

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



**Maestría en Ciencias en Ciencias de la Vida con
orientación en Biotecnología Marina**

Genómica poblacional de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) en las
costas de la península de Baja California, México

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

Presenta:

Manuel Hueman Vargas Bravo

Ensenada, Baja California, México
2018

Tesis defendida por
Manuel Hueman Vargas Bravo

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Directora de tesis

Dra. Fabiola Lafarga De La Cruz

Dr. Cristian Manuel Araneda Tolosa

Dr. Fernando Díaz Herrera

Dr. Rodrigo Beas Luna



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinadora del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Manuel Hueman Vargas Bravo** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencias de la Vida con orientación en Biotecnología Marina.

Genómica poblacional de la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*) en las costas de la península de Baja California, México

Resumen aprobado por:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Directora de tesis

La almeja Mano de León (AML, *Nodipecten subnodosus*) es un bivalvo de importancia comercial. En México el recurso se extiende a ambos lados de la península de Baja California, la sobrepesca y mortandades masivas han reducido las poblaciones naturales, llevándolas al límite de su explotación, por lo que se han impuesto vedas indefinidas. La producción de semilla en laboratorio no es suficiente para detonar el cultivo. Adicionalmente, se puede afectar la diversidad genética de la especie en sus sitios de distribución, debido a que se ha observado alteración de las frecuencias alélicas, diferenciando la semilla de las poblaciones naturales. La secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción (RAD-seq), es una técnica muy útil para la evaluación genómica de poblaciones de organismos, permitiendo obtener una gran cantidad de marcadores a un relativo bajo costo. Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) son un ejemplo de estos marcadores, se utilizan comúnmente para describir la estructura poblacional y diversidad genética. El presente estudio analizó SNP's derivados de RADseq para describir la estructura poblacional a fina escala de cinco poblaciones naturales de AML en ambas costas de la península de Baja California y un stock de semillas (SEM) producido en laboratorio. Se observó que las poblaciones naturales presentan baja estructura poblacional. Los análisis de componentes genéticas (admixture) y principales (ADCP) indican un grupo único. La población artificial (SEM) presentó una diversidad genética similar a la de las poblaciones naturales, sin embargo, los individuos de este grupo se separan de las poblaciones naturales en el índice de fijación alélica. El análisis de admixture y el ADCP separaron SEM como un grupo distinto a las poblaciones naturales, con excepción de un individuo. Estos resultados sugieren que existe una población de AML, con diferencias en el índice de fijación alélica, pero con las mismas componentes genéticas. Las semillas de cultivo producidas en laboratorio resultan en un grupo de organismos con diferencias genéticas marcadas respecto a las poblaciones naturales. Éste trabajo finca las bases genéticas para la producción dirigida de organismos en laboratorio tanto para la acuicultura como para repoblar las poblaciones naturales de este recurso económico y ecológico.

Palabras clave: Genómica, Poblacional, Bivalvos, RAD-seq, SNP's.

Abstract of the thesis presented by **Manuel Hueman Vargas Bravo** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine Biotechnology

Population genomics of the lion paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) on the coasts of Baja California, Mexico

Abstract approved by:

PhD. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Thesis Director

Lion paw scallop is an economically important bivalve. Although the resource is distributed along the coast of the Baja California peninsula, its overfishing along with mass mortalities have reduced it to the limit it was necessary to implement a time undefined ban on the fishery. Production from aquaculture has been insufficient, and the laboratory generated spat has an altered allele frequency, so it possesses risk to the natural populations. The Restriction Associated DNA sequencing (RAD-seq), it's a very useful technique for genomic evaluation of populations, allowing to recover thousands of markers at relative low cost. Single Nucleotide Polymorphisms are an example of this markers, commonly used to assess population structure and genetic divergence. The present study analyzed RAD-seq derived SNP's to describe five natural populations of lion paw scallops and one laboratory derived spat stock (SEM). A low population structure was observed amongst the wild samples. Genetic components analysis (admixture) and Discriminant Principal Components Analysis (DPCA) indicate a unique group amongst wild samples. Artificial population (SEM) presented a genetic diversity similar to the natural populations. However, individuals in this artificial group have a significantly different fixation index (Fis). The admixture and DPCA tests indicate this artificial group is different to the wild populations. These results suggest there is a single population of lion paw scallops around the peninsula, with some populations having a unique demography that affects the Fis but the same genetic components. Laboratory produced spat results in a genetically different composition. This work sets the basis for directed laboratory spat production, for aquaculture but also for resettlement of the natural populations of this economic and ecological resource.

Keywords: Genomics , populations, bivalves, RAD-seq, SNP's.

Dedicatoria

Esta tesis no está dedicada.

Quien fuera almeja,

para estar todo el día bien concha...

(Anónimo)

Agradecimientos

A ti, que estás leyendo esto, gracias de verdad, aunque no estés nombrado aquí abajo. Ojalá te tomes el tiempo de leer toda la tesis también.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y a los miembros del CPP por la beca con Folio 25633. A los profesores que contribuyeron a mi desarrollo académico. Al todo el personal técnico, administrativo y de servicios que me hicieron la vida más fácil.

Al CONACYT por la Beca de Manutención No de registro 615424 folio 23279 que me permitió realizar mis estudios.

A INAPESCA (2016) por el apoyo para el proyecto “Diversidad genética en poblaciones de Almeja Mano de León *Nodipecten subnodosus*: bases genéticas para establecer programas de crianza selectiva en Baja California”.

A la doctora Clara Elizabeth Galindo Sánchez por aceptarme como estudiante y darme la oportunidad y los medios para hacer esta tesis, por la paciencia, la confianza, las salidas de campo, las reuniones sociales, los vinitos, las artesanales y por hacer la estancia en Ensenada más amena.

A la Doctora Fabiola Lafarga de la Cruz, por su apoyo para realizar esta tesis, las salidas de campo, por estar siempre al pendiente y dispuesta a ayudar.

Al Dr. Cristian Araneda Tolosa, por sus contribuciones al trabajo y por el curso de STACKS.

Al Dr. Rodrigo Beas Luna, gracias por el apoyo durante el proceso de esta tesis.

Al Dr. Fernando Díaz Herrera, por su ayuda y apoyo durante el proceso de esta tesis.

Al colega Oc. Dahren Lindbergh Gómez Togo por realizar la búsqueda y muestreo de muchas de las almejas utilizadas para realizar los análisis genéticos, por la salida al barril.

Al Dr. Zaúl García Esquivel, por las muestras que nos proporcionó y por enseñarme a sacar biopsias de almejas. Al Dr. César Ruíz, por las muestras de La Paz que nos donó, aunque probablemente no sean mano de león, veremos. A la Dra. Laura Teresa Guzmán Villanueva por las muestras de Laguna Ojo de Liebre que nos envió.

A la Dr. Edna Sánchez, la M. en C. Carmen Elvira Vargas Peralta y la M. en C. Ma. Dolores Camacho López, gracias por instruirme y proveerme en los laboratorios y por la ayuda con las extracciones y estandarizaciones de ADN para este trabajo. Fis. Sylvia Camacho Lara por la ayuda y apoyo con el cluster. Al Dr. Jaime Gasca-Pineda, por su valioso apoyo con la informática y los scripts del R.

A la M. en C. Brenda Priscila Oviedo, por las estandarizaciones de ADN que hizo y envió a secuenciar. A la M. en C. Araceli por las muestras que trajo de la isla y por hacer amena la salida a Natividad.

A la Sociedad Cooperativa de Producción Pesquera Buzos y Pescadores de la Baja California, S.C.L. por facilitar la logística para la obtención de muestras de isla Natividad.

A los y las compañeras del laboratorio Anaíd, Javier, Laura, Edgar, Ricardo, Oscar, Erick, Mainer, Louisiana, Manuel, Sandra, Blanca, Silvia, Jordi, cada uno de ustedes ha hecho en parte esta tesis, muchas gracias por toda su ayuda.

A mis compañeros de generación Mateo, Ari, Joel, Perla, Rodrigo, William, Pablo y todos los otros veintitantos más, gracias por todos esos semestres de locura y aprendizaje, no sé cómo habría sido sin ustedes, pero sé que fue muy divertido porque estuvieron.

A los de Isla Natividad Soru y Maite (bien rica la comida), Julio (chido por el pollo ese y por sacar el día de pesca), Pony (y su esposa que me regalaron tamales), el Profe (por enseñarme de abulones, bien rifados los pollos).

A Doña Karla, por echarme porras y darme ánimos cada que llegaba a recibir sus sagrados alimentos, cansado, frustrado, abrumado, abatido y desolado de estar en el laboratorio.

A los amigos, Blanca, Tadashi, Alex, Erick, Ari, Fati, Javi, Mateo, Sandy, Mau, Alejandro, por todos los desestreses y comilonas que nos pegamos, sin ustedes no tendría estos kilos de alegría.

A Alexandra Elbakyan, por luchar para remover todas las barreras en el camino de la ciencia.

A mis padres Citlali y Chava, que además de darme la vida, me enseñaron a vivirla y me acompañan en cada paso que doy, gracias.

A mi hermana Eren, gracias por tus largas horas de platica, son pura terapia de risa.

A mis abuelos: Tere, Meño, Elisa y José, su cariño y enseñanzas me trajeron hasta aquí, hasta donde me llevarán...

Gracias a mis suegros Mary Carmen y Aurelio, por sus ánimos, su gran apoyo, ayuda y también por los quesos, chorizos, lomos, aceites, turriones, semillas, especias y demás delicias ibéricas que alimentaron mi cerebro con grandes cantidades de calorías.

Gracias a ti, Blanca, por todo y tanto.

Tabla de contenido

| | Página |
|--|--------|
| Resumen en español..... | ii |
| Resumen en inglés..... | iii |
| Dedicatorias..... | iv |
| Agradecimientos..... | v |
| Lista de figuras..... | ix |
| Lista de tablas..... | xi |
| | |
| Capítulo 1. Introducción | |
| 1.1 Antecedentes..... | 1 |
| 1.1.1 Biología de la especie..... | 2 |
| 1.1.2 Distribución y explotación de la Almeja Mano de León..... | 3 |
| 1.1.3 Situación actual de la especie..... | 5 |
| 1.1.4 Cultivo de Almeja Mano de León..... | 5 |
| 1.1.5 Genética de Almeja Mano de León..... | 6 |
| 1.1.6 Secuenciación masiva de alto rendimiento..... | 8 |
| 1.2 Justificación | 8 |
| 1.3 Hipótesis..... | 9 |
| 1.4 Objetivos..... | 10 |
| 1.4.1 Objetivo general | 10 |
| 1.4.2 Objetivos específico..... | 10 |
| | |
| Capítulo 2. Metodología | |
| 2.1 Toma de muestras biológicas | 11 |
| 2.2 Análisis de laboratorio..... | 13 |
| 2.3 Análisis bioinformático..... | 13 |
| | |
| Capítulo 3. Resultados | |
| 3.1 Secuenciación de muestras | 16 |
| 3.2 Genotipado de poblaciones silvestres | 17 |
| 3.2.1 Descripción genética de las poblaciones naturales. | 17 |
| 3.2.2 Índices de fijación alélica entre poblaciones silvestres. | 20 |

| | |
|--|----|
| 3.2.3 Asignación poblacional de las muestras silvestres..... | 21 |
| 3.3 Genotipado incluyendo los organismos de cultivo..... | 24 |
| 3.3.1 Descripción genética incluyendo semilla de cultivo..... | 25 |
| 3.3.2 Índices de fijación alélica incluyendo semilla de cultivo..... | 27 |
| 3.3.3 Asignación poblacional incluyendo semilla de cultivo. | 29 |
| | |
| Capítulo 4 . Discusión | |
| 4.1 Secuenciación de muestras..... | 33 |
| 4.2 Genotipado de poblaciones naturales..... | 34 |
| 4.2.1 Índices de fijación alélica de las poblaciones naturales..... | 36 |
| 4.3 Comparación con la semilla de cultivo..... | 37 |
| 4.3.1 Índices de fijación alélica, ligeramente mayores en SEM..... | 38 |
| | |
| Capítulo 5 . Conclusiones | 41 |
| | |
| Literatura citada..... | 42 |

Lista de figuras

| Figura | | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Concha de ejemplar de <i>Nodipecten subnodosus</i> adulto, obtenido de PectenSite..... | 1 |
| 2 | Anatomía general de la almeja Mano de León, la parte más apreciada comercialmente es el músculo rápido. Tomado de FAO.org..... | 3 |
| 3 | Mapa de la península de Baja California, México, dónde se muestran las principales zonas de aprovechamiento de pectínidos. Tomado de Ruíz-Verdugo et al. en Shumway y Parsons 2013..... | 4 |
| 4 | Rango de lecturas obtenidas por muestra. La línea punteada representa el valor consenso de 1millón de lecturas por muestra y la discontinuidad indica el punto de corte. | 16 |
| 5 | Gráfico de componentes genéticas obtenidas con el programa STRUCTURE y el método de Evanno en 5 poblaciones naturales de almeja mano de león (N. subnodosus) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel Total 2,487 SNP's, Panel Neutral 1,276 SNP's y Selección 144 SNP's. Las poblaciones están numeradas (1=PSO, 2=BLA, 3=ANI, 4= PSO y 5=NAT), y cada barra representa un organismo de la población con las diferentes proporciones genéticas (K) en colores distintos..... | 22 |
| 6 | Gráfico de componentes genéticas obtenidas con el programa STRUCTURE utilizando la menor división posible (k=2) en 5 poblaciones naturales de almeja mano de león (N. subnodosus) con el Panel Total 2,487 SNP's. Las poblaciones están numeradas (1=PSO, 2=BLA, 3=ANI, 4= PSO y 5=NAT), y cada barra representa un organismo de la población con las diferentes proporciones de las componentes genéticas (K) en colores distintos..... | 23 |
| 7 | Gráfico del análisis discriminativo de componentes principales (ADCP) en 5 poblaciones naturales de almeja mano de león (N. subnodosus) con el Panel Total 2,487 SNP's. Se recobraron 105 eigenvalores y dos componentes principales, además se muestra el árbol de máxima expansión uniendo las poblaciones..... | 23 |
| 8 | Gráfico de asignación del análisis discriminativo de componentes principales (ADCP) en cinco poblaciones naturales de almeja mano de león (N. subnodosus) con el Panel Total 2,487 SNP's y utilizando el sitio de origen como grupo. Se recobraron 105 eigenvalores (>95% varianza) y dos componentes principales..... | 24 |
| 9 | Gráfico de componentes genéticas obtenidas con el programa STRUCTURE y el método de Evanno en 5 poblaciones naturales y un lote de semilla cultivo producido en laboratorio de almeja mano de león (N. subnodosus) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel Total 1,979 SNP's, Panel Neutral 1062 SNP's y Selección 120 SNP's. Las poblaciones están numeradas (1=PSO, 2=BLA, 3=ANI, 4= PSO, 5=NAT y 6=SEM), y cada barra representa un organismo de la población con las diferentes proporciones de las componentes genéticas (K) en colores distintos..... | 29 |

| | | |
|----|--|----|
| 10 | Gráfico del Análisis Discriminativo de Componentes Principales en cinco poblaciones naturales y un lote de semilla cultivo producido en laboratorio de almeja mano de león (N. subnodosus) con el Panel Total 1,979 SNP's, utilizando k=2 grupos según el menor criterio de información de bayes (CIB), con una componente principal que reúne más del 95% de la varianza..... | 30 |
| 11 | Gráfico de asignación de organismos del análisis discriminativo de componentes principales (ADCP) en cinco poblaciones naturales y un lote de semilla cultivo producido en laboratorio de almeja mano de león (N. subnodosus) con el Panel Total 1,979 SNP's y utilizando la agrupación del ADCP con k=2 grupos según el menor criterio de Información de Bayes (CIB) | 31 |
| 12 | Gráfico de asignación del análisis discriminativo de componentes principales (ADCP) en cinco poblaciones naturales y un lote de semilla cultivo producido en laboratorio de almeja mano de león (N. subnodosus) con el panel Total 1,979 SNP's y utilizando el sitio de origen como grupo. Se recobraron 105 eigenvalores (>95% varianza) y dos componentes principales..... | 31 |
| 13 | Gráfico de análisis discriminativo de componentes principales en cinco poblaciones naturales y un lote de semilla cultivo producido en laboratorio de almeja mano de león (N. subnodosus) con el Panel Total 1,979 SNP's, utilizando las poblaciones como grupos, con dos componentes principales que reúnen más del 95% de la varianza explicada..... | 32 |

Lista de tablas

| Tabla | Página |
|---|--------|
| 1 Relación de muestras de Almeja Mano de León, colectadas para este estudio, el lugar de donde fueron obtenidas, el número de muestras obtenidas y las enviadas a secuenciación por RAD-seq a la empresa FLORAGENEX (FGX) | 12 |
| 2 Descripción genética de cinco poblaciones naturales de almeja mano de león (<i>N. subnodosus</i>) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel <i>Total</i> 2,487 SNP's, Panel <i>Neutral</i> 1,276 SNP's y Selección 144 SNP's. Se muestra el Número efectivo de individuos (No. Ind.), Heterocigosidad observada y esperada (H_o , H_e respectivamente), el coeficiente de endogamia F_{is} (los valores en negritas no son diferentes a cero, según el intervalo de confianza de la función autodecimente), así como el número de sitios variantes, loci polimórfico y el % de loci polimórficos..... | 18 |
| 3 Prueba exacta de Hardy-Weinberg de cinco poblaciones naturales de almeja mano de león (<i>N. subnodosus</i>) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel <i>Total</i> 2,487 SNP's, Panel <i>Neutral</i> 1,276 SNP's y Selección 144 SNP's. Se muestran los valores de la prueba de χ^2 , los grados de libertad (Df) y el valor de probabilidad asociado a la prueba (valores menores a 0.00001 son mostrados como High. sign.....) | 19 |
| 4 Pruebas de F_{st} pareadas (debajo de la diagonal) y sus respectivos intervalos de confianza (sobre la diagonal) de cinco poblaciones naturales de almeja mano de león (<i>N. subnodosus</i>) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel <i>Total</i> 2,487 SNP's, Panel <i>Neutral</i> 1,276 SNP's y Selección 144 SNP's. En negritas se muestran los valores que son distintos a cero..... | 21 |
| 5 Descripción genética de cinco poblaciones naturales y una cohorte producida en laboratorio de almeja mano de león (<i>N. subnodosus</i>) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel <i>Total</i> 1,979 SNP's, Panel <i>Neutral</i> 1062 SNP's y Selección 120 SNP's. Se muestra el Número efectivo de individuos (No. Ind.), Heterocigosidad observada y esperada (H_o , H_e respectivamente), el coeficiente de endogamia F_{is} (los valores en negritas no son diferentes a cero, según el intervalo de confianza de la función autodecimente), así como el número de sitios variantes, loci polimórfico y el % de loci polimórficos..... | 26 |
| 6 Prueba exacta de Hardy-Weinberg de cinco poblaciones naturales una cohorte producida en laboratorio de almeja mano de león (<i>N. subnodosus</i>) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel <i>Total</i> 1,979 SNP's, Panel <i>Neutral</i> 1062 SNP's y Selección 120 SNP's. Se muestran los valores de la prueba de χ^2 , los grados de libertad (Df) y el valor de probabilidad asociado a la prueba (valores menores a 0.00001 son mostrados como High. sign.....) | 27 |
| 7 Pruebas de F_{st} pareadas (debajo de la diagonal) y sus respectivos intervalos de confianza (sobre la diagonal) de cinco poblaciones naturales y una cohorte producida en laboratorio de almeja mano de león (<i>N. subnodosus</i>) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel <i>Total</i> 1,979 SNP's, Panel <i>Neutral</i> 1062 SNP's y Selección 120 SNP's. En negritas se muestran los valores que son distintos a cero..... | 28 |

Capítulo 1. Introducción

1.1 Antecedentes

México cuenta con una gran diversidad de géneros de bivalvos, dentro de los cuales, los pectínidos aportan 28 especies reportadas, nueve de las cuales son explotadas comercialmente. Tres de estas especies son de gran importancia comercial: la almeja Voladora (*Euvola vogdesi*), la almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*) y la almeja Mano de León (*Nodipecten subnodosus*) (AML) (Figura 1) (Chávez-Villalba y Cáceres-Martínez, 1992; Morales-Hernández y Cáceres-Martínez, 1997). La AML es la más grande de las tres especies, se han registrado ejemplares de hasta 260gr (Beltrán-Lugo, 2005), representa una pesquería importante con gran demanda debido al tamaño y calidad del callo (Jiménez-Ruíz et al. 2012) (i.e. músculo aductor, Figura 3). Además, la concha (Figura 1) es un subproducto muy apreciado por su gran tamaño y vistosa coloración, lo cual le confiere un valor agregado a las almejas (Ponce-Díaz et al., 2011). La concha puede adquirir diferentes coloraciones de manera natural, por lo que esta especie ha despertado gran interés también para producción de producir perlas (Martínez et al. 2012).



Figura 1. Concha de ejemplar de *Nodipecten subnodosus* adulto, obtenido de PectenSite.

1.1.1 Biología de la especie

N. subnodosus es un bivalvo pectínido (Félix-Pico et al. 1999) con una característica concha calcárea simétrica de gran grosor y tamaño (>20cm) en forma de abanico. Posee una textura externa rugosa y diferentes coloraciones que varían entre el blanco, rosa, naranja o morado. Presenta de 9 a 10 costillas muy notables, con la valva izquierda ornamentada con una o más series de protuberancias a manera de nódulos (Keen, 1971).

La AML habita sobre todo en fondos arenosos, desde la zona por debajo de la línea intermareal hasta los 110m donde se alimenta por medio de filtración. Esta especie se localiza en diversos hábitats, que además del océano incluyen lagunas costeras, bahías y canales profundos con corrientes fuertes (Fischer et al., 1995). Se ha especulado mucho sobre la capacidad natatoria de la especie, ya que otros pectínidos son conocidos por su desplazamiento propulsado por el movimiento de las valvas (Himmelman et al., 2009; Tremblay et al., 2012). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, esta habilidad no ha sido documentada para este organismo.

La AML es una especie hermafrodita funcional (Figura 2), con la peculiaridad de madurar gametos masculinos y femeninos al mismo tiempo. Esta característica puede conllevar implicaciones negativas, ya que, aunque el desove no ocurre de manera simultánea, podría generarse un cierto grado de endogamia en las poblaciones naturales y, sobre todo, en el caso de la reproducción de organismos para cultivo (Arellano-Martínez *et al.*, 2004). Un solo organismo puede desovar más de 2 millones de ovocitos, los cuales son fertilizados en suspensión donde se desarrollan como parte del plancton durante las siguientes etapas, hasta su asentamiento como juveniles algunas semanas más tarde (Román et al. en Maeda-Martínez (ed.) 2001). La talla reportada para su primera madurez es variable presentándose en un promedio de 125mm L (longitud). Sin embargo, al igual que ocurre con la mayoría de los organismos del género *Nodipecten*, la AML se considera una especie con reproducción precoz, ya que pueden madurar desde longitudes de los 29-mm L (Lodeiros et al., 1998).

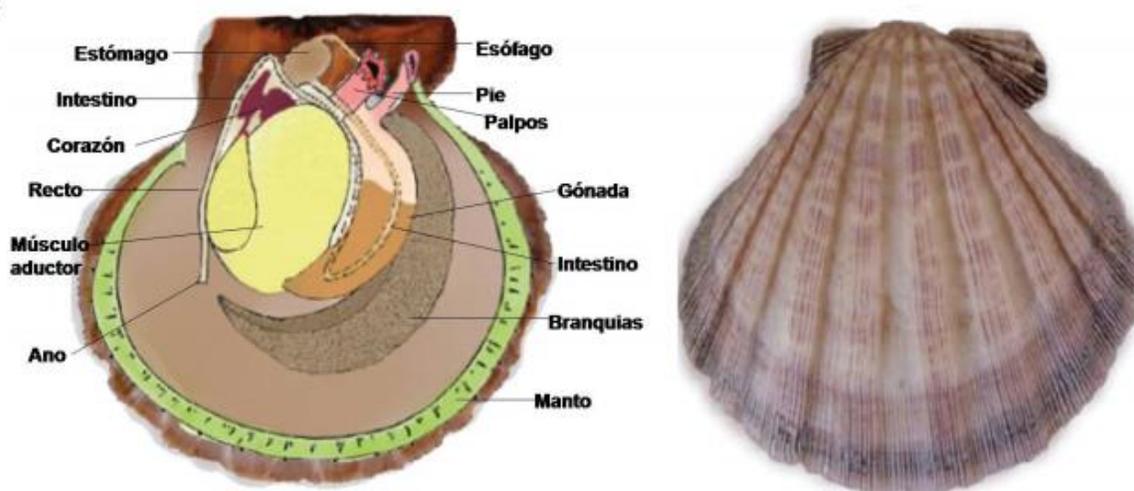


Figura 2. Anatomía general de la almeja Mano de León, la parte más apreciada comercialmente es el músculo aductor. Tomado de FAO.org.

La época de reproducción presenta diferencias según la localidad, lo cual se cree que puede estar determinado por la disponibilidad de nutrientes y las condiciones ambientales (Sastry, 1979; Román et al., 2001). Mientras que en la Laguna Ojo de Liebre se han observado gónadas maduras en una sola temporada del año, iniciando entre los meses de agosto-septiembre hasta noviembre (Arellano-Martínez *et al.*, 2004 y 2011), en otras zonas de su distribución, tanto en el Pacífico (Bahía Tortugas) como en el Golfo de California, su reproducción ha sido reportada como continua, observándose gónadas maduras durante todo el año (Racotta *et al.*, 2003; Villalejo-Fuerte *et al.*, 2004; Yee-Duarte, 2009 y Dapa *et al.*, 2015). Esta reproducción continua se observa también en poblaciones en cultivo, en ambas costas de la Península de Baja California (Villalejo-Fuerte *et al.*, 2004; Arellano-Martínez *et al.*, 2011; Dapa et, al. 2015).

1.1.2 Distribución y explotación de la Almeja Mano de León

La distribución histórica de la AML abarca desde la Laguna Manuela en Baja California (México), incluyendo el Golfo de California, hasta las costas de Paita (Perú) (Keen, 1971). En México, el recurso se aprovecha a baja escala en ambos lados de la península de Baja California (Figura 3), siendo la Laguna Ojo de Liebre (DOF, 2012) el único lugar con pesquerías importantes presentando 17 bancos naturales explotados históricamente (Massó-Rojas *et al.*, 2000) y producciones que alcanzaban los cientos de

toneladas anuales (Yee-Duarte, 2009). En esa área en 2010, los reportes indicaban tasas de crecimiento constante, sin embargo, en febrero de 2011 se presentó una disminución poblacional (3.7%). Estas bajas fueron seguidas de mortandades masivas de organismos, donde se estima que sólo sobrevivió alrededor de un 60% de la población inicial (Massó-Rojas et al., 2014). Aunque se desconoce la causa de estas mortandades, ese mismo año (2011) se reportaron casos de infección bacteriana por vibrios en cultivos de Bahía Tortugas, Baja California Sur, los cuales fueron identificados por deformaciones y pigmentaciones atípicas en las conchas de los organismos afectados, con altas mortalidades asociadas y bajas tasas de crecimiento en el cultivo (Villalva-Vega 2011). Adicionalmente, una infestación de poliquetos del género *Polydora* fue reportada en bancos de AML dentro de la Bahía Ojo de Liebre. A partir de 2013 la tendencia fue una reducción en la infestación de este parásito causante de anomalías en la concha (“ampollas de lodo”), hasta octubre de 2015, siendo los organismos de menor tamaño los más afectados por este parásito (González-Ortiz et al. 2017). Otras causas podrían incluir condiciones oceanográficas y/o ambientales como las fuertes anomalías termales negativas ocurridas en el año 2011, conocido como el fenómeno de La Niña (Boening et al. 2012).

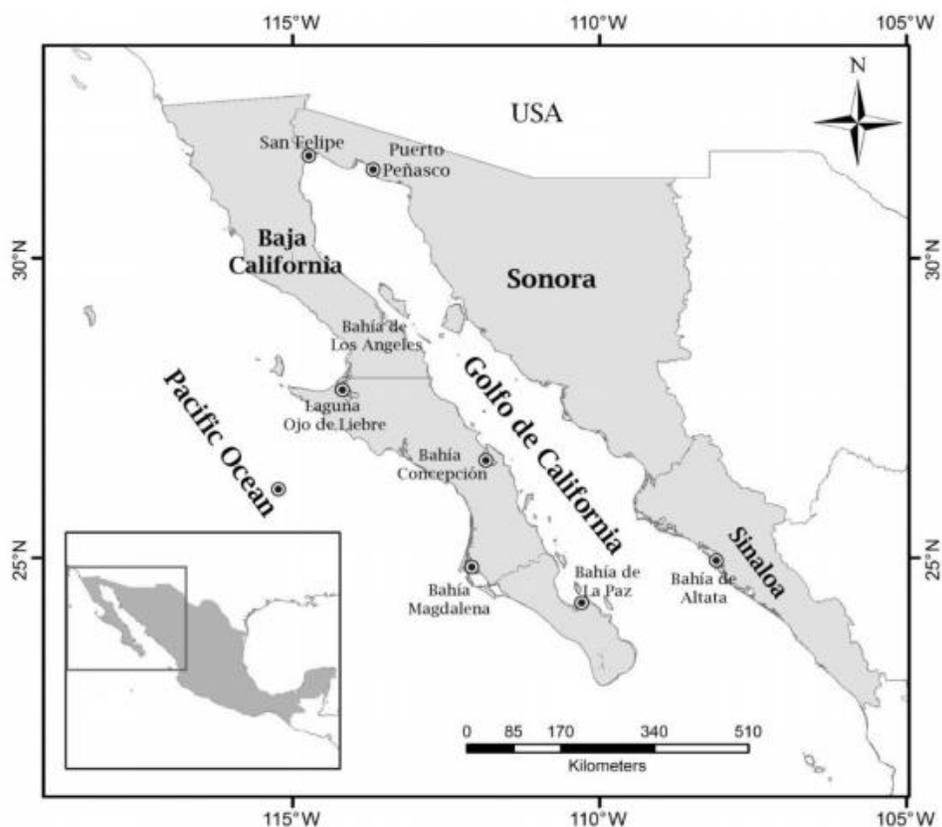


Figura 3. Mapa de la península de Baja California, México, dónde se muestran las principales zonas de aprovechamiento de pectínidos. Tomado de Ruíz-Verdugo et al. en Shumway y Parsons 2013.

1.1.3 Situación actual de la especie

Las poblaciones naturales de este recurso en México se encuentran al pleno de su explotación, por lo que la autoridad recomienda no aumentar el esfuerzo pesquero hacia esta especie (SEMARNAT 2012). A pesar de estas importantes reducciones poblacionales y mortalidades masivas la ALM no está incluida en ninguna lista de conservación como la NOM-059 (SEMARNAT-2010), ni ha sido evaluada por la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) (IUCN 2017), por lo que su única “protección” son las vedas impuestas y las cuotas de captura establecidas para cada banco (CONAPESCA 2014).

1.1.4 Cultivo de Almeja Mano de León

El cultivo de *N. subnodosus* ha generado gran interés en la comunidad tanto acuícola como científica de México. Su alta tasa de crecimiento en cultivo (0.24mm/día, Ramírez-Árce, 2009) la postula como un buen candidato para su reproducción y cultivo, lo que ha llevado a explorar diferentes aspectos como son su biología reproductiva (Reinecke-Reyes 1996, Arellano-Martínez *et al.*, 2004), diferentes condiciones y métodos de cultivo (Villalejo-Fuerte *et al.* 2004, Pérez de León *et al.* 2005), así como la abundancia larvaria y captación de semilla en poblaciones naturales (Maguiño-Napurí *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de la alta demanda del mercado, no se reporta hasta la fecha la existencia de producción sostenida por la acuicultura (FAO 2014) y no existen actualmente concesiones de cultivo comercial, por lo que todos los cultivos existentes son con propósitos únicamente de investigación para la validación de *N. subnodosus* como una especie dedicada a la acuicultura (SEPESABC, 2011).

Los primeros éxitos reproductivos en laboratorio fueron documentados por Carbajal-Rascón (1989), quién reportó el cultivo larvario de la almeja mano de león a partir de organismos crecidos y madurados en laboratorio.

En la Laguna Ojo de Liebre, Baja California Sur, se realizaron las primeras evaluaciones del crecimiento de juveniles en cultivos suspendidos a partir de larva generada en laboratorio (García-Domínguez *et al.*, 1992), lo cual fue replicado posteriormente en Bahía de la Paz (Barrios-Ruíz *et al.*, 1997). Los esfuerzos por cultivar esta especie han conllevado la exploración de diversos sistemas para su cultivo,

tanto en el Golfo de California como en El Pacífico (Duarte 2009; Ramírez-Árce 2009; Ángel-Dapa 2010, Koch et al 2013). Así mismo, existe información acerca del efecto de la fluctuación de la temperatura en eficiencia de la absorción de alimento in vitro (Guzmán-Guadalupe et al., 2013). Incluso se han utilizado técnicas de manipulación cromosomales, para generar triploides (Racotta *et al.* 2003; Maldonado-Amparo et al. 2004) con la finalidad de mejorar los rendimientos del cultivo.

Un estudio realizó trasplantes cruzado de organismos entre el Estero San Buto (Bahía Magdalena) y El Pardito (entre Isla San José e Isla San Francisquito), en cultivos suspendidos y de fondo, encontrando que los organismos provenientes del Golfo de California (El Pardito) resisten mejor las altas temperaturas y presentan una menor mortalidad respecto a las del Pacífico (Estero San Buto) independientemente del método de cultivo (Koch et al. 2015).

1.1.5 Genética de Almeja Mano de León

Uno de los primeros estudios genéticos llevado a cabo en poblaciones naturales de AML fue realizado con 25 individuos de la Laguna Ojo de Liebre y cinco de La Paz. Se generaron 35 loci microsatelites o SSR (por sus siglas en inglés Single Sequence Repetition) de los cuales la mayoría (n=33), cumplía con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Además, presentaron un nivel de polimorfismo considerado como mediano-alto (i.e. 4 a 28 alelos por loci), verificando la amplificación cruzada con otros pectínidos como *A. irradians* de EUA (Atlántico), *A. purpuratus* de Chile (Pacífico), *A. ventricosus* de México (Pacífico) y *N. nodosus* de Venezuela (Atlántico) (Ibarra et al., 2006). Se observó una buena amplificación específica para *N. subnodosus* en 9 de los 35 microsatelites probados.

Con los mismos microsatelites usados en ese primer estudio junto con la secuenciación del ADN mitocondrial (mtADN) de la AML, Petersen y colaboradores (2008) realizaron un estudio de parentesco en un desove inducido, observando que el 51.7% de la progenie eran hermanos, es decir, provenía de la misma pareja o mismo individuo autofecundado. Estos resultados denotan una contribución significativamente desigual entre los reproductores en desoves inducidos, resultando en un tamaño efectivo de 3.6 organismos de los 6 utilizados y evidenciando la necesidad de monitorear la progenie que será introducida a cultivo en aguas abiertas, ya que se podría impactar negativamente las poblaciones naturales.

Petersen et. al (2009) describieron 37 microsatelites adicionales para almeja mano de león, a partir de 24 organismos provenientes de la Laguna Ojo de Liebre, encontrando una riqueza de 5 a 27 alelos por locus, con una heterocigosidad esperada de 0.76, 10 de estos loci mostraron una desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg por la presencia de alelos nulos. Una selección de 10 de estos microsatelites fue utilizada por Petersen y colaboradores (2010), para evaluar la diversidad genética de nueve bancos naturales de AML en la Laguna Ojo de Liebre, y cuatro en el Golfo de California (Bahía de Los Ángeles, Isla Tiburón, Loreto y La Paz), incluyendo también cinco poblaciones en cultivo (Lagunas Ojo de Liebre, Guerrero Negro y Bahía Tortugas). Este estudio encontró que existen dos poblaciones genéticamente distintas, una en Laguna Ojo de Liebre y otra en el Golfo de California, pero con una cierta introgresión entre las dos en ambos sitios y que los stocks en cultivo presentan una diversidad genética menor con relación a la encontrada en las poblaciones naturales analizadas. Estos datos sugieren que tanto las poblaciones silvestres como los stocks de cultivo pueden verse afectados por la pérdida de diversidad genética.

En 2012 se crearon mapas de ligamiento genético, utilizando 73 microsatelites y polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP's, por sus siglas en inglés), encontrando marcadores putativos para el color naranja de la concha, y sentando las bases para estudios cuantitativos que pudieran terminar desarrollo de programas de cruzamiento asistido por marcadores moleculares para desarrollar líneas genéticas para acuicultura (Petersen et al. 2012).

En 2017 se realizaron prospecciones en 60 sitios de la parte central del Golfo de California y un stock de organismos en cultivo, encontrando una reducida cantidad de organismos únicamente en 4 de estas localidades y reportando ausencia de bancos de almejas previamente ubicados, aun así, se pudo evaluar las poblaciones del golfo de california a través de 10 microsatelites (los mismos utilizados por Petersen et al., 2009), amplificados en un total de 76 AML de las 156 obtenidas (entre ellas organismos reproductores y juveniles en cultivo), debido a la baja amplificación de los microsatelites. Se menciona una pérdida de heterocigosidad, riqueza alélica y un ligero aumento en el índice de endogamia en las 4 localidades evaluadas respecto al trabajo previo, los sitios muestreados resultaron ser una única unidad poblacional y en este estudio recalcaron el efecto de la pérdida de diversidad genética durante la reproducción en laboratorio (Oviedo-Velázquez 2017).

Un análisis transcriptómico fue realizado para observar los genes de diferenciación sexual en *N. subnodosus*, encontrando más de 11 transcritos relacionados con este proceso biológico dentro de

diferentes tejidos y estadios de desarrollo, de un total de 5,439 transcritos trabajados (Galindo Torres et al. 2018).

1.1.6 Secuenciación masiva de alto rendimiento

La secuenciación genética masiva de alto rendimiento es actualmente una de las herramientas con mayor rapidez de desarrollo y demanda, puesto que los costos de secuenciación están siendo reducidos, la calidad de las secuencias mejorada y la tecnología utilizada para el análisis secuencial cada vez está más disponible (Goodwin et al., 2016). Aunado a esto, la cantidad de información que se puede obtener es mayor en comparación con otras técnicas genéticas, lo que reduce considerablemente el costo por marcador (Andrews et al., 2016).

Dentro de las técnicas utilizadas para la secuenciación masiva se encuentra la secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción (por sus siglas en inglés RAD-seq). Esta técnica se basa en la representación reducida de un genoma completo en sitios restringidos por digestión enzimática, permitiendo así muestrear poblaciones enteras para obtener información de gran resolución a nivel genómico (Andrews et al., 2016). De este modo es posible encontrar marcadores asociados a parentesco, flujo genético y características fenotípicas. Los polimorfismos de un solo nucleótido (por sus siglas en inglés SNP's) son uno de los marcadores moleculares más utilizados, ya que son fácilmente obtenibles a través de la técnica de RAD-seq y, debido a su abundancia en el genoma y su hereditabilidad, pueden servir para analizar poblaciones naturales en las que existe limitada o nula cantidad de secuencias genómicas reportadas (Robledo et al., 2017). Por ejemplo bivalvos como el mejillón azul chileno *Mytilus chilensis* (Araneda et al., 2016) o la almeja del Atlántico profundo *Placopecten magallanicus* (Van Wyngaarden et al., 2017). Un ejemplo de estas últimas son las poblaciones de AML que se encuentra a ambos lados de la península de Baja California.

1.2 Justificación

A pesar del declive de las poblaciones de AML, los esfuerzos realizados en el estudio de esta especie se han centrado principalmente en la caracterización de su biología y reproducción para cultivos, con muy

escasos trabajos enfocados en conocer y caracterizar las poblaciones naturales a nivel genético. Los estudios existentes han utilizado siempre un número limitado de marcadores que no permiten ver estructuras poblacionales más finas. Sin embargo, la información disponible hasta la fecha parece aportar cierta evidencia de la existencia de adaptaciones geográficas (Koch et al., 2015).

La existencia de adaptaciones geográficas podría ser reflejo de adaptaciones locales determinadas por selección natural, lo cual se esperaría ver reflejado a nivel genético, presentando poblaciones con algún grado de distanciamiento genético. Es por tanto de suma importancia monitorear la diversidad genética, tanto de las poblaciones naturales como de los cultivos, para evitar poner en peligro a las poblaciones existentes actualmente.

Por otro lado, se desconoce el efecto de los trasplantes de organismos entre las costas de la península de Baja California y los cultivos experimentales producidos por desoves masivos que se han ido realizando desde hace por lo menos 20 años.

El presente estudio propone el análisis de poblaciones naturales y de cultivo de AML mediante la técnica de RAD-seq, para obtener información acerca de la composición genética y la estructura poblacional a una escala genética de mayor resolución. Esto permitirá el futuro desarrollo de programas de obtención de semilla en laboratorio, tanto para cultivo, repoblamiento y manejo de la especie en sus poblaciones naturales, para que pueda así perdurar como recurso ecológico y económico para la región y el país.

1.3 Hipótesis

Si se utilizan paneles de marcadores tipo SNPs de carácter neutral y bajo selección, las almejas mano de león de las costas de la península de Baja California (Pacífico y el Golfo de California) serán separadas como diferentes sub-poblaciones.

Las poblaciones de almeja mano de león (*N. subnodosus*) de las costas Este y Oeste de la península de Baja California son muy similares genéticamente, pero presentan adaptaciones locales.

La variabilidad genética en la semilla de cultivo producida con cruces dirigidos será similar a la de las poblaciones naturales de donde provienen los reproductores.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Caracterizar genéticamente las poblaciones silvestres de almeja Mano de León en ambas costas de la Península de Baja California y evaluar el efecto de la reproducción en laboratorio sobre la reducción de la variabilidad genética de cultivos a partir un lote de semillas producidas en el laboratorio.

1.4.2. Objetivos específicos

Los siguientes objetivos particulares serán llevados a cabo en poblaciones de almeja Mano de León de ambos lados de la Península de Baja California.

- Analizar la variabilidad genómica de cinco poblaciones naturales de AML (Bahía de Las Animas= BLA, Punta el Soldado= PSO, Bahía de las Ánimas= ANI, San Francisquito= SFR e Isla Natividad=NAT) en ambas costas de la península de Baja California.
- Analizar la variabilidad genómica de un stock de semillas (SEM) producido en laboratorio.
- Describir la estructura genética de cinco poblaciones naturales de la almeja mano de león (BLA, PSO, ANI, SFR y NAT) en ambas costas de la península de Baja California.
- Describir la estructura genética de semillas producidas en laboratorio y compararla con la de las poblaciones naturales.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Toma de muestras biológicas

Se realizó la colecta de los organismos adultos por medio de buceo, ya sea libre, con compresor o equipo SCUBA, según disposición de equipo y requerimientos. Se colectaron organismos maduros, evidenciado por el tamaño de la concha (≤ 10 cm largo). Los sitios para muestrear fueron elegidos de acuerdo con la presencia previamente reportada de AML, lo cual conllevó un total de 180 prospecciones en 60 localidades del Golfo central. En cada una de las áreas se realizaron 3 inmersiones en diferentes momentos del año. Se obtuvieron también muestras adicionales de Bahía de la Paz e Isla Natividad, ésta última, siendo la única población del Pacífico. Finalmente se obtuvo un total de 149 muestras de AML para su análisis. De los buceos realizados en la región central del Golfo de California sólo se pudieron obtener muestras de cuatro localidades: Bahía de los Ángeles (BLA, n=30), Punta El Soldado (PSO, n=16), Bahía de las Ánimas (ANI, n=37), San Francisquito (SFR, n=6). En el Pacífico se obtuvieron organismos de Isla Natividad (NAT= 43), Laguna Ojo de Liebre (LOL= 28) y se recibieron muestras de bahía de la Paz (LAP=30) que fueron donadas por el Dr. César Ruíz del CICIMAR (IPN) la PAZ. En total se obtuvieron 190 muestras colectadas pertenecientes a 8 localidades. Sin embargo, no fue posible para éste trabajo analizar el total de las muestras, debido a logística con el proveedor de la secuenciación, por lo que únicamente se incluyeron las muestras enlistadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Relación de muestras de Almeja Mano de León, colectadas para este estudio, el lugar de donde fueron obtenidas, el número de muestras obtenidas y las enviadas a secuenciación por RAD-seq a la empresa FLORAGENEX (FGX).

| Lugar | Población | Fecha | Muestras Totales | Muestras FGX |
|----------------------------|-----------|--------|------------------|--------------|
| Bahía de los Ángeles, B.C. | BLA | oct-15 | 30 | 30 |
| Bahía de las Ánimas, B.C. | ANI | jun-16 | 18 | 18 |
| Reproductores IIO. | ANI | may-16 | 19 | 19 |
| Punta el Soldado, B.C. | PSO | jul-16 | 16 | 16 |
| San Francisquito, B.C. | SFR | feb-16 | 6 | 6 |
| Bahía de la Paz, B.C.S: | BLP | ago-16 | 30 | 30 |
| Isla Natividad, B.C.S. | NAT | mar-17 | 5 | 5 |
| F1 de Bahía de las Ánimas | SEM | dic-16 | 32 | 24 |
| El Suspiro, B.C. | SFR | abr-17 | 1 | 1 |
| TOTAL | | | 157 | 149 |

El muestreo de los organismos se realizó con tijeras y pinzas esterilizadas previamente y entre organismos muestreado. Se cortó un trozo delgado de manto y/o músculo por organismo, tejido que fue colocado dentro de un tubo de microcentrifuga de 1.5ml con etanol 96%, y posteriormente preservado en frío (congelador -20°C y/o nitrógeno líquido). Los organismos para cultivo se colocaron en hieleras a temperatura de alrededor de 7°C, utilizando camas de gel-ice y esponjas húmedas con agua de mar. Esto permitió el transporte con una baja cantidad de agua desde el punto de captura hasta el Laboratorio de Biotecnología de Moluscos del Instituto de Investigaciones Oceanográficas (IIO) en el campus Punta Morro de la UABC. Una vez en el laboratorio las muestras fueron aclimatadas a las condiciones de cultivo. En estos reproductores la muestra fue tomada del manto de la almeja, con la finalidad de causar un bajo impacto en su salud, pero sin comprometer la calidad del ADN.

2.2 Análisis de laboratorio

El ADN de las muestras fue extraído mediante el kit *DNeasy Blood and tissue* de Quiagen®, obteniendo una buena cantidad/calidad de ADN por muestra, evaluada mediante lectura con espectrometría de Luz UV en un NanoDrop 2000 Thermo Scientific® y de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se prepararon diluciones estandarizadas a una concentración de 50 ng/μl utilizando el programa ImageLab de BioRad para cuantificar nuevamente las muestras con ayuda de una escalera QuickLoad de 1kb.

Un nanogramo de cada muestra de ADN fue enviado en una placa P96 al laboratorio FLORAGENEX, donde fueron secuenciadas, utilizando enzimas de restricción (RAD-seq). De manera resumida los fragmentos de ADN obtenidos previamente por la digestión mediante las enzimas *ApeKI*, se amplifican por PCR para aumentar la señal, posteriormente se realiza un ligamiento con adaptadores de illumina y los “barcodes” (combinaciones de 8 bases únicas para cada individuo), un lavado posterior elimina el exceso de reactivos de PCR y se evalúa el tamaño de los fragmentos amplificados. Estos fragmentos fueron leídos por la técnica de secuenciación por síntesis, en un secuenciador de última generación HiSeq2000 de Illumina®.

2.3 Análisis bioinformático

Los datos de la secuenciación se analizaron en el programa STACKS (Catchen *et al.*, 2011, Catchen *et al.*, 2013), el cual limpia y demultiplexa los archivos *fastq* provenientes de secuenciación utilizando los *barcodes* de cada organismo (*process_radtags*) para obtener las secuencias pertenecientes a cada individuo. Estos archivos individuales fueron estandarizados a un millón de lecturas. Las secuencias fueron posteriormente recortadas en su extremo 3' a una longitud de 75pb y apiladas en “Stacks” de acuerdo a una serie de parámetros de similitud especificados (m), estos stacks representan loci y se identificaron los alelos putativos, que posteriormente son contrastados con los stacks de otros individuos para formar stacks con todos los alelos putativos, utilizando otro parámetro de similitud (M) para esto (*sstacks*), a continuación se creó un catálogo (*cstacks*) agrupando los loci de los organismos, para esto se utilizó una porción de muestras representativa de cada población. Por último, se comparó cada uno de los individuos

con el catálogo generado (populations), obteniendo el genotipado de los organismos en diferentes formatos requeridos.

Se implementaron varios filtros para minimizar falsos positivos, se utilizaron SNP's con éxito de genotipado mayor a 70%, y la frecuencia mínima de alelos para procesar un SNP en cada locus (0.5). Se utilizaron solo los marcadores que fueron genotipados en 6 de las 8 poblaciones de muestras y se limitó a un solo SNP por RAD-tag. Los datos de genotipado de los datos filtrados se procesaron utilizando la paquetería adegenet en R (Jombart et al., 2008) para obtener el equilibrio de Hardy-Weinberg (*HWE*) de los SNP's. Se realizó un filtro (blacklist) para remover los alelos que se encontraban en desequilibrio de HW, utilizando para ello el valor corregido de tasa de falso descubrimiento (en inglés False Discovery Rate FDR) de Benjamini y Yekutieli (2001), reportados en las tablas de Narum (2006). Con el set de datos resultantes se realizó un segundo genotipado en Stacks (populations), obteniendo los archivos en formato para los programas genepop y STRUCTURE, así como la tabla de resumen estadístico por población, que contiene el número de individuos, el número de sitios variantes y polimórficos, el porcentaje de polimorfismo, la heterocigosidad observada y esperada, con sus respectivos varianza y desviación estándar. Aquellos individuos que tuvieron un genotipado menor al 50% fueron eliminados para los subsecuentes análisis.

Con los loci filtrados se procedió a utilizar el programa LOSITAN para realizar una búsqueda de marcadores bajo selección en dos escenarios: el escenario 1 conteniendo todas las muestras y el escenario 2 donde se excluye la población de Isla Natividad por ser la más distante geográficamente y el grupo de semilla proveniente de los reproductores de bahía de las ánimas quedando con 6 poblaciones. En ambos escenarios se corrió el modelo Fdist2 (Beaumont and Nichols 1996) utilizando un Fst inicial neutral, se corrieron 1,000,000 de iteraciones, un intervalo de confianza de 0.995, falsa tasa de descubrimiento del 0.1, y 50 submuestras, el modelo utilizado fue el "paso a paso" que utiliza una fase de inicio en la cual elimina algunos loci atípicos, para posteriormente volver a analizar el resto de los loci sin la influencia de esos datos más extremos. Para asegurar un mejor descubrimiento de los loci bajo posible selección, se utilizaron únicamente aquellos que tuvieron una P (Fst simulado < Fst muestra) mayor a 0.995, mientras que un intervalo del 0.1 al 0.9 fue utilizado para seleccionar a los loci Neutrales. Con esto se crearon 3 paneles para los dos escenarios denominados "Total" (todos los loci que pasaron los filtros de falsos positivos), "Neutral" (todos los loci con $0.1 < p < 0.9$) y "Selección" (loci con $p > 0.995$).

El paquete genepop (Jombart et al., 2008) fue implementado en R para obtener las estimaciones de equilibrio de HW realizando la prueba exacta de Fisher, utilizando 50,000 iteraciones de Markov-

Montecarlo (IMM) y de-memorización de 10,000 IMM. La paquetería *diveRsity* en R (Keenan et al 2013) fue utilizado para obtener los coeficientes de endogamia (F_{IS}), los índices de fijación alélica (F_{ST}) y los análisis de fijación alélica pareados, utilizando 1000 iteraciones de autodecimantes (bootstrap) y 1000 IMM.

El programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2007) fue utilizado para detectar el número de grupos genéticos (componentes), que ajustan mejor a un determinado conjunto de datos, este fue corrido en todos los casos utilizando el modelo ADMIXTURE, con 10,000 IMM y 1,000 IMM de periodo de calentamiento, inferencia del parámetro Alpha y un Alpha por población, la información a priori fue un Alpha no informativo, el valor máximo de 10 y una SD propuesta para actualizar Alpha de 0.025. En todas las comparaciones se corrieron por triplicado desde $K=1$ hasta $K=(N_{pob}*2)$. Se utilizó la plataforma online de STRUCTURE HARVESTER para la fácil visualización de estos resultados (Earl, 2012) obteniendo la tabla de Evanno que resume las diferentes pruebas realizadas para determinar el número de componentes géticas (K).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Secuenciación de muestras

La secuenciación arrojó un total de 331,506,483 lecturas, siendo en promedio 2,210,043.2 lecturas por muestra (Rango: 11,435,597 -23,580; Desv. Est. 2,446,058.5; Mediana 1,400,794). El 54.8% de las muestras (n=87) cumplieron con este filtro (Figura 4), lo que indica una buena representación por muestra. Sin embargo, un 40% de las muestras caen fuera de este filtro, teniendo una profundidad menor al millón de lecturas.

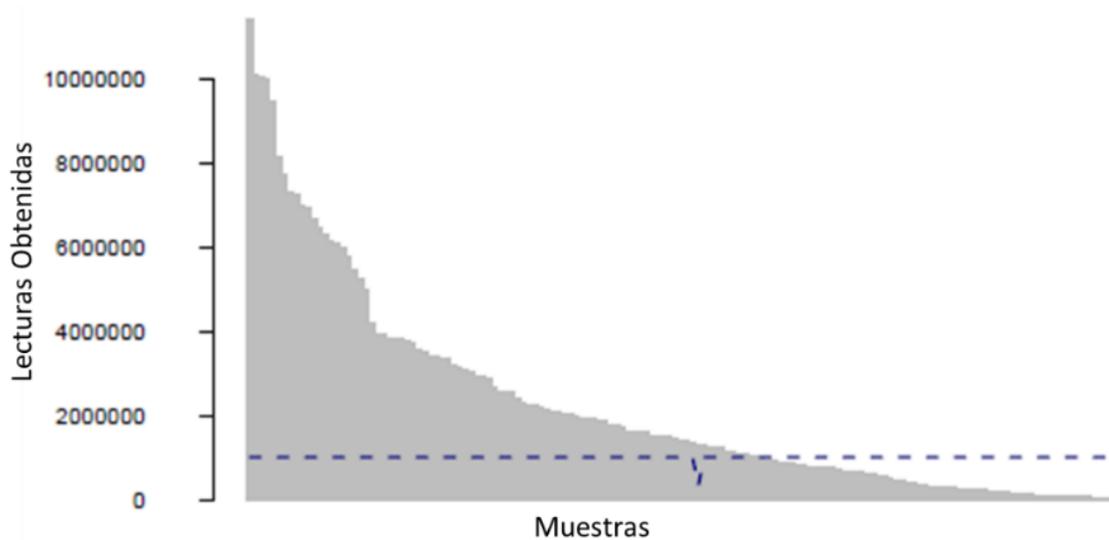


Figura 4. Rango de lecturas obtenidas por muestra. La línea punteada representa el valor consenso de 1 millón de lecturas por muestra y la discontinuidad indica el punto de corte.

Todas las muestras de Bahía de la Paz (n=30) fueron eliminadas por tener una tasa de genotipado que no superó el 4%. Otras 7 muestras correspondientes a los Reproductores obtenidos de ANI fueron eliminadas también, por presentar bajo éxito de genotipado, el cual varió entre 11 y 46 %. En total se eliminó un 24.8% de las muestras secuenciadas.

3.2 Genotipado de poblaciones silvestres

En el genotipado excluyendo la semilla de cultivo, se encontraron 16,479 loci con SNP's putativos. Todos los SNP's con una frecuencia alélica menor al 5% y éxito de genotipado de por lo menos 80% fueron eliminados en el primer filtrado ($n=8,758$). De los 7,722 SNP's restantes se eliminaron 4,590 para dejar solamente un SNP bi-alélico por RADtag. Otros 645 SNP's fueron eliminados de los 3,132 restantes, debido a que estaban fuera de del equilibrio de HW en más de la mitad de las poblaciones utilizando el nivel crítico de FDR-BY de 0.004885, quedando un set final de 2,487 SNP's, el cual será llamado panel *Total*, pues contiene el total de los SNP's descubiertos. De este panel *Total* se filtraron 1,276 (51%) loci Neutrales y 144 (6%) loci bajo Posible Selección utilizando el programa LOSITAN con los parámetros especificados en la metodología.

3.2.1 Descripción genética de las poblaciones naturales

El número efectivo de individuos fue muy similar al número de muestras por localidad, en los tres paneles (*Total*, *Neutral* y *Selección*). La heterocigosidad observada estuvo alrededor del 0.2 para todas las poblaciones en los tres paneles, con excepción de Isla Natividad, que fue la población con la H_o más baja (*Total* $H_o=0.1237$, *Neutral* $H_o=0.1169$, *Selección* $H_o=0.1267$). En todos los paneles la población de San Francisquito presentó la mayor H_o (*Total* $H_o=0.2648$, *Neutral* $H_o=0.2645$, *Selección* $H_o=0.2761$). La heterocigosidad esperada (H_e) fue mayor que la observada en todos los casos, siendo Isla Natividad en la que muestra las mayores diferencias (Tabla 2).

El coeficiente de endogamia (F_{is}), fue significativamente distinto a cero en todos los paneles (*Total* $F_{is}= 0.3015$, 95% CI= 0.2685, 0.3354; *Neutral* $F_{is}= 0.3013$, 95% CI=0.2707, 0.3353; *Selección* $F_{is}= 0.2903$, 95% CI=0.2544, 0.3259) y dentro de cada panel, en todas las poblaciones, menos en San Francisquito, que no presentó ningún valor diferente de cero (Tabla 2). Del resto de poblaciones, la que presenta un mayor índice de endogamia con los tres paneles fue Isla Natividad (*Total* $F_{is}=0.4891$, *Neutral* $F_{is}=0.4636$, *Selección* $F_{is}=0.5182$), mientras que Punta el Soldado presentó los menores F_{is} (*Total* $F_{is}=0.2189$, *Neutral* $F_{is}=0.1952$, *Selección* $F_{is}=0.2152$). Fue notable también, que la población de NAT presenta los menores porcentajes de loci polimórficos (%LP), que en ninguno de los paneles superó la unidad (*Total* %LP=0.8819, *Neutral* %LP=0.8663, *Selección* %LP=0.8519) (Tabla 2).

Tabla 2. Descripción genética de las poblaciones naturales de almeja mano de león (*N. subnodosus*) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel *Total* 2,487 SNP's, Panel *Neutral* 1,276 SNP's y Selección 144 SNP's. Se muestra el Número efectivo de individuos (No. Ind.), Heterocigosidad observada y esperada (Ho, He respectivamente), el coeficiente de endogamia Fis (los valores en **negritas** no son diferentes a cero, según el intervalo de confianza de la función autodecimante), así como el número de sitios variantes, loci polimórfico y el % de loci polimórficos.

| Total | No. Ind. | Ho | He | Fis | Sitios variantes | Sitios polimórficos | % Loci Polimórficos |
|--------------|----------|-------|-------|---------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| BLA | 27.2 | 0.204 | 0.286 | 0.2869 | 2487 | 2473 | 1.328 |
| PSO | 14. | 0.227 | 0.290 | 0.2189 | 2487 | 2409 | 1.291 |
| ANI | 25.7 | 0.210 | 0.287 | 0.2680 | 2487 | 2458 | 1.317 |
| SFR | 6.6 | 0.264 | 0.284 | 0.0695 | 2487 | 2160 | 1.158 |
| NAT | 4.5 | 0.123 | 0.242 | 0.4891 | 2487 | 1645 | 0.881 |

| Neutral | No. Ind. | Ho | He | Fis | Sitios variantes | Sitios polimórficos | % Loci Polimórficos |
|----------------|----------|-------|-------|---------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| BLA | 27.2 | 0.203 | 0.284 | 0.3004 | 1276 | 1271 | 1.32 |
| PSO | 14. | 0.229 | 0.291 | 0.1952 | 1275 | 1241 | 1.29 |
| ANI | 25.7 | 0.208 | 0.286 | 0.2648 | 1271 | 1252 | 1.30 |
| SFR | 6.6 | 0.264 | 0.287 | 0.0905 | 1272 | 1117 | 1.16 |
| NAT | 4.5 | 0.116 | 0.237 | 0.4636 | 1270 | 829 | 0.8663 |

| Selección | No. Ind. | Ho | He | Fis | Sitios variantes | Sitios polimórficos | % Loci Polimórficos |
|------------------|----------|--------|--------|---------------|---------------------|------------------------|------------------------|
| BLA | 27.28 | 0.2061 | 0.2946 | 0.2839 | 144 | 143 | 1.32 |
| PSO | 13.99 | 0.2366 | 0.2940 | 0.2152 | 144 | 140 | 1.29 |
| ANI | 25.99 | 0.2198 | 0.2990 | 0.2825 | 144 | 144 | 1.33 |
| SFR | 6.75 | 0.2761 | 0.2895 | 0.0888 | 142 | 126 | 1.16 |
| NAT | 4.57 | 0.1267 | 0.2363 | 0.5182 | 144 | 92 | 0.85 |

Las poblaciones presentan una significativa desviación del equilibrio de HW según el método de Fisher con los tres sets de marcadores utilizados (Tabla 3) (Todos loci/poblaciones: Totales $\chi^2 > 20947.0059$, $df=20258$, $p < 0.0004$; Neutrales $\chi^2 > 10879.5742$, $df= 10378$, $p < 0.0003$; Selección $\chi^2 = 1868.6536$ $df= 1174$ $p < 0.0001$). Individualmente, todas las poblaciones se encontraron con probabilidad significativa de estar fuera de equilibrio de HW, con excepción de la población de San Francisquito, con los

tres sets de marcadores (Totales $\chi^2 = 2288.9502$, $df=3478$, $p = 1$, Neutrales $\chi^2 = 1235.1707$, $df= 1796$, $p=1$; Selección $\chi^2=130.7298$, $df=218$, $p=1$).

Tabla 3. Prueba exacta de Hardy-Weinberg de las poblaciones naturales de almeja mano de león (N. subnodosus) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel Total 2,487 SNP's, Panel Neutral 1,276 SNP's y Selección 144 SNP's. Se muestran los valores de la prueba de Chi2, los grados de libertad (Df) y el valor de probabilidad asociado a la prueba (valores menores a 0.00001 son mostrados como High. sign).

| Totales | Chi2 | Df | Prob |
|------------------------|--------------|-----------|-------------|
| BLA | > 10411.9727 | 4884 | High. sign. |
| PSO | 5536.4336 | 4520 | High. sign. |
| ANI | 9604.0537 | 4816 | High. sign. |
| SFR | 2288.9502 | 3478 | 1 |
| NAT | 3517.5681 | 2562 | High. sign. |
| Todos Loci/Poblaciones | > 20947.0059 | 20258 | < 0.0004 |

| Neutrales | Chi2 | Df | Prob |
|------------------------|--------------|-----------|-------------|
| BLA | > 5271.1011 | 2506 | High. sign. |
| PSO | 2862.7529 | 2324 | High. sign. |
| ANI | 4957.7646 | 2460 | High. sign. |
| SFR | 1235.1707 | 1796 | 1 |
| NAT | 1823.8857 | 1294 | High. sign. |
| Todos Loci/Poblaciones | > 10879.5742 | 10378 | < 0.0003 |

| Selección | Chi2 | Df | Prob |
|------------------------|-------------|-----------|-------------|
| PSO | 297.7548 | 266 | 0.0878 |
| BLA | 632.4951 | 280 | High. sign. |
| ANI | 623.6102 | 272 | High. sign. |
| SFR | 130.7298 | 218 | 1 |
| NAT | 184.0637 | 138 | 0.0054 |
| Todos Loci/Poblaciones | 1868.6536 | 1174 | High. sign. |

3.2.2 Índices de fijación alélica entre poblaciones silvestres

En la comparación de poblaciones naturales el F_{st} global (tomando en cuenta todos los loci en todas las poblaciones) fue de $F_{st} = 0.0546$ y diferente de cero (95% CI= 0.0392, 0.0763) en el set Total, y casi idéntico en los sets Neutral y Selección $F_{st} = 0.0554$ (95% CI=0.0398, 0.0768) y $F_{st} = 0.0506$ (95% CI=0.0338, 0.0718).

Al indagar en las comparaciones pareadas (Tabla 4), se observó que la población de la Isla Natividad presentó diferencias significativas en el índice de fijación alélica con el resto de las poblaciones en los tres paneles de marcadores, siendo la diferencia más alta con la población de San Francisquito (Totales $F_{st} = 0.0879$, Neutrales $F_{st} = 0.0778$, Selección= 0.0702) y las menores con Bahía de los Ángeles (Total $F_{st} = 0.0353$, Selección= 0.0305) y Bahía de las Ánimas (Neutrales $F_{st} = 0.0235$). En los paneles Total y Neutral, se encontraron F_{st} diferentes de cero para las poblaciones de Bahía de las Ánimas con Bahía de los Ángeles (Totales $F_{st} = 0.0148$, Neutrales $F_{st} = 0.0097$) y Punta el Soldado (Totales $F_{st} = 0.0183$, Neutrales $F_{st} = 0.0110$). Adicionalmente se encontró un F_{st} diferente de cero para la comparación de Bahía de las Ánimas y San Francisquito con el panel de SNP's Totales (Tabla 4).

Tabla 4. Pruebas de F_{st} pareadas (debajo de la diagonal) y sus respectivos intervalos de confianza (sobre la diagonal) de cinco poblaciones naturales de almeja mano de león (*N. subnodosus*) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel Total 2,487 SNP's, Panel Neutral 1,276 SNP's y Selección 144 SNP's. En **negritas** se muestran los valores que son distintos a cero.

| Totales | BLA | PSO | ANI | SFR | NAT |
|----------------|---------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| BLA | | (-0.0026 ,0.0017) | (0.0039 ,0.0077) | (-0.005 ,0.0026) | (0.0441 ,0.0611) |
| PSO | 0.0154 | | (0.0018 ,0.0067) | (-0.0041 ,0.0044) | (0.0376 ,0.0547) |
| ANI | 0.0148 | 0.0183 | | (0.0003 ,0.0083) | (0.0448 ,0.0617) |
| SFR | 0.0186 | 0.0298 | 0.0207 | | (0.0377 ,0.0588) |
| NAT | 0.0353 | 0.0543 | 0.0357 | 0.0879 | |

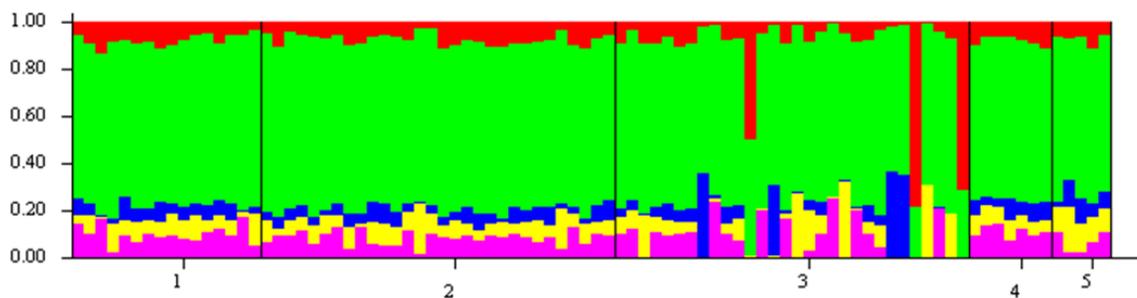
| Neutrales | BLA | PSO | ANI | SFR | NAT |
|------------------|---------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|
| BLA | | (-0.0041 ,0.0016) | (0.0038 ,0.0085) | (-0.0072 ,0.0034) | (0.0452 ,0.0589) |
| PSO | 0.0142 | | (0.0012 ,0.0092) | (-0.0087 ,0.0038) | (0.0342 ,0.0698) |
| ANI | 0.0097 | 0.0110 | | (-0.0017 ,0.0098) | (0.0418 ,0.0662) |
| SFR | 0.0167 | 0.0252 | 0.0103 | | (0.032 ,0.062) |
| NAT | 0.0345 | 0.0489 | 0.0235 | 0.0778 | |

| Selección | BLA | PSO | ANI | SFR | NAT |
|------------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| BLA | | (-0.0106 ,0.0078) | (-0.0068 ,0.0127) | (-0.0158 ,0.0149) | (0.0153 ,0.078) |
| PSO | 0.0151 | | (-0.0011 ,0.0176) | (-0.0129 ,0.012) | (0.0053 ,0.0609) |
| ANI | 0.0156 | 0.0162 | | (-0.0154 ,0.0097) | (0.0275 ,0.1079) |
| SFR | 0.0132 | 0.0187 | 0.0127 | | (0.0176 ,0.0945) |
| NAT | 0.0305 | 0.0547 | 0.0392 | 0.0702 | |

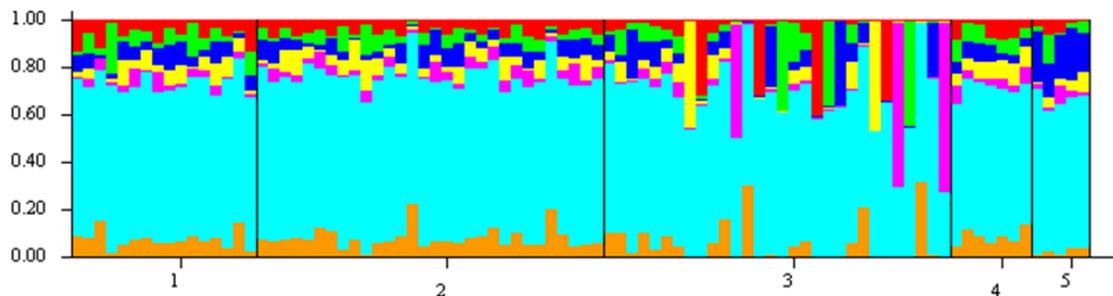
3.2.3 Asignación poblacional de las muestras silvestres

Utilizando el programa STRUCTURE y la plataforma STRUCTURE/HARVESTER, se detectaron $K=5$ componentes genéticas para los paneles Total y Selección, mientras que para el panel Neutral se detectaron $K=7$ (Figura 5). Estas componentes están distribuidas en las poblaciones naturales de manera uniforme, con excepción de algunas muestras provenientes de la población de Bahía de las Ánimas, que presentan proporciones distintas en los tres diferentes paneles de marcadores.

Totales K=5



Neutrales K=7



P. Selección K=5

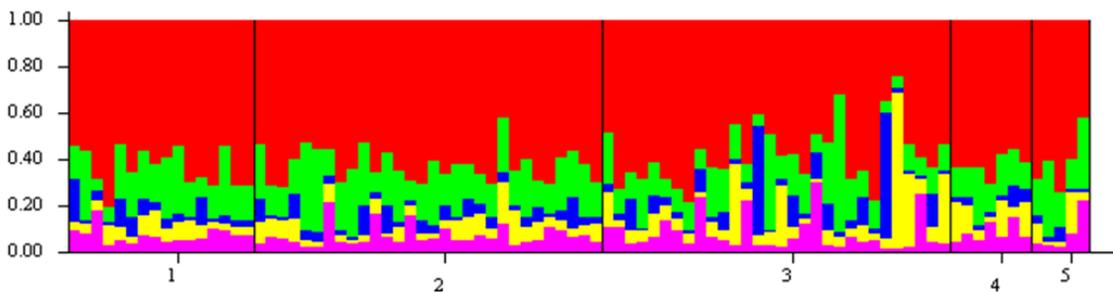


Figura 5. Gráfico de componentes genéticas obtenidas con el programa STRUCTURE y el método de Evanno en 5 poblaciones naturales de almeja mano de león (*N. subnodosus*) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel *Total* 2,487 SNP's, Panel *Neutral* 1,276 SNP's y Selección 144 SNP's. Las poblaciones están numeradas (1=PSO, 2=BLA, 3=ANI, 4=PSO, 5=NAT), y cada barra representa un organismo de la población con las diferentes proporciones genéticas (K) en colores distintos.

Al utilizar $k=2$ como el número de componentes genéticas, se observó que la mayoría de los organismos tienen una proporción similar de cada una de las componentes, con una notable diferencia en las muestras pertenecientes a la población de Bahía de las Ánimas (ANI12, REP15 y REP 19).

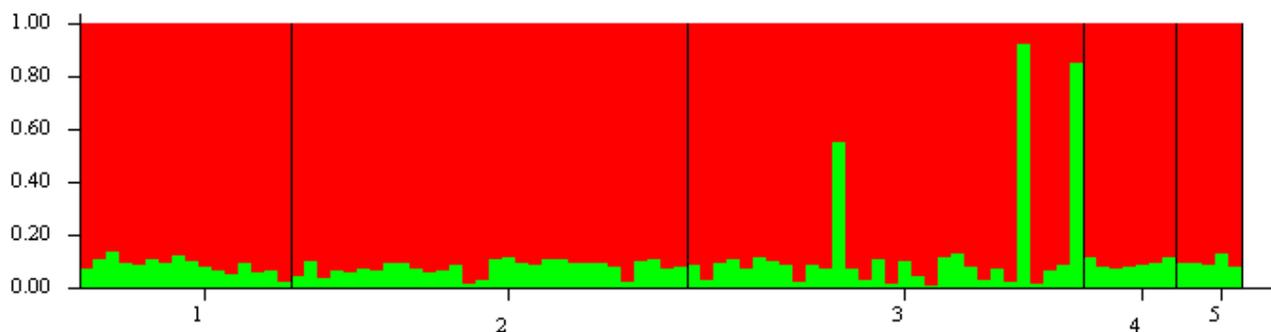


Figura 6. Gráfico de componentes genéticas obtenidas con el programa STRUCTURE utilizando la menor división posible ($k=2$) en 5 poblaciones naturales de almeja mano de león (*N. subnodosus*) con el Panel Total 2,487 SNP's. Las poblaciones están numeradas (1=PSO, 2=BLA, 3=ANI, 4= PSO, 5=NAT), y cada barra representa un organismo de la población con las diferentes proporciones genéticas (K) en colores distintos.

El análisis discriminativo de componentes principales denota $k=1$ grupos, como el número con el criterio de información de bayes (CIB) más bajo para los tres paneles, es decir, todas las muestras se agrupan en un solo clúster, sin diferenciación entre ellas. Sin embargo, haciendo el análisis agrupando por población (sitios de muestreo), se observa un distanciamiento de NAT con el resto de las poblaciones en el panel Total (Figura 7) y los paneles Neutral y Bajo Selección (no mostrados).

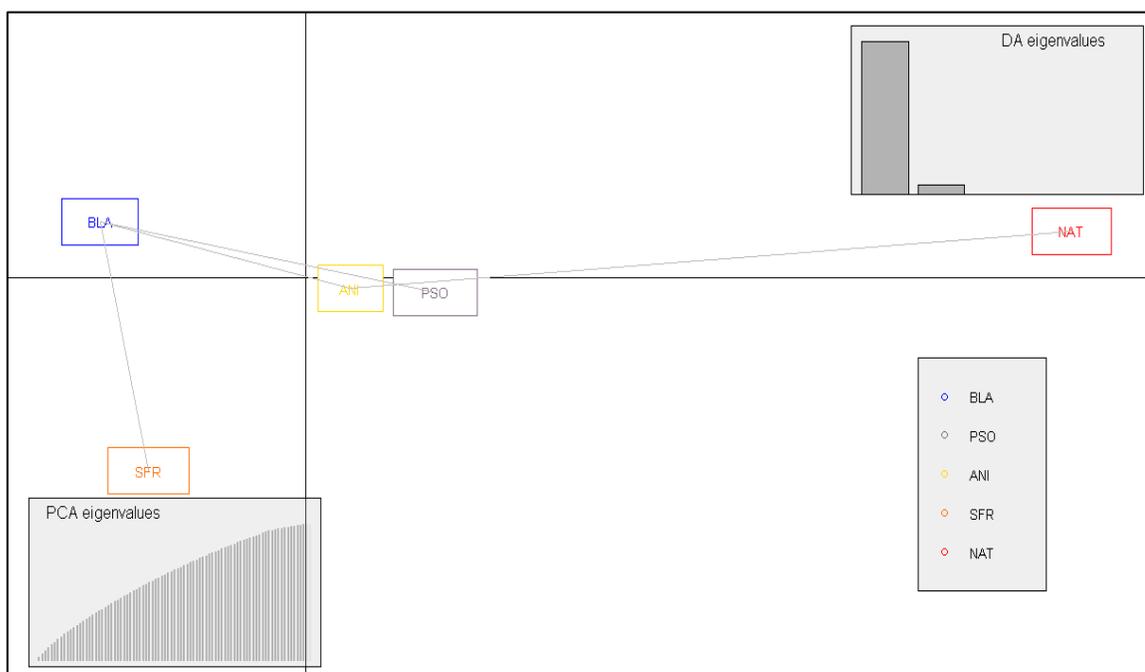


Figura 7. Gráfico del análisis discriminativo de componentes principales (ADCP) en 5 poblaciones naturales de almeja mano de león (*N. subnodosus*) con el Panel Total 2,487 SNP's. Se recobraron 105 eigenvalores (>95% varianza) y dos componentes principales, además se muestra el árbol de máxima expansión uniendo las poblaciones.

El Gráfico de asignación sorteó adecuadamente las muestras cuando se utilizaron los grupos como previos, con el set Total (Figura 8), así como con el set Neutral y Selección (no mostrado).

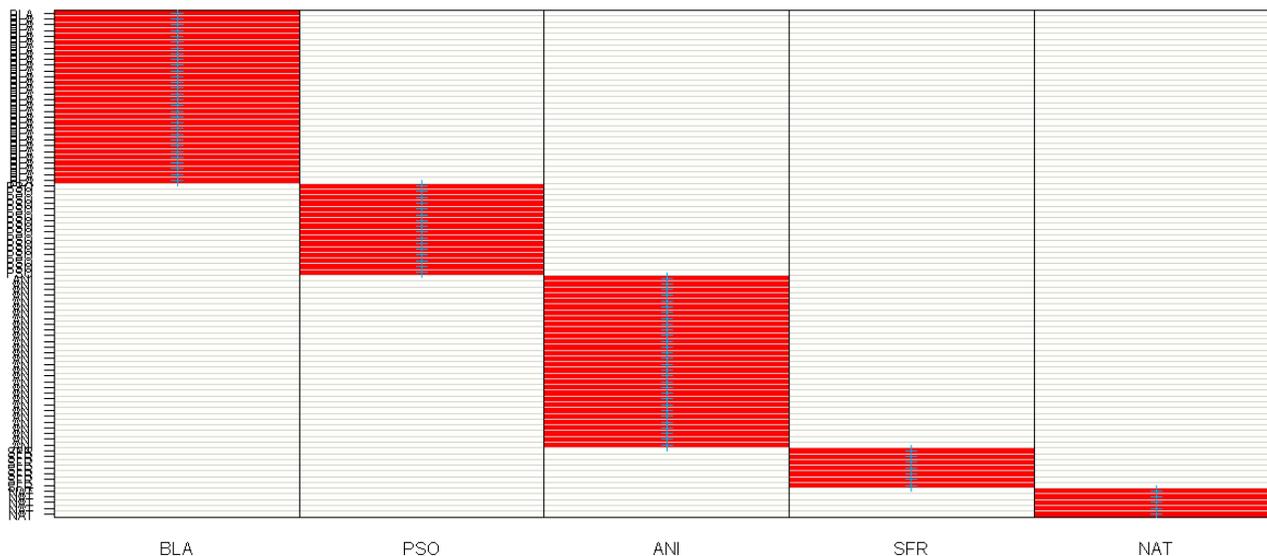


Figura 8. Gráfico de asignación del análisis discriminativo de componentes principales (ADCP) en cinco poblaciones naturales de almeja mano de león (*N. subnodosus*) con el Panel Total 2,487 SNP's y utilizando el sitio de origen como grupo. Se recobraron 105 (>95% varianza) eigenvalores y dos componentes principales.

3.3 Genotipado Incluyendo los organismos de cultivo

Se encontraron 16,772 SNP's putativos en un primer genotipado, sin embargo, se removieron todos aquellos SNP's que presentaron una frecuencia alélica menor al 5% y un éxito de genotipado de por lo menos 80%, lo cual resultó en 12,073 SNP's eliminados, dejando un total de 4,699. De este set se permitió únicamente un SNP bialélico por RadTag excluyendo otros 1,694 SNP's. De los 3,005 SNP's que pasaron los filtros anteriores, se quitaron otros 1,026 más por estar fuera de equilibrio de HW en al menos la mitad de las poblaciones, para lo cual se utilizó el nivel crítico corregido de FDR-BY de 0.004818 (Narum 2006), permaneciendo con 1,979 marcadores finales (panel *Total*). Con el programa LOSITAN se seleccionaron 1062 (53%) loci Neutrales (panel *Neutral*) y 120 (6%) loci bajo posible selección positiva (panel *Selección*).

3.3.1 Descripción genética incluyendo semilla de cultivo

El número efectivo de individuos coincide parcialmente con el número de muestras utilizada por localidad, y son similares en todos los paneles de marcadores (Tabla 5). La heterocigosidad observada (H_o), fue mucho menor para Isla Natividad (Total $H_o=0.1371$, Neutral $H_o=0.1311$, Selección $H_o=0.1357$) que para la Semilla de Cultivo (Total $H_o=0.2091$, Neutral $H_o=0.2070$, Selección $H_o=0.2099$). Aun así, estas fueron las dos poblaciones con la menor H_o en los tres paneles de marcadores. Nuevamente la mayor H_o se observa en la población de San Francisquito (Total $H_o=0.2926$, Neutral $H_o=0.2934$, Selección $H_o=0.2838$) (Tabla 5). En la totalidad de casos se presentó una heterocigosidad esperada mayor que la observada, siendo menor nuevamente para la población de NAT (Total $H_e=0.2634$, Neutral $H_e=0.2597$, Selección $H_e=0.2472$). El Coeficiente de endogamia resultó ser significativamente distinto a cero para los tres paneles al realizar el análisis por loci (Total $F_{is}=0.3075$, 95%CI= 0.2828, 0.3359; Neutral $F_{is}= 0.3093$, 95%CI= 0.2822- 0.3361; Selección $F_{is}=0.2941$, %CI= CI=0.2384-0.3619). Analizando por poblaciones, San Francisquito no resulta significativamente distinto a cero en ninguno de los paneles (Total $F_{is}=0.0570$, Neutral $F_{is}= 0.0584$, Selección $F_{is}=0.1104$). En el resto de las poblaciones se observa un índice de endogamia alrededor del 0.2 con excepción de la población de Natividad, la cual presenta un F_{is} mucho mayor al del resto de poblaciones analizadas (Total $F_{is}=0.4794$, Neutral $F_{is}= 0.5006$, Selección $F_{is}=0.3168$). El porcentaje de loci polimórficos (%LP) fue de alrededor de 1.2 en la mayoría de las poblaciones incluida SEM, con excepción de NAT, que en ningún panel rebasa el 1% de loci polimórficos (Total %LP = 0.9439, Neutral %LP =0.9366, Selección %LP =0.9001) (Tabla 5).

Tabla 5. Descripción genética de cinco poblaciones naturales y una cohorte producida en laboratorio de almeja mano de león (N. subnodosus) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel Total 1,979 SNP's, Panel Neutral 1062 SNP's y Selección 120 SNP's. Se muestra el Número efectivo de individuos (No. Ind.), Heterocigosidad observada y esperada (Ho, He respectivamente), el coeficiente de endogamia Fis (los valores en negritas no son diferentes a cero, según el intervalo de confianza de la función autodecimante), así como el número de sitios variantes, loci polimórfico y el % de loci polimórficos.

| Total | No. Ind. | Ho | He | Fis | Sitios | Sitios | % Loci |
|------------------|----------|--------|--------|---------------|-----------|--------------|--------------|
| | | | | | variantes | polimórficos | Polimórficos |
| BLA | 27.3 | 0.225 | 0.309 | 0.2720 | 1979 | 1976 | 1.33 |
| PSO | 14.1 | 0.247 | 0.312 | 0.2058 | 1979 | 1943 | 1.30 |
| ANI | 25.8 | 0.230 | 0.311 | 0.2592 | 1979 | 1970 | 1.32 |
| SFR | 6.6 | 0.292 | 0.310 | 0.0570 | 1979 | 1800 | 1.21 |
| NAT | 4.5 | 0.137 | 0.263 | 0.4794 | 1979 | 1401 | 0.94 |
| SEM | 21.6 | 0.209 | 0.282 | 0.2606 | 1979 | 1824 | 1.22 |
| Neutral | No. Ind. | Ho | He | Fis | Sitios | Sitios | % Loci |
| | | | | | variantes | polimórficos | Polimórficos |
| BLA | 27.3 | 0.2234 | 0.3096 | 0.2784 | 1062 | 1060 | 1.33 |
| PSO | 14.1 | 0.2510 | 0.3102 | 0.1934 | 1061 | 1046 | 1.31 |
| ANI | 25.8 | 0.2287 | 0.3100 | 0.2668 | 1060 | 1052 | 1.32 |
| SFR | 6.6 | 0.2934 | 0.3116 | 0.0584 | 1062 | 969 | 1.21 |
| NAT | 4.5 | 0.1311 | 0.2597 | 0.5006 | 1059 | 746 | 0.93 |
| SEM | 21.6 | 0.2070 | 0.2815 | 0.2673 | 1061 | 980 | 1.23 |
| Selección | No. Ind. | Ho | He | Fis | Sitios | Sitios | % Loci |
| | | | | | variantes | polimórficos | Polimórficos |
| BLA | 27.6 | 0.223 | 0.303 | 0.2631 | 120 | 120 | 1.33 |
| PSO | 13.9 | 0.247 | 0.313 | 0.2246 | 120 | 116 | 1.28 |
| ANI | 26.1 | 0.231 | 0.301 | 0.2440 | 120 | 120 | 1.33 |
| SFR | 6.8 | 0.283 | 0.299 | 0.1104 | 118 | 105 | 1.16 |
| NAT | 4.5 | 0.135 | 0.247 | 0.3168 | 119 | 81 | 0.90 |
| SEM | 21.8 | 0.209 | 0.271 | 0.2046 | 119 | 109 | 1.21 |

En la comparación de la semilla de cultivo con las poblaciones naturales (Tabla 6), se volvió a encontrar una significativa desviación del equilibrio de HW en todas las poblaciones, con excepción de San Francisquito (Totales $\chi^2=1874.0048$, $df=3044$, $p=1$, Neutrales $\chi^2=1012.2822$, $df=1634$, $p=1$; Selección $\chi^2=121.2605$, $df=180$, $p=0.9997$).

Tabla 6. Prueba exacta de Hardy-Weinberg de cinco poblaciones naturales una cohorte producida en laboratorio de almeja mano de león (N. subnodosus) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel Total 1,979 SNP's, Panel Neutral 1062 SNP's y Selección 120 SNP's. Se muestran los valores de la prueba de Chi2, los grados de libertad (Df) y el valor de probabilidad asociado a la prueba (valores menores a 0.00001 son mostrados como High. sign.

| Totales | Chi2 | Df | Prob |
|------------------------|--------------|-----------|-------------|
| BLA | > 7962.5474 | 3926 | High. sign. |
| PSO | 4349.2207 | 3704 | High. sign. |
| ANI | 7699.125 | 3892 | High. sign. |
| SFR | 1874.0048 | 3044 | 1 |
| NAT | 2958.8694 | 2222 | High. sign. |
| SEM | 6650.6479 | 3508 | High. sign. |
| Todos Loci/Poblaciones | > 23531.8691 | 20294 | High. sign. |
| Neutrales | Chi2 | Df | Prob |
| BLA | > 4331.1069 | 2108 | High. sign. |
| PSO | 2307.8542 | 1986 | 0 |
| ANI | 4102.8428 | 2076 | High. sign. |
| SFR | 1012.2822 | 1634 | 1 |
| NAT | 1600.4064 | 1180 | High. sign. |
| SEM | 3603.4543 | 1874 | High. sign. |
| Todos Loci/Poblaciones | > 12626.8398 | 10856 | High. sign. |
| Selección | Chi2 | Df | Prob |
| BLA | 477.5393 | 240 | High. sign. |
| PSO | 257.5324 | 218 | 0.0343 |
| ANI | 457.2655 | 236 | High. sign. |
| SFR | 121.2605 | 180 | 0.9997 |
| NAT | 160.0434 | 122 | 0.0119 |
| SEM | 336.7397 | 208 | High. sign. |
| Todos Loci/Poblaciones | 1810.3809 | 1204 | High. sign. |

3.3.2 Índices de fijación alélica incluyendo semilla de cultivo

Los índices de fijación alélica F_{st} totales (todos los loci y poblaciones) de los tres paneles de SNP's fueron diferentes de cero (Total F_{st} = 0.077, 95% CI= 0.0639, 0.0938; Neutral F_{st} = 0.0773, 95% CI= 0.0634, 0.0957; Selección F_{st} = 0.0772, 95% CI= 0.0640, 0.0935).

Las comparaciones pareadas del F_{st} , incluyendo la población artificial, sugieren diferencias significativas entre la Semilla de Cultivo y el resto de las poblaciones. Las mayores diferencias se

encontraron con Isla Natividad en los paneles Total y Neutrales ($F_{st}= 0.0655$, $F_{st}= 0.0653$ respectivamente) y con Bahía de las Ánimas en el caso del panel Selección ($F_{st}= 0.0525$) (Tabla 7). Otras diferencias encontradas incluyen la población de Isla Natividad con el resto de las poblaciones en los paneles Total y Neutral. Mientras que, en el panel Selección, sólo se observaron diferencias significativamente mayores de cero en las comparaciones con Bahía de las Ánimas y San Francisquito. En los tres paneles las diferencias fueron mayores para la comparación de Isla Natividad contra San Francisquito y las menores con Bahía de las Ánimas (Tabla 7).

Tabla 7. Pruebas de F_{st} pareadas (debajo de la diagonal) y sus respectivos intervalos de confianza (sobre la diagonal) de cinco poblaciones naturales y una cohorte producida en laboratorio de almeja mano de león (N. subnodosus) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel Total 1,979 SNP's, Panel Neutral 1062 SNP's y Selección 120 SNP's. En negritas se muestran los valores que son distintos a cero.

| Totales | BLA | PSO | ANI | SFR | NAT | SEM |
|----------------|---------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| BLA | - | (-0.0034 ,0.0011) | (0.002 ,0.0075) | (-0.0039 ,0.0058) | (0.0385 ,0.0575) | (0.0632 ,0.0763) |
| PSO | 0.0148 | - | (0.0036 ,0.0075) | (-0.0047 ,0.0038) | (0.0456 ,0.0634) | (0.0625 ,0.0743) |
| ANI | 0.0145 | 0.0183 | - | (0.0012 ,0.0102) | (0.0454 ,0.0639) | (0.0639 ,0.0763) |
| SFR | 0.0186 | 0.0302 | 0.0211 | - | (0.0381 ,0.0611) | (0.0723 ,0.0903) |
| NAT | 0.0354 | 0.0542 | 0.0355 | 0.0880 | - | (0.1141 ,0.1405) |
| SEM | 0.0473 | 0.0517 | 0.0478 | 0.0532 | 0.0655 | - |

| Neutrales | BLA | PSO | ANI | SFR | NAT | SEM |
|------------------|---------------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| BLA | - | (-0.0044 ,0.0017) | (0.0015 ,0.009) | (-0.0039 ,0.0095) | (0.0454 ,0.073) | (0.0588 ,0.0765) |
| PSO | 0.0139 | - | (0.0027 ,0.0077) | (-0.0064 ,0.0056) | (0.049 ,0.0742) | (0.0605 ,0.0764) |
| ANI | 0.0120 | 0.0144 | - | (-0.0013 ,0.0109) | (0.0474 ,0.0735) | (0.0599 ,0.0768) |
| SFR | 0.0185 | 0.0294 | 0.0166 | - | (0.0393 ,0.0728) | (0.0668 ,0.0907) |
| NAT | 0.0367 | 0.0549 | 0.0321 | 0.0893 | - | (0.1171 ,0.1537) |
| SEM | 0.0459 | 0.0481 | 0.0436 | 0.0498 | 0.0653 | - |

| Selección | BLA | PSO | ANI | SFR | NAT | SEM |
|------------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| BLA | - | (-0.0107 ,0.0047) | (-0.0044 ,0.0153) | (-0.0168 ,0.0202) | (-0.0028 ,0.0516) | (0.0548 ,0.1125) |
| PSO | 0.0135 | - | (-0.0044 ,0.0154) | (-0.0133 ,0.0176) | (-0.003 ,0.0586) | (0.0624 ,0.120) |
| ANI | 0.0135 | 0.0180 | - | (-0.0096 ,0.0227) | (0.0124 ,0.0926) | (0.0593 ,0.1185) |
| SFR | 0.0120 | 0.0190 | 0.0123 | - | (0.0068 ,0.0787) | (0.0684 ,0.1408) |
| NAT | 0.0245 | 0.0394 | 0.0301 | 0.0451 | - | (0.0807 ,0.1878) |
| SEM | 0.0525 | 0.0497 | 0.0517 | 0.0380 | 0.0494 | - |

3.3.3 Asignación poblacional incluyendo semilla de cultivo

Utilizando el programa STRUCTURE y la plataforma STRUCTURE/HARVESTER se detectaron K=2 componentes genéticas en los paneles Total y Selección, mientras que con el panel Neutral se detectaron k=7 (Figura 9). Estas componentes están presentes en proporciones similares en las 5 poblaciones naturales (BLA, PSO, ANI, SFR y NAT) y se observa una diferencia notable con la semilla de cultivo.

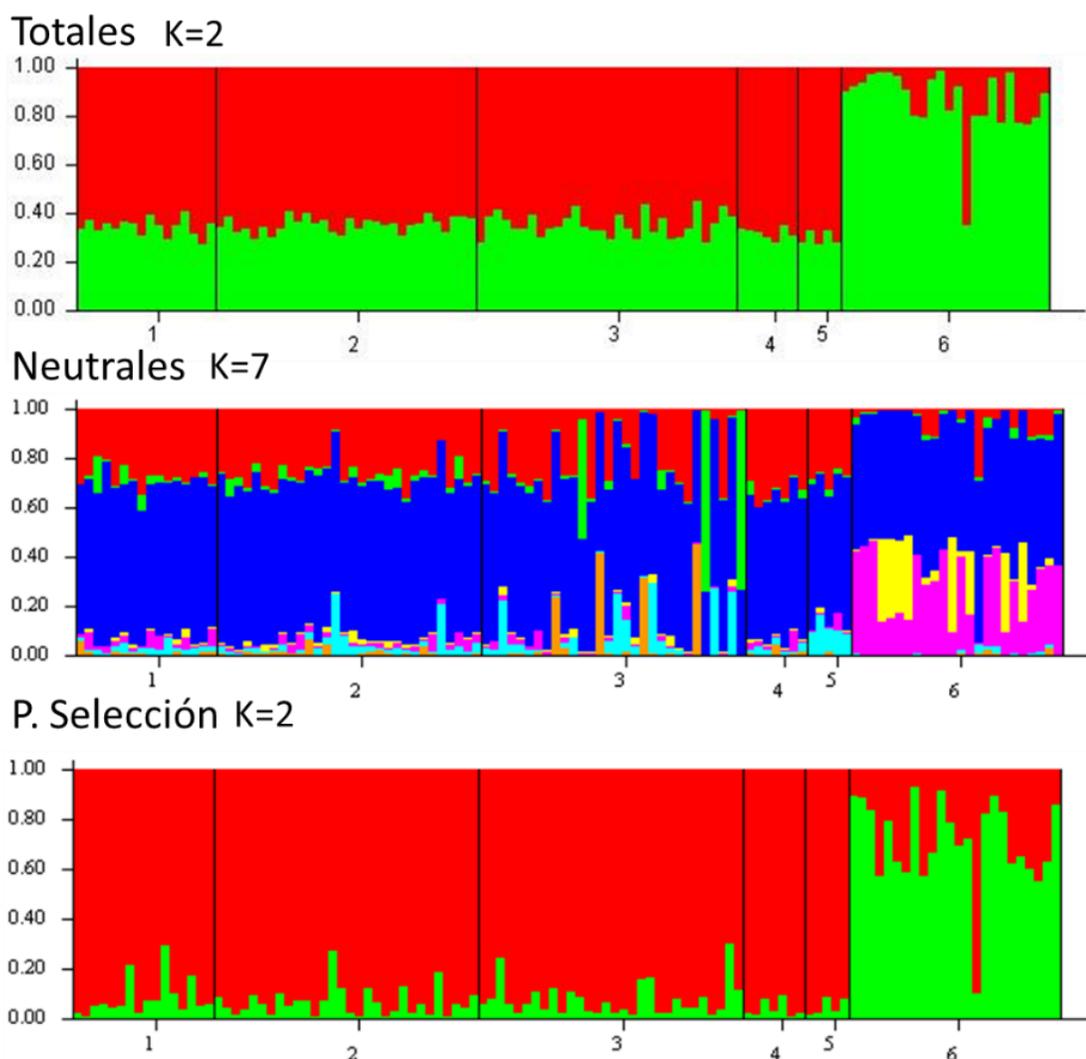


Figura 9. Gráfico de componentes genéticas obtenidas con el programa STRUCTURE y el método de Evanno en 5 poblaciones naturales y un lote de semilla cultivo producido en laboratorio de almeja mano de león (N. subnodosus) utilizando 3 paneles de SNP's. Panel Total 1,979 SNP's, Panel Neutral 1062 SNP's y Selección 120 SNP's. Las poblaciones están numeradas (1=PSO, 2=BLA, 3=ANI, 4= PSO, 5=NAT y 6=SEM), y cada barra representa un organismo de la población con las diferentes proporciones de las componentes genéticas (K) en colores distintos.

Para los tres paneles, el análisis de componentes principales arrojó 2 como el número con el menor CIB, obteniendo un solo componente discriminativo, que describe más del 95% de la varianza. Se observó la separación de las poblaciones naturales de la semilla de cultivo en dos grupos separados y bien diferenciados (Figura 10).

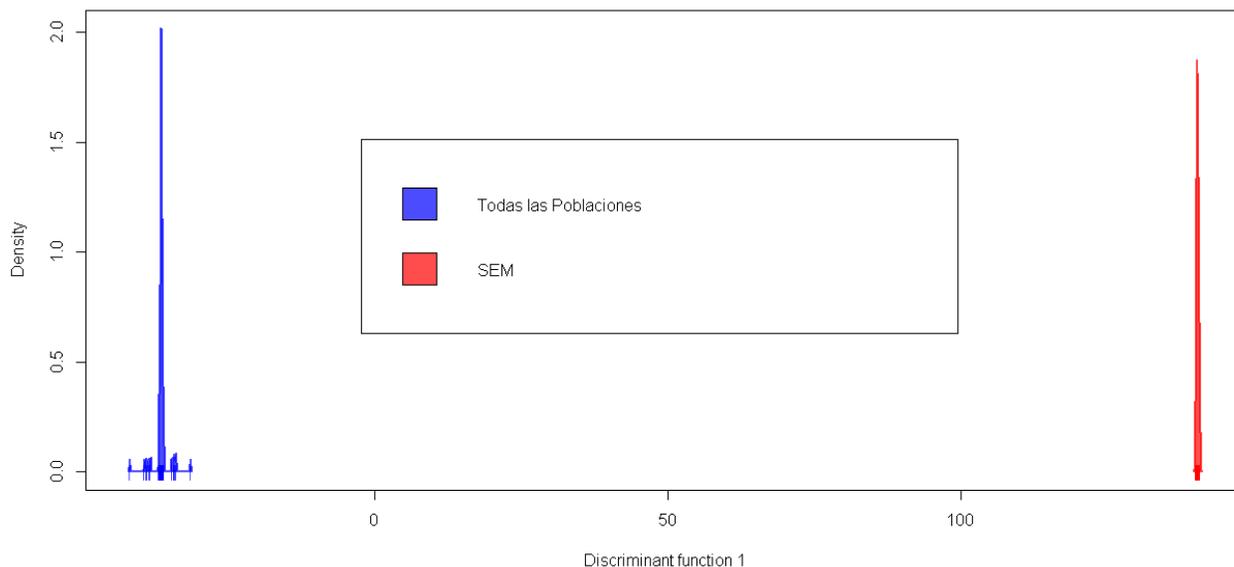


Figura 10. Gráfico del análisis Discriminativo de Componentes Principales en cinco poblaciones naturales y un lote de semilla cultivo producido en laboratorio de almeja mano de león (*N. subnodosus*) con el Panel Total 1,979 SNP's, utilizando $k=2$ grupos según el menor criterio de información de bayes (CIB), con una componente principal que reúne más del 95% de la varianza.

El análisis de asignación con dos grupos muestra en un grupo la Semilla de cultivo (con excepción de la muestra SEM 23) en otro el resto de las poblaciones (Figura 11).



Figura 11. Gráfico de asignación de organismos del análisis discriminativo de componentes principales (ADCP) en cinco poblaciones naturales y un lote de semilla cultivo producido en laboratorio de almeja mano de león (N. subnodusus) con el Panel Total 1,979 SNP's y utilizando la agrupación del ADCP con k=2 grupos según el menor criterio de Información de Bayes (CIB).

Finalmente, cuando se realizó el análisis utilizando las poblaciones originales como grupos se observa una asignación del 100% de las muestras a la población de origen (Figura 12), con los tres paneles de SNP's, incluyendo la semilla de cultivo.

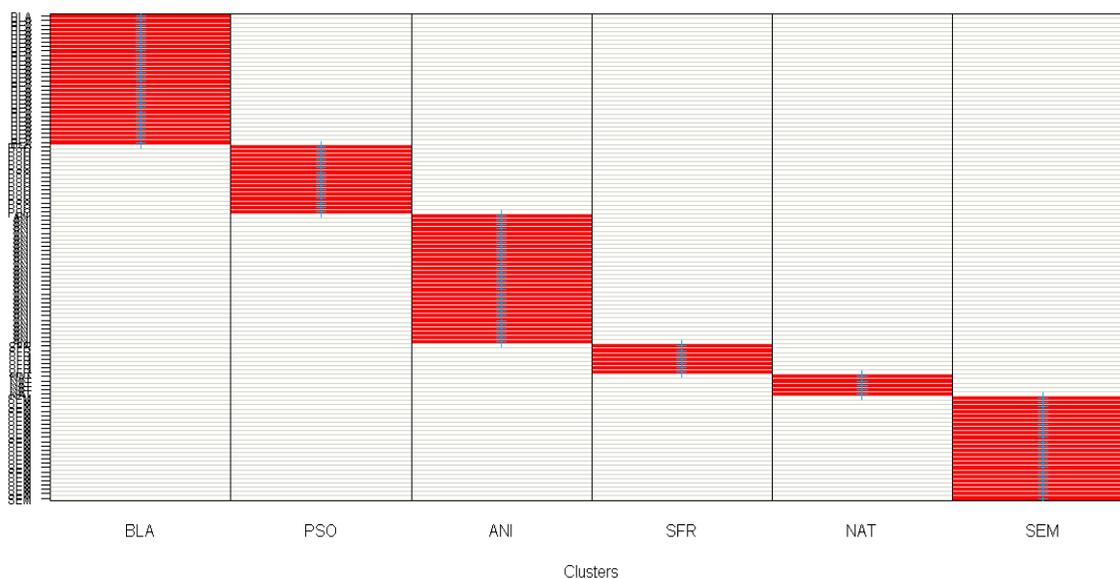


Figura 12. Gráfico de asignación del análisis discriminativo de componentes principales (ADCP) en cinco poblaciones naturales y un lote de semilla cultivo producido en laboratorio de almeja mano de león (N. subnodusus) con el panel Total 1,979 SNP's y utilizando el sitio de origen como grupo. Se recobraron 105 eigenvalores (>95% varianza) y dos componentes principales.

Este último análisis muestra las poblaciones del golfo (BLA, SFR, PSO y ANI) agrupadas del lado negativo del eje discriminante x (Figura 13) mientras que NAT y SEM se agrupan en el lado negativo del eje. Las poblaciones de SFR y SEM se separan en el eje x del grupo más unido (BLA, PSO y ANI) que también son las poblaciones más cercanas geográficamente entre ellas mientras que la población NAT, se separa en el eje y.

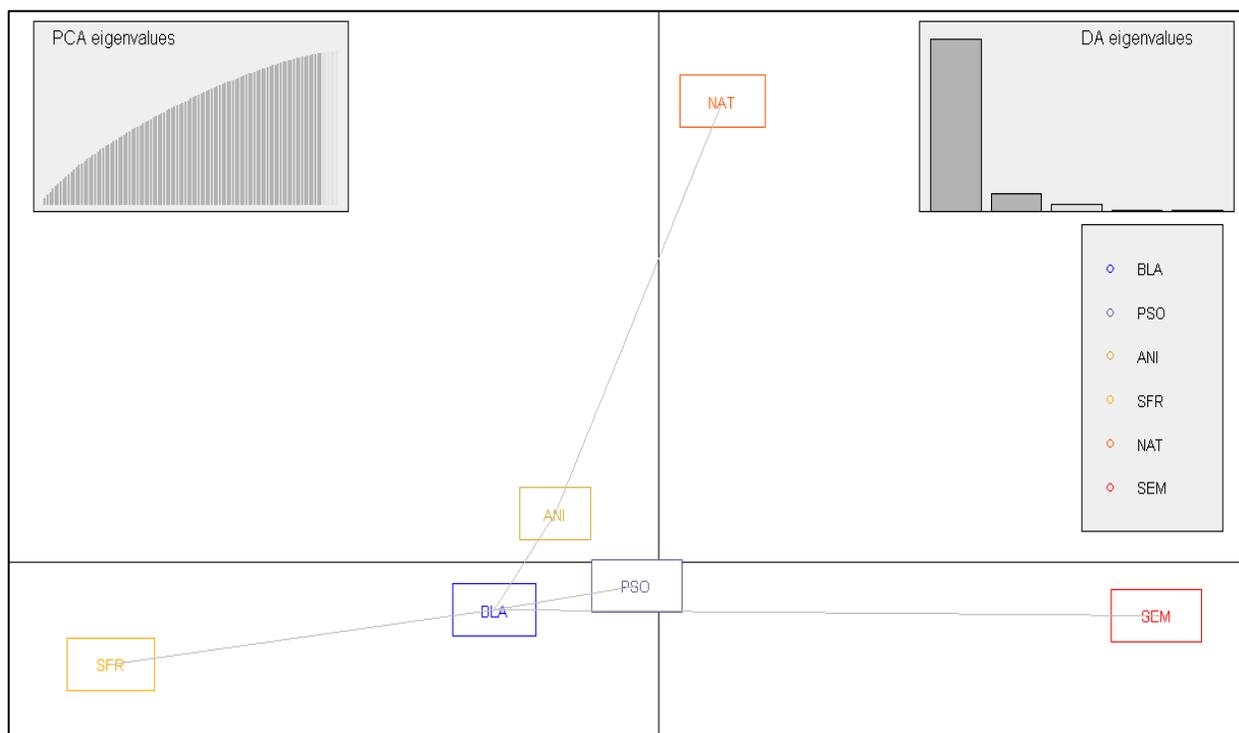


Figura 13. Gráfico de análisis discriminativo de componentes principales en cinco poblaciones naturales y un lote de semilla cultivo producido en laboratorio de almeja mano de león (N. subnodosus) con el Panel Total 1,979 SNP's, utilizando las poblaciones como grupos, con dos componentes principales que reúnen más del 95% de la varianza explicada.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Secuenciación de muestras

La baja cantidad de lecturas obtenidas en una notable cantidad de las muestras puede deberse a problemas durante la estandarización del DNA, o estar ligada directamente al proceso de secuenciación. Un bajo número de secuencias por muestra, implica una menor cantidad de rad-tags para apilar, lo cual traerá consigo una baja profundidad de genotipado. Aun así, el éxito de genotipado fue del 75%, lo cual indica un buen filtrado de los rad-tags, pues se consiguió captar adecuadamente la variabilidad genética de los organismos.

El hecho de que un gran porcentaje de las muestras descartadas por bajo éxito de genotipado provenían de la población de Bahía de la Paz, sugiere que podría tratarse de organismos de la especie críptica propuesta por Reeve (1853) como *Nodipecten arthriticus* y no aceptada hasta el momento (Mollusca Base, 2018). A pesar de que la confirmación de esta especie está pendiente, estudios previos ya han propuesto su presencia en el Golfo de California como organismo de ocurrencia críptica o como una especie que podría estar cambiando su rango de distribución normal a consecuencia del cambio ambiental global, como se ha venido observando con otras especies (Cheunh et al., 2009; Molinos et al., 2015; Hillebrand H. et al., 2018), ya que su distribución reportada es desde las islas Tres Marías en México (cerca de la boca del Golfo de California), hasta cerca de Paita, Perú (Smith, 1991).

Las muestras secuenciadas provenían de fijación en mallas de cultivos ostreros, tamaño de 3cm de altura en promedio, lo suficientemente pequeñas para enmascarar las escasas diferencias visuales propuestas para la concha de los adultos de *N. subnodosus* y *N. Arthriticus* (la segunda presenta un patrón irregular de nodos y una distinta cantidad de costillas en las valvas), por lo que pudieron ser confundidas fácilmente con Almeja Mano de León, y debido a que sólo se recibió el tejido del manto, no se pudo indagar en la morfología de las conchas.

La sugerencia de que estas muestras no eran de la especie *N. subnodosus* había sido previamente propuesta en el estudio realizado por Oviedo-Velázquez (2017) con estas mismas muestras biológicas. La alta especificidad de los primers conlleva una nula amplificación de los 10 microsatelites específicos de almeja Mano de León, que se usaron para describir la estructura poblacional por lo que se aumenta la probabilidad de que ésta hipótesis sea verdadera (Oviedo-Velazquez, 2017).

Los resultados de bajo éxito de genotipado obtenidos en el presente análisis poblacional para estos organismos, aportan evidencia que apoya la idea de la presencia de esta especie críptica. El análisis de las secuencias de RAD-seq mediante el programa STACKS implica el uso de un algoritmo de alineamiento que busca la máxima similitud entre rad-tags. Esto implica que aquellas secuencias con diferencias marcadas quedarán apiladas en diferente stack, por lo que son eliminadas por incumplir con los filtros necesaria para crear un loci SNP (como no estar presentes en la mayoría de los individuos, la frecuencia alélica o no estar presente en todas las poblaciones), lo cual produce una reducción muy significativa en el número de loci detectados. De hecho, se sabe que esta reducción puede ser directamente atribuida a la presencia de muestras con grandes diferencias genéticas (ej. diferentes especies o subespecies), entre las cuales se han acumulado una mayor cantidad de mutaciones diferentes a los SNP's, como inserciones, deleciones o recombinaciones cromosomales (Pante et al., 2014).

A pesar de que las evidencias parecen indicar tanto la existencia como la presencia de *Nodipecten arthriticus*, al menos en el área de Bahía de la Paz, se requiere de futuros estudios que puedan confirmarlo de manera genética mediante la secuenciación de marcadores moleculares como el COI o los componentes ribosomales y así realizar indagaciones filogenéticas para corroborar la presencia de esta especie. Igualmente, el uso de otro tipo de programas bioinformáticos como PyRAD puede ayudar a obtener una mayor cantidad de loci que permitan la comparación entre especies, ya que éste realiza un alineamiento de las secuencias y posteriormente verifica la homología parcial, lo cual resulta en la creación de loci válidos a pesar de presentar mutaciones tipo indel (Eaton, 2014).

4.2 Genotipado de poblaciones naturales

El número de alelos putativos encontrados para la comparación de poblaciones naturales fue bastante alto a pesar de la baja profundidad de secuenciación de algunas muestras y es comparable con la cantidad de marcadores obtenidos por técnicas similares en otros pectínidos (Van Wyngaarden et al., 2017) y bivalvos marinos (Araneda et al., 2016). Sin embargo, no se encontraron grandes diferencias en los paneles de marcador bajo selección, por lo que se recomienda explorar otros métodos de detección o la combinación de distintas metodologías como ha sido propuesto por Whitlock y Lotterhos (2015).

El hecho de que la población de Isla Natividad presentara la menor heterocigosidad y variabilidad genética, así como el mayor índice de endogamia, podría ser atribuido al bajo número de muestras de esta

población. Sin embargo, la población de San Francisquito, la cual cuenta solamente con 2 muestras más que la de Isla Natividad, resulta ser la población con la mayor probabilidad de estar en equilibrio de Hardy-Weinberg de todas las analizadas, además de presentar un Fis que no fue significativamente distinto a cero, una H_o muy similar a la H_e y un porcentaje de loci polimórficos similar al resto de poblaciones.

Los parámetros genéticos observados en Isla Natividad pueden ser debidos a diferentes escenarios. Por un lado, pueden ser atribuidos a la presencia de un cuello de botella reciente. A pesar de que este evento no ha sido documentado en el caso de Isla Natividad, la Laguna Ojo de Liebre registró mortandades masivas de almejas de la especie *Mano de León* en 2011 (Massó-Rojas et al., 2014). Existe una escasa distancia de ~ 87 km entre las dos ubicaciones por lo que corrientes superficiales de esa zona como la corriente de California (con sus $12.5-25 \text{ cm s}^{-1}$) en promedio tardaría de 4 a 8 días en transportar una partícula de Laguna Ojo de Liebre a isla Natividad, de hecho se han registrado velocidades mayores de hasta 50 cm s^{-1} , por lo que el tiempo podría ser mucho menor (Schwartzlose y Reid 1972, Lynn y Simpson 1987) o la Corriente Costera Mexicana con velocidades medias de $15-30 \text{ cm s}^{-1}$, a la cual le llevaría de 3 a 7 días transportar una partícula de isla Natividad a la laguna Ojo de Liebre (Lavín et al., 2006, Pantoja et al. 2011). Estos datos hacen posible suponer que las mortalidades pudieron haber ocurrido también en Isla Natividad, con la consecuente reducción poblacional y pérdida de diversidad genética que esto supondría. Por otro lado, aunque estas mortalidades no hubiesen ocurrido en Isla Natividad, el intercambio de larvas entre estas dos poblaciones es altamente probable, lo cual podría haber alterado la composición genética de Isla Natividad.

Todas las poblaciones naturales estuvieron significativamente ($p < 0.0005$) fuera del equilibrio de HW, lo cual era de esperarse puesto a que es improbable que una población natural cumpla con los supuestos teóricos del equilibrio de HW. Una de las posibles explicaciones puede ser la reducción de los tamaños poblacionales, lo cual ha modificado las frecuencias alélicas de estas poblaciones. La población de SFR estuvo en equilibrio de HW con todos los paneles de SNP's con una $P=1$. Una probabilidad tan alta es algo inesperado, y una posible explicación es que el número reducido de muestras en esta población haya sesgado la variabilidad alélica de tal manera que el cálculo resulta erróneo y lo más probable es que la población esté fuera de equilibrio de HW. Otras posibilidades serán discutidas más adelante.

4.2.1 Índices de fijación alélica de las poblaciones naturales

Las diferencias entre las distintas poblaciones vienen acompañadas de valores del índice de fijación que, aunque bajos, son significativos para los tres paneles (Total F_{st} = 0.0546; Neutral F_{st} =0.0554; Selección F_{st} =0.0506). Las comparaciones pareadas del F_{st} son significativas siempre para los casos que incluyen Isla Natividad. Debe tenerse en cuenta que es la población más alejada del resto (mínimo 1800 km hasta SFR), la única en el Pacífico y como se discutió anteriormente, presenta una significativa endogamia con bajo porcentaje de polimorfismos. Y como se discutió anteriormente puede estar pasando por un proceso de fijación alélica por reducción poblacional en la laguna Ojo de Liebre o en la misma población de Isla Natividad.

Los valores de F_{st} poblacionales encontrados en el presente trabajo (F_{st} = 0.0546, 95% CI= 0.0392, 0.0763), son mayores a los reportados por Oviedo-Velázquez (2017) (promedio F_{st} = 0.028; DE = 0.020), donde se utilizó el mismo set de muestras biológicas que el presente estudio, pero utilizando 10 microsateles como marcadores. Debido a que la naturaleza y cantidad de los marcadores utilizados es muy distinta entre los dos estudios, es de esperarse diferencias entre los resultados de cada uno, aún con esto, se observaron muchas similitudes, como son las diferencias en el F_{st} entre la población de NAT con BLA y ANI. El hecho de que en el presente estudio se encontraran más y mayores diferencias en el índice de fijación alélica entre las poblaciones, puede deberse a que al analizar un número mayor de marcadores el análisis toma una mayor resolución, de hecho, es una de las ventajas de utilizar RADseq (Mesak et al. 2014).

La distribución homogénea de las componentes genéticas encontradas con el programa STRUCTURE nos llevó a realizar la exploración con el mínimo de grupos posible ($k=2$), esta comparación nos hace darnos cuenta de que las poblaciones se pueden considerar una sola, ya que presentan aproximadamente las mismas proporciones de las componentes genéticas en cualquiera de las agrupaciones exploradas. Algunas muestras de la población ANI (las más destacadas ANI 12, REP 06, REP 15 y REP 19), presentaron unas proporciones de estas componentes genéticas visiblemente distintas en los tres paneles de SNP's. Es notable que la mayoría de estas diferencias se observan en los organismos utilizados como reproductores, en el desove de laboratorio para producir la semilla de cultivo (SEM). Estos organismos fueron colectados al azar del medio silvestre y el hecho de que tengan este comportamiento podría relacionarse con introgresión entre las poblaciones del Pacífico y Golfo de California (Petersen et al 2010, Oviedo-Velázquez 2017), con la translocación de individuos entre ambas costas de la península (Barrios-Ruiz et al. 2003, Diarte-Plata 2007, Petersen et al. 2010) o los diferentes cultivos que ya se han

llevado a cabo en la región desde hace más de 10 años, en donde se ha utilizado semilla producida en laboratorio que, normalmente, presenta diferente composición alélica que las poblaciones naturales (Petersen et al 2010, Oviedo-Velázquez 2017, ver discusión de la comparación de la semilla de cultivo).

La idea de una sola población está respaldada por el análisis de componentes principales realizado en ADEGENET, que no indica un grupo como el más probable, según el Criterio de Información de Bayes. En el análisis de Componentes principales utilizando las poblaciones de origen como agrupamiento todas las muestras se asignaron a su población de origen de manera correcta con los 3 paneles de marcadores (Total, Neutral, Selección).

4.3 Comparación con la semilla de cultivo

En la comparación de las poblaciones naturales contra los organismos producidos tras un desove controlado en laboratorio, se observó un mayor número de SNP's iniciales (comparado con el genotipado sin incluir la semilla), sin embargo, una vez aplicados los filtros, se observó una reducción del número de SNP's, quedando un set Total 20% menor al del genotipado de las poblaciones naturales. Aún con esto el número de SNP's de los paneles Neutral y Selección, en ambos genotipados tienen porcentajes similares de sus respectivos paneles Total.

La menor cantidad de SNP's en este genotipado puede deberse a una mayor diferenciación entre las poblaciones naturales y la semilla de cultivo. Probablemente el exceso inicial de alelos putativos provenía de esta última población, lo cual conlleva una baja frecuencia alélica y su posible ausencia en el resto de las poblaciones, por lo que fueron eliminados al aplicar los filtros de frecuencia alélica mayor al 5% y un genotipado en por lo menos 80% de las poblaciones, donde se excluyeron un total de 12,073 respecto a los 8757 que se quitaron en el mismo paso durante genotipado de las poblaciones naturales.

El número efectivo de individuos en las poblaciones naturales es muy similar al obtenido en el primer genotipado y la semilla de cultivo presenta también este patrón en los tres paneles de marcadores. La H_o en SEM es menor que la mayoría de las poblaciones con excepción de NAT, lo cual nos indica que, a pesar de haber un efecto de reducción en la heterocigosidad, probablemente producido por la reproducción artificial, este no es tan drástico como el observado en poblaciones naturales que están impactadas por eventos de reducción poblacional (ver discusión de poblaciones naturales).

Se puede sugerir que la población artificial de SEM no contribuye a una mayor endogamia entre las poblaciones naturales, puesto a que los coeficientes de endogamia positivos ($F_{is} > 0$) fueron prácticamente idénticos a los obtenidos en el genotipado entre las poblaciones naturales. El F_{is} en la población SEM fue incluso menor al de algunas de las poblaciones naturales en los paneles Total (BLA y NAT) y Neutral (BLA, NAT), de hecho, en el panel Selección el F_{is} de SEM es menor que el de todas las demás poblaciones analizadas (con excepción de SFR). Los valores de F_{is} observados por población son muy similares a los reportados por Oviedo-Velázquez (2017), sobre todo a los obtenidos en el panel Neutral, lo cual podría relacionarse con la calidad neutral de los marcadores utilizados por este autor (microsatélites utilizados). SEM presentó también un porcentaje de loci polimórficos parecido al de las poblaciones naturales, fue muy similar a SFR en los paneles Total y Neutral, mientras que en el panel Selección fue incluso mayor a SFR.

Una vez incluida SEM en el análisis de equilibrio de HW, los resultados se vieron ligeramente afectados y presentan el mismo escenario. Es esperado que ninguna población cumpla con el equilibrio de HW con un valor de $p=1$, sin embargo, este se mantiene en la población de SFR en los paneles Total y Neutral, además de que la población PSO tiene una $p=0$ en el panel Neutrales. Valores más reales fueron observados con el panel Selección, donde ningún valor fue de cero ni de 1. Como ya se discutió con anterioridad es posible que estos valores se den por el número de muestras en las poblaciones.

4.3.1 Índices de fijación alélica, ligeramente mayores en SEM

Una vez incorporado SEM al análisis del F_{st} , se constató que éste aumenta un par de centésimas el índice, lo cual fue constante con los tres paneles, pero no cambia sustancialmente el resultado inicial, la estructura genética en las poblaciones de almeja mano de león es "moderada", considerando la escala propuesta por Hartl y Clark (1997).

Una vez realizadas las comparaciones pareadas, se observa que el F_{st} de SEM es el que presenta las mayores diferencias, primero con NAT, pues como se ha discutido con anterioridad es la población más lejana y la que presenta las mayores deficiencias en la H_o y con el resto de las poblaciones, en todos los paneles. Sin embargo, las diferencias de la semilla de cultivo fueron incluso menores a las que presenta NAT con algunas de las poblaciones naturales. Con el panel Selección se observa una reducción de las diferencias de la población NAT con el resto de las poblaciones naturales, mientras que SEM mantiene

diferencias con todas las poblaciones naturales en todos los paneles. Este comportamiento sugiere que SEM tiene algunos loci bajo posible selección que le separan del resto de las poblaciones naturales, dichos loci podrían ser un efecto de las condiciones de laboratorio con las que fueron creadas las larvas, que son diferentes a las encontradas en el medio natural, lo cual supone una presión de selección diferente y distinta deriva génica.

Esta diferenciación fue notable también en los análisis de asignación realizado con el STRUCTURE, ya que el resultado de la tabla de Evanno fue consistente en designar $k=2$ en dos de los tres paneles utilizados. El hecho de que las componentes genéticas están distribuidos de manera inversa en SEM y las poblaciones naturales nos habla de una diferenciación en la semilla de cultivo con un posible efecto fundador. Con el panel Neutral, se detectaron $K=7$ componentes genéticas, las cuales presentan una distribución homogénea en las poblaciones BLA, PSO, SFR Y NAT, sin embargo, en la población ANI se observa que hay algunos individuos con frecuencias alélicas diferentes, algunos de estos individuos pertenecen a los organismos utilizados como reproductores para producir la semilla de cultivo. Al haber sido elegidos al azar, inconscientemente se pudo haber tomado estos organismos con cargas genéticas notablemente distintas. Una posible explicación viene del hecho de que los cultivos de almeja mano de león provenientes de desoves artificiales, vienen ocurriendo por lo menos desde 1999 (Villalejo-Fuerte et al. 2004), lo cual genera un efecto fundador en la progenie, que altera las frecuencias alélicas y aumenta el número de alelos nulos (Petersen et al. 2010, Oviedo-Velázquez 2017).

N. subnodosus es considerada una especie de reproducción precoz, ya que la talla media de maduración sexual reportada es de 120mm (Román et al. en Maeda-Martínez (ed.) 2001), pero con frecuencia se pueden presentar organismos maduros desde los 29mm (Lodeiros et al., 1998). Muchos de los cultivos se han mantenido en mar abierto hasta la talla de cosecha (~70mm) permaneciendo por más de 1.5 años en cultivo, lo cual es un tiempo suficiente para la maduración y desove de los organismos. De hecho, ya se ha evaluado el cómo los organismos de cultivo pueden impactar negativamente la diversidad genética de las poblaciones naturales de Almeja Mano de León (Petersen et al 2010). El impacto de los cultivos sumado al de los trasplantes entre poblaciones naturales durante por lo menos un periodo de 20 años, puede haber creado introgresión en algunas poblaciones naturales, produciendo organismos con diferencias en las componentes genéticas, como los de ANI, que fueron utilizados como reproductores.

Los resultados obtenidos del ADCP, refuerzan la evidencia de una separación de SEM de las poblaciones naturales, donde nuevamente al agregar la semilla de cultivo en el análisis se obtuvieron 2

grupos independientemente del panel de SNP's utilizado, en los cuales se observa la diferenciación de las poblaciones naturales en un grupo y la semilla de cultivo en el otro.

El análisis de asignación en los tres paneles de SNP's conteniendo dos grupos, asigna correctamente las poblaciones naturales (incluida NAT) en un solo grupo, en el cual también se incluye un solo organismo de la semilla de cultivo. Esto podría suponer, que algunas modificaciones en el protocolo de producción de semilla de almeja Mano de León utilizado por el IIO podrían llegar a producir organismos con una diversidad genética muy parecida a la de las poblaciones naturales actuales.

Es importante la producción de organismos para mantener la demanda comercial, sin embargo, es imperativo monitorear y detener el impacto de dichos cultivos en las poblaciones naturales.

Se debe poner especial empeño en producir mejor semilla de cultivo en laboratorio antes de continuar con los cultivos en el medio natural, si se desea por lo menos conservar el estado actual que se tiene de las poblaciones, ya que de seguir poniendo organismos con carga genética distinta en las poblaciones de por sí reducidas, se puede perder la especie como recurso ecológico, así como se perderá la oportunidad económica que supone el cultivo de la Almeja Mano de León.

Identificar el número mínimo de reproductores efectivos para producir una progenie con variabilidad genética semilla a la de poblaciones naturales, utilizar organismos que no presenten diferencias genéticas con el resto de los organismos silvestres, asegurar el cruce 1-1 y la contribución de ambos sexos de cada uno de los reproductores, y otras acciones para producir semilla en laboratorio son deseables tanto para el productor como para el medio ambiente natural.

El cultivo de estas semillas en el medio abierto implicaría en sí, una mayor tasa de reclutamiento hacia las poblaciones naturales, lo que incluso ayudaría a que estas aumenten, que en el futuro podría suponer la recuperación también de la importante pesquería que se comenzaba a desarrollar, la cual de ser realizada de una manera responsable podría en su momento fortalecer la economía local.

El presente estudio representa un primer paso para la posible creación de un panel de SNP's que pueda ser utilizado para evaluar la diversidad genética de los organismos empleados como reproductores y así mejorar la posibilidad de obtener una buena variabilidad genética de los individuos producidos en dichos cruces.

Capítulo 5. Conclusiones

1. Existe una sola población de Almeja Mano de León de la península de Baja California con una estructura poblacional moderada y probablemente influenciada por reducciones poblacionales grandes en algunas poblaciones.
2. No se encontraron SNP's que estén relacionados con adaptación local utilizando el método F_{st}/H_e .
3. Los cultivos provenientes de desoves masivos artificiales y los trasplantes de organismos comienzan a ser notables en la variabilidad genética de las poblaciones naturales.
4. Las Semillas de cultivo producidas en laboratorio presentaron una ligera pérdida de variabilidad y diversidad genética, pero el cambio en la composición alélica las diferencia drásticamente de las poblaciones naturales.
5. Algunos de los organismos de la semilla producida artificialmente se parecían genéticamente a los de las poblaciones naturales, por lo que modificaciones en el protocolo de producción deberán ser implementadas para no continuar impactando la variabilidad genética de las poblaciones naturales.

Literatura citada

- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., y Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81–92. doi:10.1038/nrg.2015.28
- Antao, T., Lopes, A., Lopes, R. J., Beja-Pereira, A., & Luikart, G. (2008). LOSITAN: a workbench to detect molecular adaptation based on a Fst-outlier method. *BMC bioinformatics*, 9, 323. doi:10.1186/1471-2105-9-323
- Arellano-Martínez, M., Raccotta, I. S., Ceballos-Vázquez, B. P., & Elorduy-Garay, J. F. (2004). Energy cycle, reproductive activity, and food availability of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in the Laguna Ojo de Liebre, BCS, Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 23, 15-23.
- Arellano-Martínez, M., Ceballos-Vázquez, B. P., Ruíz-Verdugo, C., Pérez de León, E., Cervantes-Duarte, R., & Domínguez-Valdéz, P. M. (2011). Growth and reproduction of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in a suspended culture system at Guerrero Negro lagoon, Baja California Sur, Mexico. *Aquaculture Research*, 42(4), 571-582.
- Barrios-Ruiz, D., Chavez, J., & Cáceres, C. (1997, April). First trial of growth *Lyropecten subnodosus* under culture conditions in Bahía de La Paz, BCS, México. In *Book of Abstracts 11th Internacional Pectinid Workshop, CICIMAR La Paz, México* (pp. 107-110).
- Barrios-Ruiz D, Chavez-Villalba J, Caceres-Martinez C (2003). Growth of *Nodipecten subnodosus* (Bivalvia: Pectinidae) in La Paz Bay, Mexico. *Aqua Res* 34:633–639
- Beltrán Lugo, A. I. (2005). Estudios sobre la reestructuración en frío del músculo aductor en moluscos pectínidos.
- Boening, C., J. K. Willis, F. W. Landerer, R. S. Nerem, and J. Fasullo (2012). The 2011 La Niña: So strong, the oceans fell, *Geophys. Res. Lett.*, 39, L19602, doi: 10.1029/2012GL053055.
- Cáceres-Martínez, J. (1997). Mussel fishery and culture in Baja California, México: history, present status, and future. Mackenzie Jr. Jr., CL, Burrell Jr. Jr., AR (Eds.), *The History, Present Condition and Future of the Molluscan Fisheries of North America and Europe*: NOAA Tech. Rep. NMFS, 128, 41-55.
- Carvajal-Rascón M.A. (1987). Cultivo larvario de la almeja mano de león *Lyropecten (Nodipecten) subnodosus* a partir del crecimiento y maduración gonadal de los reproductores. MSc Thesis, ITESM, Guaymas, Son, México.
- Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., & Postlethwait, J. H. (2011). Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, genomes, genetics*, 1(3), 171-182.
- Catchen, J.M., Bassham, S., Wilson, T., Currey, M., O'Brien, C., Yeates, Q., & Cresko, W. A. (2013). The population structure and recent colonization history of Oregon threespine stickleback determined using restriction-site associated ADN-sequencing. *Molecular ecology*, 22(11), 2864-2883.
- Chavez, J., & Cáceres, C. (1992). Scallop culture in the northwest of Mexico. *WORLD AQUACULTURE-BATON ROUGE-*, 23, 20-20.
- Coombs, J. A., Letcher, B. H., & Nislow, K. H. (2008). CREATE: a software to create input files from diploid genotypic data for 52 genetic software programs. *Molecular Ecology Resources*, 8(3), 578-580.
- Dapa, A., & Antonio, M. (2010). Estudio de la reproducción de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) (pectinidae) en un sistema de cultivo en suspensión de Bahía Tortugas,

- BCS, México (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas)..
- Dapa, M. A., Arellano-Martínez, M., Ceballos-Vázquez, B. P., Acosta-Salmón, H., & Saucedo, P. E. (2015). Análisis comparativo de la estrategia reproductiva de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* en Baja California Sur, México. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(3), 616.
- Diarte-Plata G (2007) Cultivo experimental de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) en la costa Norte de Sinaloa, México. Tesis de Maestría. Instituto Politecnico Nacional, Guasave, Sinaloa, México.
- Earl, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361.
- Eaton, Deren A. R. (2014). PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 30(13)1844–1849.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 1, 47.
- (FAO) United Nations Food and Agriculture Organization. 2014. The state of world fisheries and aquaculture 2014. United Nations Food and Agriculture Organization, Rome.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Resources*, 7(4), 574-578.
- García-Domínguez, F., Castro-Moroyoqui, P., & Félix-Pico, E. (1992). Spat settlement and early growth of *Lyropecten subnodosus* (Sowerby 1835) in Laguna Ojo de Liebre, BCS, Mexico, 1989–1990. *J. Shellfish Res*, 11(1), 195.
- Goudet, J. (2001). FSTAT (version 2.9. 3): a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (updated from Goudet 1995). University of Lausanne, Switzerland.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., y McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. doi:10.1038/nrg.2016.49
- Hartl, D.L., Clark, A.G. 1997. Principles of Population Genetics, 3rd edn. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA. En: Balloux, F., Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular ecology*, 11(2), 155-165.
- Hillebrand H., Brey T., Gutt T., Hagen W., Metfies K., Meyer B., Lewandowska A. (2018). Climate Change: Warming Impacts on Marine Biodiversity. In: Salomon M., Markus T. (eds) Handbook on Marine Environment Protection. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-60156-4_18.
- Hohenlohe, P. A., Catchen, J., & Cresko, W. A. (2012). Population genomic analysis of model and nonmodel organisms using sequenced RAD tags. *Data Production and Analysis in Population Genomics: Methods and Protocols*, 235-260.
- Ibarra, A. M., Petersen, J. L., Famula, T. R., & May, B. (2006). Characterization of 35 microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and their cross-species amplification in four other scallops of the Pectinidae family. *Molecular Ecology Resources*, 6(1), 153-156.
- IUCN 2017. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-3. <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 05 December 2017.
- Kalinowski, S. T. (2006). hw-quickcheck: an easy-to-use computer program for checking genotypes for agreement with Hardy–Weinberg expectations. *Molecular Ecology Resources*, 6(4), 974-979.

- Kalinowski, S. T., & Taper, M. L. (2006). Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 7(6), 991-995.
- Karlsson, S., Larsen, B. M., & Hindar, K. (2014). Host-dependent genetic variation in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). *Hydrobiologia*, 735(1), 179-190.
- Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T.F., Crozier, W.W., & Prodöhl, P.A., (2013), diveRsity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors, *Methods in Ecology and Evolution*.doi:10.1111/2041-210X.12067.
- Koch, V., Rengstorf, A., Taylor, M., Mazón-Suástegui, J. M., Sinsel, F., & Wolff, M. (2015). Comparative growth and mortality of cultured Lion's Paw scallops (*Nodipecten subnodosus*) from Gulf of California and Pacific populations and their reciprocal transplants. *Aquaculture Research*, 46(1), 185-201.
- Lodeiros C. J., J. J. Rengel, L. F. Freitas, F. Morales, & J.H. Himmelman. 1998. Growth and survival of the tropical scallop *Lyropecten* (*Nodipecten*) *nodosus* maintained in suspended culture at three depths. *Aquaculture* 165: 41-50.
- Maguiño-Napurí, R., Maeda-Martínez, A. N., Moctezuma-Cano, T., Valle-Meza, G., & Acosta-Salmón, H. (2011). Larval abundance and spat collection of the lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* in Ojo de Liebre Lagoon, Baja California Sur, Mexico. *Ciencias Marinas*, 37(1), 51-57.
- Maldonado-Amparo, R., Ramírez, J. L., Ávila, S., & Ibarra, A. M. (2004). Triploid lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus* Sowerby); growth, gametogenesis, and gametic cell frequencies when grown at a high food availability site. *Aquaculture*, 235(1), 185-205.
- Masso-Rojas, A., Morales-Bojorquez, E., & Talavera-Mayer, J. (2000). La pesquería de almeja mano de león, Baja California. *Sustentabilidad y pesca responsable en México, evaluación y manejo*. Instituto Nacional de Pesca, Mexico, 349-366.
- Massó-Rojas, J. A., Morales-Bojórquez, E., Arellano-Martínez, M., Ceballos-Vázquez, B. P., Talavera-Maya, J., Ceseña-Espinoza, N. 2014. Almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*. En: Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA) (Ed.).2014. *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México Evaluación y Manejo*. pp. 17-48.
- Mesak Felix, Tatarenkov Andrey, Earley Ryan L., Avise John C. (2014). Hundreds of SNPs vs. dozens of SSRs: which dataset better characterizes natural clonal lineages in a self-fertilizing fish? *Frontiers in Ecology and Evolution*. 2. Pp.74. Doi. 10.3389/fevo.2014.00074
- Morales-Hernández, R., & Cáceres-Martínez, C. (1996). Pesquería de almeja mano de leon *Lyropecten subnodosus*. In *Estudio Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur* (Vol. 1, pp. 87-100). SEMARNAP La Paz, México.
- Molinos J. G., Halpern B. S., Schoeman D. S., Brown C., Kiessling W., Moore P. J., John M. Pandolfi, Poloczanska E. S, Anthony J. Richardson, Burrows, M. T. (2016). Climate velocity and the future global redistribution of marine biodiversity. *Nature Climate Change*, 6, 83–88.
- MolluscaBase (2018).*Nodipecten arthriticus* (Reeve, 1853). Accessed through: World Register of Marine Species at: Recuperado el 31 octubre de 2018 de: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=394381>
- Osuna-García, M., Hernandez-Llamas, A., & Mazón-Suástegui, J. M. (2008). Production dynamics of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* cultivated off-bottom. *Aquaculture*, 274(2), 260-267.

- Pante, E., Abdelkrim, J., Viricel, A., Gey, D., France, S. C., Boisselier, M. C., & Samadi, S. (2014). Use of RAD sequencing for delimiting species. *Heredity*, 114(5), 450-9.
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Resources*, 6(1), 288-295.
- Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2012). GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
- Pérez-DeLeón, M. E., Arellano-Martínez, M., & Ceballos-Vázquez, B. P. (2006). Reproduction of *Nodipecten subnodosus* (sowerby, 1835) in suspended culture in the guerrero negro lagoon, baja california sur. In The Organizing Committee thanks and recognizes the support of the Workshop's sponsors (Vol. 25, No. 1, p. 300).
- Petersen, J. L., Ibarra, A. M., Ramirez, J. L., & May, B. (2008). An induced mass spawn of the hermaphroditic lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*: genetic assignment of maternal and paternal parentage. *Journal of heredity*, 99(4), 337-348.
- Petersen, J. L., Ibarra, A. M., & May, B. (2009). Thirty-seven additional microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and cross-amplification in other pectinids. *Conservation Genetics Resources*, 1(1), 101.
- Petersen, J. L., Ibarra, A. M., & May, B. (2010). Nuclear and mtADN lineage diversity in wild and cultured Pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus* (Baja California Peninsula, Mexico). *Marine biology*, 157(12), 2751-2767.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Racotta, I. S., Ramirez, J. L., Ibarra, A. M., Rodriguez-Jaramillo, M. C., Carreño, D., & Palacios, E. (2003). Growth and gametogenesis in the lion-paw scallop *Nodipecten* (*Lyropecten*) *subnodosus*. *Aquaculture*, 217(1), 335-349.
- Ramasamy, R. K., Ramasamy, S., Bindroo, B. B., & Naik, V. G. (2014). STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *SpringerPlus*, 3(1), 431.
- Ramírez Arce, J. L. (2009). Evaluación de la ventaja productiva y grado de esterilidad en triploides de almeja mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby 1835) como una alternativa para el cultivo en el Parque Nacional Bahía de Loreto, Golfo de California (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas).
- Reinecke-Reyes, M. A. (1996). Madurez y desove de la almeja mano de león *Lyropecten subnodosus* Sowerby, 1835 (Bivalvia: Pectinidae) en la Laguna Ojo de Liebre, BCS, México. *Boletín Pesquero CRIP-La Paz*, 3, 17-20.
- Rupp, G.S., Velez, A., De Bem, M., Poli, C.R., 1997. Effect of temperature on conditioning and spawning of the tropical scallop *Nodipecten nodosus*. In: Félix-Pico, E. (Ed.), 11th International Pectinid Workshop, La Paz, México, pp. 132 – 133.
- Robledo, D., Palaiokostas, C., Bargelloni, L., Martínez, P., y Houston, R. (2017). Applications of genotyping by sequencing in aquaculture breeding and genetics. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 670–682. doi:10.1111/raq.12193
- SEMARNAT. Acuerdo por el que se da a conocer la Actualización de la Carta Nacional Pesquera. México DF, 24. Diario Oficial de la Federación, D. O. (2012).

- Smith, J. T. 1991. Cenozoic giant pectinids from California and the Tertiary Caribbean Province; *Lyropecten*, " *Macrochlamis*," *Vertipecten*, and *Nodipecten* species. 241 pp.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Resources*, 4(3), 535-538.
- Van Wyngaarden, M. , Snelgrove, P. V., DiBacco, C. , Hamilton, L. C., Rodríguez-Ezpeleta, N. , Jeffery, N. W., Stanley, R. R. and Bradbury, I. R. (2017), Identifying patterns of dispersal, connectivity and selection in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*, using RADseq-derived SNPs. *Evol Appl*, 10: 102-117. doi:10.1111/eva.12432
- Vendrami, D. L., Telesca, L., Weigand, H., Weiss, M., Fawcett, K., Lehman, K., Clark, M. S., Leese, F., McMinn, C., Moore, H., ... Hoffman, J. I. (2017). RAD sequencing resolves fine-scale population structure in a benthic invertebrate: implications for understanding phenotypic plasticity. *Royal Society open science*, 4(2), 160548. doi:10.1098/rsos.160548
- Villalejo-Fuerte, M., M. Arellano-Martínez, M. Robles, & B. P. Ceballos-Vázquez. 2004. Growth of lion-paw *Nodipecten* (= *Lyropecten*) *subnodosus* (Sowerby, 1835) maintained in suspended culture in Bahía de Juncalito, Golfo de California, México. *Hidrobiológica*. 14:1-5.
- Villalva-Vega, J. 2011. Caracterización de las bacterias asociadas a lesiones de la concha de la almeja Mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835), cultivada en Bahía Tortugas, Baja California Sur. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. 54 pp.
- Yee-Duarte, Alonso J. (2009). Reproducción de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, Sowerby 1835 en Bahía de los Ángeles, BC, México (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico Nacional. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas).