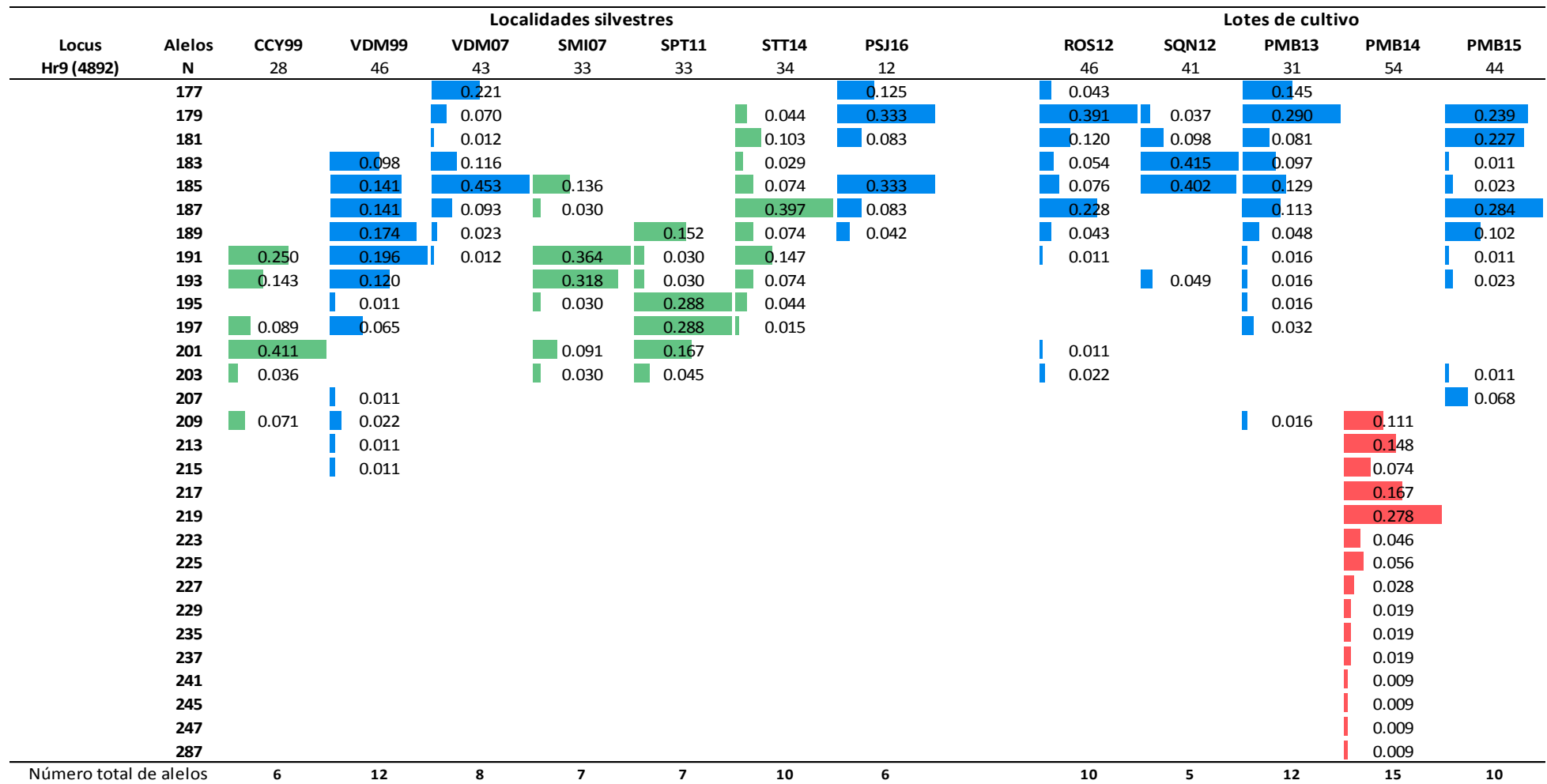


Figura 28. Frecuencias alélicas del locus Hr9 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (*H. rufescens*).

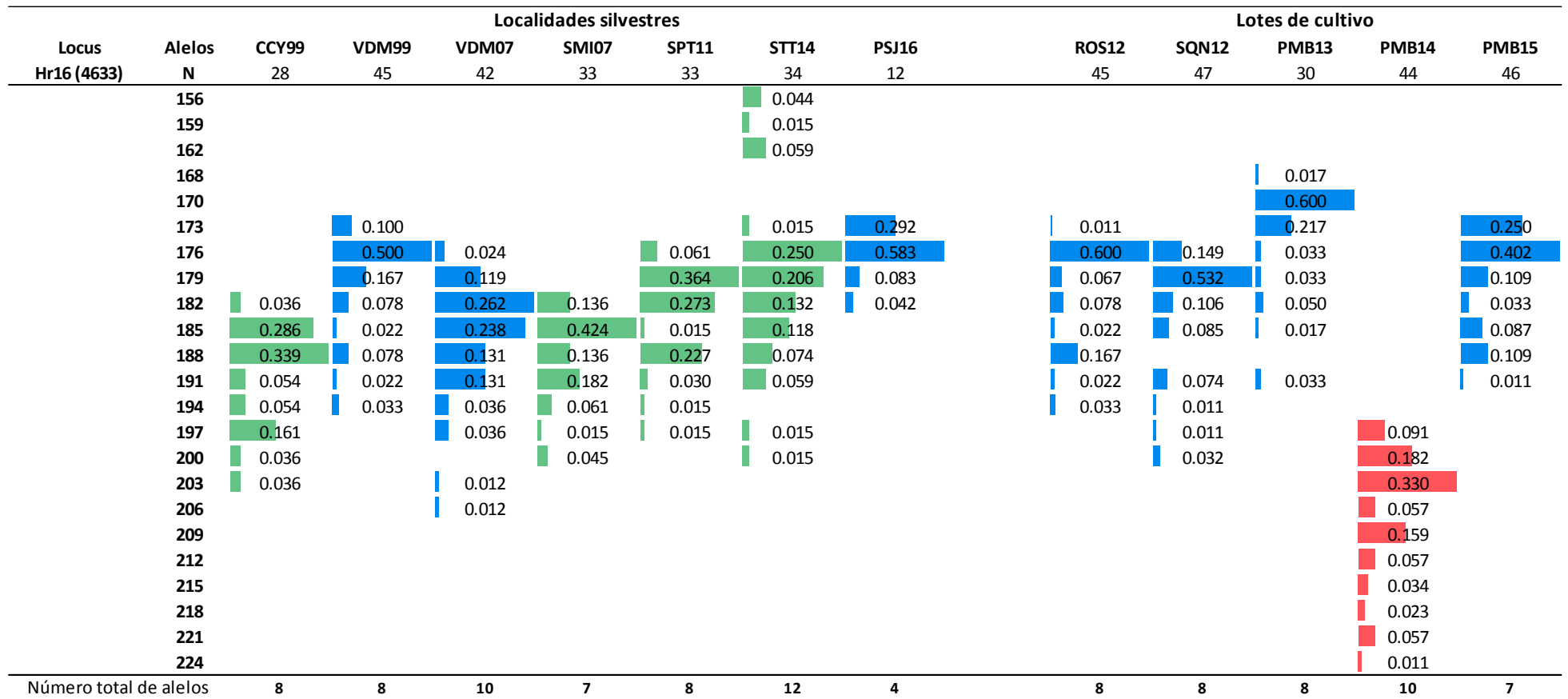


Figura 29. Frecuencias alélicas del locus Hr16 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (*H. rufescens*).

Locus Hr17 (12110)	Alelos N	Localidades silvestres							Lotes de cultivo				
		CCY99 28	VDM99 46	VDM07 42	SMI07 33	SPT11 31	STT14 34	PSJ16 12	ROS12 46	SQN12 47	PMB13 31	PMB14 54	PMB15 45
171				0.012							0.065		0.011
174			0.087	0.024				0.042		0.011	0.516		
177			0.196	0.083				0.042	0.228		0.306		0.011
180			0.185	0.452			0.059	0.417	0.239	0.160			
183			0.239	0.167			0.412	0.333	0.141	0.287	0.032		0.356
186			0.087	0.024	0.045	0.016	0.132	0.042	0.304	0.277	0.065		0.478
189	0.071	0.065	0.083	0.015	0.097	0.176			0.076	0.074			0.022
192	0.018	0.087	0.119	0.273	0.258	0.132	0.083			0.064			0.100
195	0.411	0.043	0.024	0.470	0.290	0.088	0.042			0.064			
198	0.214	0.011	0.012	0.076	0.161					0.064	0.016	0.019	0.011
201	0.196			0.076	0.129							0.009	
204				0.030	0.048				0.011			0.046	0.011
207	0.018											0.250	
210	0.071			0.015								0.361	
213												0.213	
216												0.056	
219												0.019	
222												0.028	
Número total de alelos		7	9	10	8	7	6	7	6	8	6	9	8

Figura 30. Frecuencias alélicas del locus Hr17 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (*H. rufescens*).

Locus Hr23 (4491)	Alelos N	Localidades silvestres							Lotes de cultivo					
		CCY99 28	VDM99 45	VDM07 42	SMI07 33	SPT11 33	STT14 34	PSJ16 12	ROS12 42	SQN12 47	PMB13 31	PMB14 54	PMB15 46	
146				0.012										
149				0.048				0.083						
152			0.044	0.012			0.044	0.125		0.071	0.053	0.016	0.033	
155			0.078	0.155	0.015		0.015	0.042			0.043	0.048	0.011	
158			0.222	0.095	0.015		0.029	0.375		0.286	0.394	0.065	0.065	
161			0.100	0.107			0.412			0.155	0.106	0.113	0.250	
164	0.036		0.056	0.107	0.045	0.015	0.059	0.083		0.083	0.032	0.177	0.174	
167	0.054		0.022	0.036	0.136	0.076	0.088	0.042		0.060	0.053	0.194	0.130	
170	0.089		0.067	0.071	0.136	0.167	0.059	0.125		0.095	0.043	0.177	0.011	
173	0.304		0.178	0.179	0.182	0.152	0.103			0.024	0.043	0.129	0.033	
176	0.054		0.144	0.107	0.136	0.076	0.074	0.083		0.131	0.138	0.081	0.043	
179	0.179		0.067	0.036	0.076	0.167	0.015	0.042		0.048	0.043		0.152	
182	0.089		0.022	0.024	0.121	0.121	0.074			0.024			0.076	
185	0.089				0.076	0.061				0.012		0.019	0.022	
188	0.089				0.015	0.091	0.029				0.011	0.065		
191						0.030					0.011	0.185		
194	0.018				0.015	0.015				0.012		0.148		
197					0.030	0.030						0.074		
200												0.167		
203												0.083		
206												0.139		
209												0.074		
212												0.037		
215												0.009		
227				0.012										
Número total de alelos		10	11	14	13	12	12	9		12	13	9	11	12

Figura 31. Frecuencias alélicas del locus Hr23 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (*H. rufescens*).

Locus Hr31 (3243)	Alelos N	Localidades silvestres							Lotes de cultivo				
		CCY99 27	VDM99 46	VDM07 43	SMI07 31	SPT11 27	STT14 33	PSJ16 12	ROS12 46	SQN12 47	PMB13 30	PMB14 53	PMB15 30
165			0.011						0.011				
168			0.033	0.058						0.053			
171			0.033	0.140		0.019		0.083	0.033	0.053			
174			0.239	0.267		0.074	0.030	0.083	0.043	0.032	0.017		0.033
177			0.098	0.151		0.278	0.152	0.417	0.174	0.245	0.033		0.167
180			0.087	0.047		0.111	0.212	0.083	0.141	0.117	0.183	0.009	0.400
183	0.019	0.054	0.047	0.048	0.185	0.167	0.083	0.083	0.087	0.074	0.183	0.019	0.083
186	0.074	0.087	0.081	0.032	0.222	0.106	0.083	0.163	0.096	0.117	0.117	0.019	0.033
189	0.222	0.087	0.105	0.210	0.019	0.136		0.065	0.117	0.117	0.406		0.067
192	0.352	0.065	0.058	0.210	0.037	0.076	0.083	0.065	0.117	0.083	0.085	0.085	0.083
195	0.093	0.076	0.012			0.015	0.083	0.076	0.043	0.183	0.066		0.033
197	0.037	0.022	0.012	0.048		0.030					0.123		0.033
198	0.019	0.022	0.023	0.032	0.019	0.030		0.033	0.032	0.050	0.047		0.017
201	0.056			0.161		0.030		0.076	0.021	0.033	0.075		0.033
204	0.037	0.033		0.081	0.037	0.015		0.033			0.047		0.017
207	0.056	0.022		0.048							0.075		
210	0.037	0.022		0.065							0.009		
213		0.011		0.032									
216				0.016							0.019		
224				0.016									
Número total de alelos		11	17	12	13	10	12	8	13	12	10	13	12

Figura 32. Frecuencias alélicas del locus Hr31 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (*H. rufescens*).

Locus Hr32 (1081)	Alelos N	Localidades silvestres							Lotes de cultivo				
		CCY99 28	VDM99 40	VDM07 42	SMI07 33	SPT11 33	STT14 32	PSJ16 12	ROS12 46	SQN12 47	PMB13 31	PMB14 46	PMB15 45
231												0.011	
263			0.075										
264			0.075										
265			0.150										
266			0.100				0.015						
267			0.125										
268			0.075										
269			0.050		0.119			0.063		0.417			0.111
270			0.100		0.310	0.061		0.063		0.417			0.444
271			0.050		0.405	0.242		0.047		0.083		0.065	0.400
272			0.050		0.131	0.182	0.121			0.083		0.258	0.022
273			0.075		0.024	0.152	0.091			0.587	0.064	0.419	0.022
274			0.025			0.030	0.061				0.489	0.194	
275			0.025										
276							0.047		0.022	0.213			
277							0.379	0.203		0.064			
278							0.061	0.078					
280							0.061	0.094					
281	0.107				0.152	0.121		0.016					
282	0.571	0.025			0.091	0.030		0.047					
283	0.214				0.030	0.061		0.125					
284	0.071							0.047					
285								0.031					
287					0.030			0.031					
289					0.030			0.016					
293	0.036							0.047					
296				0.012									
311												0.087	
313												0.109	
315												0.043	
317												0.022	
319												0.120	
321												0.304	
323												0.065	
325												0.043	
327												0.043	
331												0.065	
333												0.022	
335												0.043	
337												0.022	
Número total de alelos		5	14	6	10	10	16	4	3	6	5	14	5

Figura 33. Frecuencias alélicas del locus Hr32 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (*H. rufescens*).

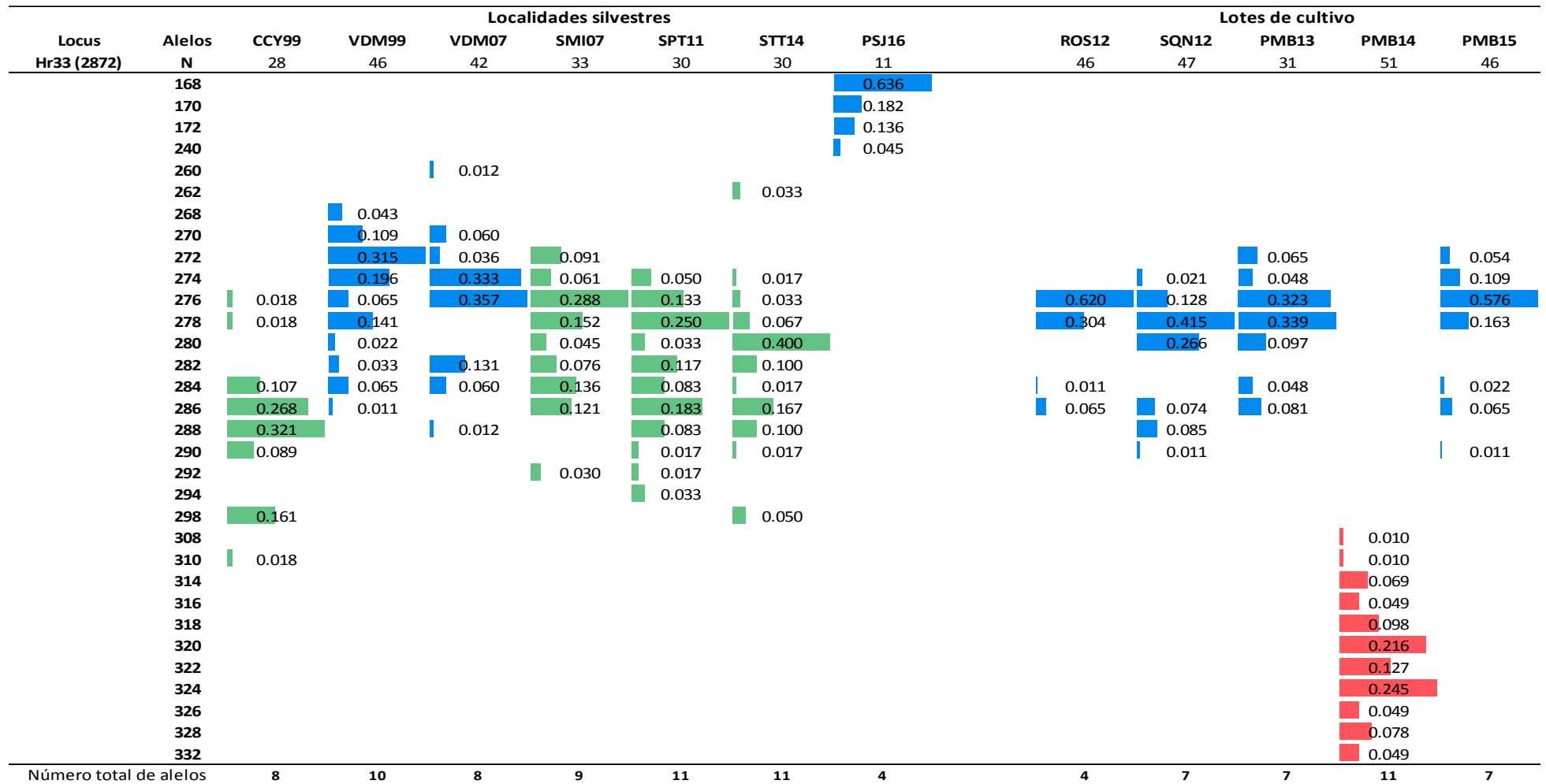


Figura 34. Frecuencias alélicas del locus Hr33 en las doce localidades de analizadas de abulón rojo (*H. rufescens*).

Anexo E

Tabla 13. Poblaciones de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) colectadas de diferentes localidades, número de individuos analizados por localidad (n), número de alelos (Na), alelos efectivos (Ne), heterocigotos observados (Ho), heterocigotos esperados (He), riqueza alélica (RA), Equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.05^*$) y coeficiente de endogamia (F_{IS}).

Locus	Código de las localidades																							
	CCY99 (n=27)		VDM99 (n=45)		VDM07 (n=42)		SMI07 (n=33)		SPT11 (n=32)		STT14 (n=33)		PSJ16 (n=12)		ROS12 (n=45)		SQN12 (n=46)		PMB13 (n=31)		PMB14 (n=51)		PMB15 (n=44)	
Hr1																								
Na / Ne	13	7.54	14	8.78	12	6.57	12	7.26	11	6.96	9	6.62	9	7.02	14	6.24	9	2.27	10	5.88	13	7.03	14	5.23
Ho	0.821		0.826		0.756		0.875		0.742		0.897		1.000		0.804		0.447		0.839		0.593		0.630	
He	0.867		0.886		0.848		0.862		0.856		0.849		0.858		0.840		0.560		0.830		0.858		0.809	
RA	8.686		8.877		7.525		8.21		7.621		7.168		8.317		7.854		5.478		7.355		8.019		7.773	
EHW	0.0015		0.0000		0.0023		0.0081		0.0000		0.4721		0.8030		0.0000		0.0000		0.0970		0.0000		0.0000	
F_{IS}	0.0710		0.0790		0.1200		0.0010		0.1500		-0.0390		-0.123		0.0530		0.2130		0.0060		0.3180		0.2310	
Hr2																								
Na / Ne	7	4.26	21	12.16	11	5.40	13	5.92	11	8.79	22	11.56	5	2.07	6	1.70	5	3.59	6	3.34	8	5.89	11	2.99
Ho	0.393		0.370		0.372		0.152		0.250		0.647		0.083		0.065		0.000		0.065		0.000		0.222	
He	0.765		0.918		0.815		0.831		0.886		0.913		0.517		0.411		0.722		0.700		0.830		0.665	
RA	5.676		11.008		7.071		8.481		8.548		11.189		4.444		3.457		4.307		4.450		6.517		5.090	
EHW	0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000	
F_{IS}	0.5000		0.6040		0.5520		0.8230		0.7260		0.3050		0.8510		0.8450		1.0000		0.9110		1.0000		0.6720	

Tabla 13. Continuación de la tabla.

Locus	Código de las localidades																							
	CCY99 (n=28)		VDM99 (n=46)		VDM07 (n=43)		SMI07 (n=33)		SPT11 (n=33)		STT14 (n=34)		PSJ16 (n=12)		ROS12 (n=46)		SQN12 (n=47)		PMB13 (n=31)		PMB14 (n=54)		PMB15 (n=46)	
Hr6																								
Na / Ne	6	3.47	10	6.61	13	5.52	12	7.05	10	4.33	10	7.97	6	4.91	10	4.42	9	6.01	9	7.50	17	10.84	14	7.11
Ho	0.579		0.522		0.698		0.758		0.606		0.941		0.667		0.600		0.660		0.867		0.653		0.565	
He	0.712		0.849		0.819		0.858		0.769		0.875		0.796		0.774		0.834		0.867		0.908		0.859	
RA	5.315		7.492		7.485		7.993		6.116		8.067		6.00		6.654		7.095		7.797		10.173		8.501	
EHW (P)	0.0461		0.0000		0.0000		0.0000		0.0002		0.0000		0.0937		0.0000		0.0000		0.0041		0.0000		0.0000	
F _{IS}	0.2130		0.3970		0.1590		0.1320		0.2270		-0.0610		0.2200		0.2350		0.2190		0.0170		0.2900		0.3520	
Hr9																								
Na / Ne	6	3.76	12	7.27	8	3.54	7	3.80	7	4.54	10	4.74	6	3.95	10	4.30	5	2.88	12	6.45	15	6.57	10	4.86
Ho	0.286		1.000		0.442		0.394		0.212		0.735		0.583		0.543		0.195		0.484		0.278		0.500	
He	0.734		0.862		0.718		0.737		0.780		0.789		0.747		0.767		0.653		0.845		0.848		0.794	
RA	5.175		7.545		5.335		5.242		5.517		7.197		5.631		6.306		4.042		7.862		7.903		5.986	
EHW	0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0175		0.0997		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000	
F _{IS}	0.6220		-0.1490		0.3940		0.4770		0.7350		0.0830		0.2600		0.3020		0.7070		0.4410		0.6770		0.3800	
Hr16																								
Na / Ne	8	4.31	8	3.31	10	5.64	7	3.90	8	3.79	12	6.61	4	2.30	8	2.50	8	3.03	8	2.42	10	5.36	7	3.90
Ho	0.536		0.333		0.500		0.424		0.394		0.765		0.083		0.511		0.340		0.267		0.364		0.457	
He	0.768		0.698		0.823		0.744		0.736		0.849		0.566		0.600		0.670		0.587		0.813		0.743	
RA	6.000		5.676		6.655		5.520		5.017		7.766		3.696		4.943		5.331		4.800		6.954		5.315	
EHW	0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0001		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000	
F _{IS}	0.3190		0.5310		0.4020		0.4420		0.4770		0.1140		0.8640		0.1580		0.5000		0.5570		0.5610		0.3950	

Tabla 13. Continuación de la tabla.

Locus	Código de las localidades																							
	CCY99 (n=28)		VDM99 (n=46)		VDM07 (n=43)		SMI07 (n=33)		SPT11 (n=33)		STT14 (n=34)		PSJ16 (n=12)		ROS12 (n=46)		SQN12 (n=47)		PMB13 (n=31)		PMB14 (n=54)		PMB15 (n=46)	
Hr17																								
Na / Ne	7	3.79	9	6.31	10	3.81	8	3.23	7	4.87	6	4.05	7	3.35	6	4.39	8	4.94	6	2.70	9	4.08	8	2.73
Ho	0.393		0.457		0.476		0.303		0.387		0.735		0.417		0.370		0.468		0.226		0.259		0.133	
He	0.736		0.841		0.738		0.690		0.794		0.753		0.701		0.772		0.798		0.630		0.755		0.634	
RA	5.228		7.006		6.138		5.257		5.748		5.454		5.946		4.934		6.139		4.303		5.473		4.041	
EHW	0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0001		0.0021		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000	
F _{IS}	0.4800		0.4660		0.3650		0.5710		0.5250		0.0380		0.4420		0.5290		0.4220		0.6510		0.6620		0.7940	
Hr23																								
Na / Ne	10	6.13	11	7.53	14	9.07	13	8.41	12	8.41	12	4.77	9	5.05	12	6.62	13	4.99	9	6.99	11	7.86	12	6.77
Ho	0.786		1.000		1.000		0.939		0.970		0.735		0.583		0.786		0.702		0.968		0.926		0.696	
He	0.837		0.867		0.890		0.881		0.881		0.790		0.802		0.849		0.799		0.857		0.878		0.852	
RA	7.717		8.115		8.986		8.588		8.567		7.842		8.067		7.916		7.822		7.359		7.969		7.716	
EHW	0.0130		0.0000		0.0000		0.0024		0.0000		0.0001		0.0047		0.0004		0.0000		0.1692		0.0000		0.0000	
F _{IS}	0.0790		-0.1420		-0.1120		-0.0510		-0.0850		0.0840		0.3130		0.0860		0.1320		-0.1130		-0.0520		0.1940	
Hr31																								
Na / Ne	11	5.04	17	9.28	12	6.98	13	7.39	10	5.48	12	7.38	8	4.50	13	9.12	12	7.96	10	7.14	13	4.80	12	4.71
Ho	0.593		0.783		0.698		0.710		0.667		0.909		0.750		0.717		0.809		0.867		0.698		0.567	
He	0.802		0.892		0.857		0.865		0.818		0.865		0.778		0.890		0.874		0.860		0.792		0.788	
RA	7.461		9.852		8.057		8.583		6.843		8.052		7.62		9.047		8.605		7.659		7.567		7.607	
EHW	0.0004		0.0001		0.0000		0.0062		0.0003		0.0001		0.0454		0.0000		0.0025		0.0003		0.0000		0.0000	
F _{IS}	0.2780		0.1340		0.1970		0.1950		0.2030		-0.0360		0.0790		0.2050		0.0860		0.0090		0.1280		0.2960	

Tabla 13. Continuación de la tabla.

Locus	Código de las localidades																							
	CCY99 (n=28)		VDM99 (n=46)		VDM07 (n=43)		SMI07 (n=33)		SPT11 (n=33)		STT14 (n=34)		PSJ16 (n=12)		ROS12 (n=46)		SQN12 (n=47)		PMB13 (n=31)		PMB14 (n=54)		PMB15 (n=46)	
Hr32																								
Na / Ne	5	2.56	14	11.11	6	3.43	10	6.52	10	5.08	16	10.50	4	2.77	3	2.01	6	3.17	5	3.47	14	6.95	5	2.70
Ho	0.000		0.000		0.048		0.000		0.030		0.719		0.000		0.000		0.000		0.000		0.022		0.000	
He	0.610		0.910		0.708		0.847		0.803		0.905		0.639		0.502		0.684		0.712		0.856		0.629	
RA	4.253		9.994		4.464		7.413		7.400		10.465		3.891		2.355		4.763		4.502		8.753		3.63	
EHW (P)	0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000	
F _{is}	1.0000		1.0000		0.9340		1.0000		0.9630		0.2210		1.0000		1.0000		1.0000		1.0000		0.9750		1.0000	
Hr33																								
Na / Ne	8	4.52	10	5.51	8	3.78	9	6.26	11	6.82	11	4.59	4	2.18	4	2.08	7	3.67	7	4.11	11	6.64	7	2.65
Ho	0.536		0.413		0.452		0.455		0.600		0.800		0.091		0.152		0.340		0.258		0.392		0.196	
He	0.799		0.819		0.736		0.840		0.853		0.782		0.541		0.519		0.727		0.757		0.849		0.622	
RA	5.725		6.944		5.311		7.357		7.850		7.133		3.815		2.935		5.090		5.773		7.589		4.836	
EHW	0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0371		0.0001		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000		0.0000	
F _{is}	0.3280		0.5040		0.3950		0.4710		0.3120		-0.0060		0.8460		0.7120		0.5400		0.6880		0.5450		0.6910	

Anexo F

Tabla 14. Comparación de los resultados obtenidos entre los 9 loci que comparten del presente estudio contra los resultados de Aguilar-Espinoza *et al.*, (2014), contenido de información polimórfica (PIC) y alelos nulos. Se agrega el locus Hr33 para posteriores análisis.

Locus	PIC este estudio	PIC	Alelos nulos este estudio	Alelos nulos	
				Chile	México
Hr1	0.913	0.875	0.034	0.195	0.066
Hr2	0.939	0.827	0.309	0.221	0.219
Hr6	0.89	0.77	0.084	-0.059	-0.021
Hr9	0.919	0.896	0.195	0.333	0.254
Hr16	0.876	0.895	0.195	-0.028	0.122
Hr17	0.896	0.868	0.204	0.002	0.285
Hr23	0.921	0.868	0.028	-0.022	0.068
Hr31	0.904	0.883	0.062	0.042	0.045
Hr32	0.916	0.883	0.406	0.378	-0.038
Hr33	0.881		0.218		

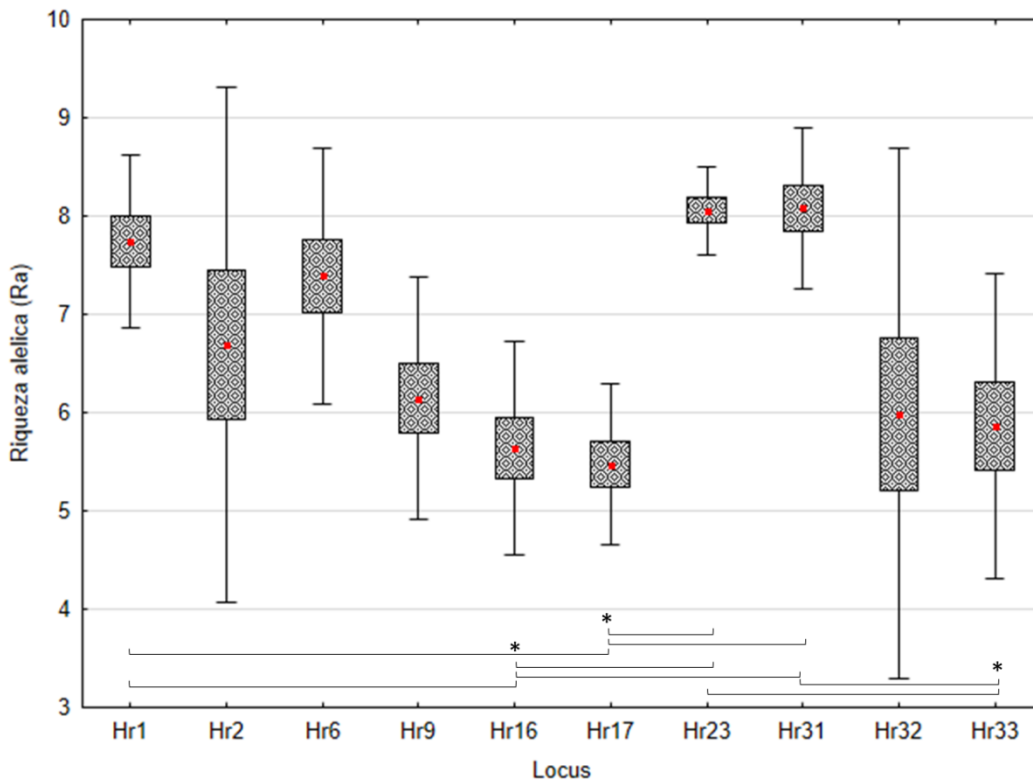


Figura 35. Riqueza alélica por locus evaluada en las doce localidades de *Haliotis rufescens*.

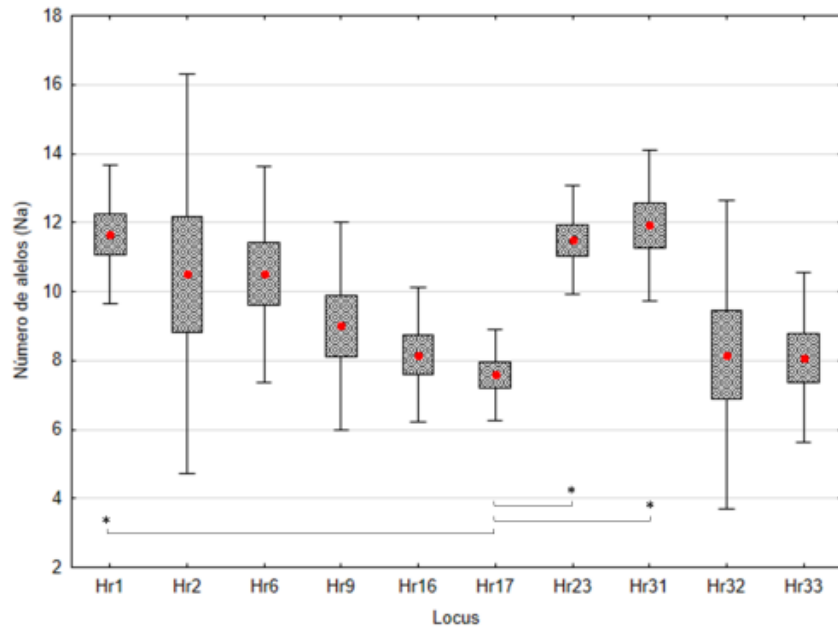


Figura 36. Número de alelos por locus evaluada en las doce localidades de *Haliotis rufescens*.

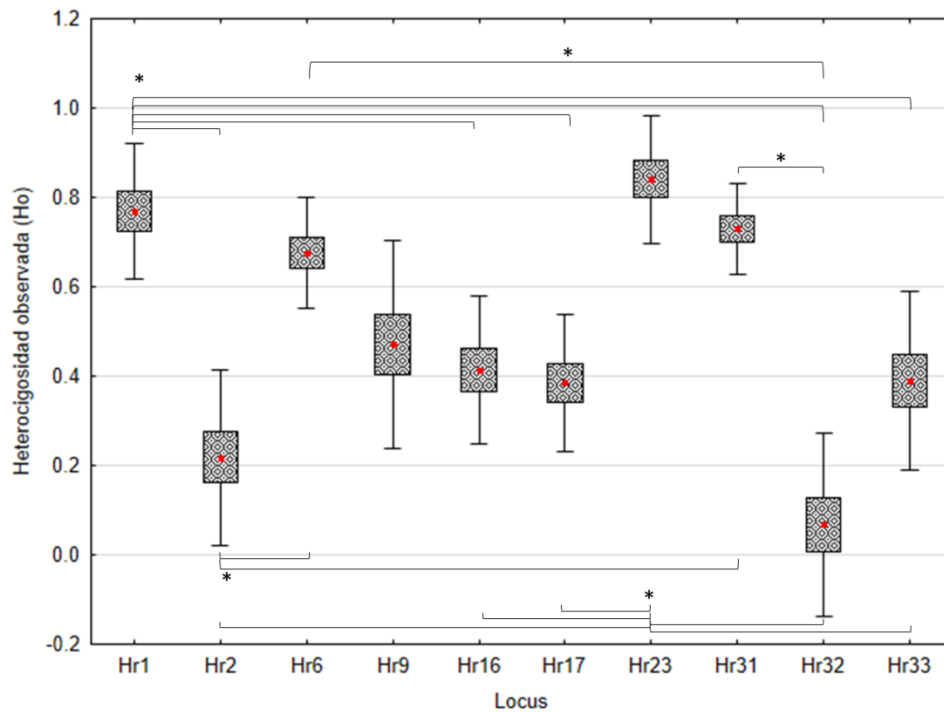


Figura 37. Heterocigosidad observada por locus evaluada en las doce localidades de *Haliotis rufescens*.