

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

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



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

**Identificación de especies para trazabilidad de abulones del
Pacífico nororiental y genómica poblacional de *Haliotis
cracherodii* en peligro crítico**

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

Presenta:

Carmen Elvira Vargas Peralta

Ensenada, Baja California, México
2023

Tesis defendida por
Carmen Elvira Vargas Peralta

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Codirectora de tesis

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Codirectora de tesis

Miembros de comité

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez



Dr. Edgardo Alfredo Hidalgo Sepúlveda Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Carmen Elvira Vargas Peralta** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Ciencias de la Vida [con orientación en Biotecnología Marina](#)

Identificación de especies para trazabilidad de abulones del Pacífico nororiental y genómica poblacional de *Haliotis cracherodii* en peligro crítico

Resumen aprobado por:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Codirectora de tesis

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz

Codirectora de tesis

En el Pacífico Nororiental (PNO) habitan seis especies de abulón con importancia ecológica y socioeconómica para la península de Baja California, México. Cinco de ellas se encuentran en la Carta Nacional Pesquera que establece permisos y cuotas para su captura por medio de cooperativas pesqueras. Estados Unidos es el principal mercado del abulón mexicano, país en el cual la pesca de abulón está cerrada y donde el comercio de especies en peligro crítico como el abulón chino y negro es ilegal. Por ello, es necesario contar con herramientas moleculares que permitan el comercio responsable y sustentable de este recurso. Los marcadores SNP se han utilizado en identificación de especies, asignación parenteral, análisis poblacional, trazabilidad y otras aplicaciones en organismos acuáticos. Sin embargo, su uso puede ser poco práctico en análisis de rutina. De lo contrario, el uso de un solo marcador molecular no siempre es suficiente para identificación de especies y, en ocasiones, puede llevar a conclusiones erróneas. En este trabajo, se generaron marcadores SNP para la identificación de las especies de abulón del PNO con alto poder discriminante y se compararon con marcadores monolocus (Mml) previamente reportados y nuevos (diseñados aquí) para su uso potencial en tejido fresco, productos enlatados y organismos híbridos. Se obtuvo un panel Total de 1,123 SNP, de los cuales se seleccionaron los SNP más informativos bajo dos criterios: con Alelos Privados (66 SNP) y con Alelos Atípicos (24 SNP), que permitieron la discriminación de cinco y cuatro especies de abulón, respectivamente. A partir del panel de Alelos Privados, se seleccionó un número reducido de SNP con el que se desarrolló una metodología para su rápida detección por medio de curvas de disociación (HRM). Se logró la identificación correcta de las seis especies de abulón en tejido fresco y productos enlatados con un mejor desempeño que los Mml, lo cual hace factible esta metodología para su uso rutinario en productos desconchados, congelados y/o enlatados. Por otra parte, considerando que el abulón negro es un recurso en peligro crítico, se identificaron marcadores SNP empleando su genoma de referencia para analizar la genómica poblacional a lo largo de su distribución geográfica en nueve localidades distribuidas entre California (CMC, CSM) y Baja California (BJM, ITS, SLM, PBD, BTS, PCS, FSJ) con signos de recuperación. Con 11,152 SNP neutrales se encontró una estructura genómica que divide el área en dos grupos: un grupo al norte conformado por siete localidades (CMC, CSM, BJM, ITS, SLM, PBD, BTS), y otro al sur con dos (PC y FSJ). Donde, a pesar de su distancia geográfica (300 km) existe un alto flujo genético entre grupos. Todas las localidades presentan índices de endogamia (F_{IS}) significativos, siendo FSJ la que presentó el mayor valor de F_{IS} , menor migración relativa y una alta relación de parentesco entre individuos. Estos resultados son los primeros en un contexto binacional con marcadores SNP y contribuirán a implementar estrategias de manejo y conservación de este valioso recurso que apoyen la recuperación de sus bancos naturales a mediano y largo plazo.

Palabras clave: Identificación de especies, *Haliotis*, abulón, RADseq, HRM, SNP.

Abstract of the thesis presented by **Carmen Elvira Vargas Peralta** as a partial requirement to obtain the Doctor of Science degree in Life Sciences with orientation in Marine biotechnology

Species identification for traceability of abalone from Northeast Pacific and population genomics of the critically endangered *Haliotis cracherodii*

Abstract approved by:

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Thesis Director

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz

Thesis Director

Six abalone species of ecological and socioeconomic importance for the Baja California peninsula, Mexico, inhabit the Northeastern Pacific Ocean (NEP). Five of them are included in the National Fishing Charter, which establishes permits and quotas for their capture by fishing cooperatives. The United States is the primary market for Mexican abalone, a country where abalone fishing is closed and where the trade of critically endangered species such as Chinese/white and black abalone is illegal. Therefore, it is necessary to have molecular tools that allow responsible and sustainable trade of this resource. SNP markers have been used in species identification, parenteral allocation, population analysis, traceability, and other applications in aquatic organisms. However, their use may be impractical in routine analysis. Otherwise, using a single molecular marker is insufficient for species identification and can sometimes lead to erroneous conclusions. This work generated SNP markers for identifying NEP abalone species with high discriminant power. It compared them with previously reported and new monolocus markers (Mml) (designed here) for potential use in fresh tissue, canned products, and hybrid organisms. A Total panel of 1,123 SNPs was obtained, from which the most informative SNPs were selected under two criteria: Private Alleles (66 SNPs) and Atypical Alleles (24 SNPs), which allowed discrimination of five and four abalone species, respectively. A reduced number of SNPs were selected from the Private Allele panel, and a methodology was developed for their rapid detection through melting curves (HRM). Correct identification of the six abalone species in fresh tissue and canned products was achieved with better performance than Mml, which makes this methodology feasible for routine use in shucked, frozen, and canned products. On the other hand, considering that black abalone is a critically endangered resource, SNP markers were identified using its reference genome to analyze population genomics along its geographic distribution in nine locations distributed between California (CMC, CSM) and Baja California (BJM, ITS, SLM, PBD, BTS, PCS, FSJ) with signs of recovery. With 11,152 neutral SNPs, a genomic structure was found that divides the area into two groups: one group to the north made up of seven localities (CMC, CSM, BJM, ITS, SLM, PBD, BTS) and another to the south with two (PC and FSJ). Despite their geographical distance (300 km), there is a high genetic flow between groups. All localities show significant inbreeding indices (F_{IS}), FSJ being the one with the highest F_{IS} value, lower relative migration, and a high kinship relationship between individuals. These results are the first in a binational context with SNP markers. They will contribute to implementing management and conservation strategies for this valuable resource that supports the recovery of its natural banks in the medium and long term.

Keywords: Species Identification, *Haliotis*, RADseq, HRM, SNP.

Dedicatoria

A Ignacio.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), por haberme permitido realizar el posgrado y cubrir los gastos de las materias durante mi desarrollo académico, además de haber facilitado las instalaciones y laboratorios para poder realizar el trabajo experimental en especial al Laboratorio de Genética Acuícola, por permitirme usar las instalaciones y equipo. Al Genómica Funcional del departamento de Biotecnología Marina del CICESE, por dejarme utilizar el equipo de PCR en tiempo real.

A las instituciones que apoyaron financiando este trabajo, al CICESE con los proyectos internos 682-136 y 623-159 al proyecto SEP-CONACYT-CB-2014-238708 y al Instituto Nacional de Pesca (INAPESCA) con el proyecto INAPESCA-CONAPESCA-SAGARPA-RGA-2016- 2505160170.

Al proyecto “Patrones convergentes evolutivos de adaptación local en el ambiente marino” (No. 321016), fondo Ciencia de Frontera, Modalidad: Paradigmas y Controversias de la Ciencias 2022. Al proyecto “Paisaje genómico en el medio marino: patrones de diversidad adaptativa” (CB-2015-257524), fondo: SEP - CONACYT / Investigación Básica. Al proyecto: “Un nuevo enfoque para la recuperación, inspección y vigilancia de recursos sobreexplotados de alto valor comercial, caso de estudio: La pesquería de abulón” (no.1743), fondo: CONACYT-Proyectos de Desarrollo Científico para Atender Problemas Nacionales.

Al Dr. James Moore del Californian Department of Fish and Wildlife, a la Dra. Kristin Aquilino del UC Davis Bodega Bay Marine Laboratory y al Dr. John Hyde de NOAA Fisheries, Southwest Fisheries Science Center, La Jolla, CA. y a la empresa Litoral de Baja California por proporcionarnos muestras para este estudio.

A mi comité por el apoyo, atención y la confianza brindada para el desarrollo de este proyecto de investigación, en especial a Fabiola que me inspiro y contagio su pasión por los abulones, Clarisa que supo impulsarme durante mi doctorado, Carlos por su guía y constante apoyo para ser más clara y precisa, Alexei por su atención y disposición para avanzar en el proyecto y Fausto por su paciencia, guía, consejos y apoyo durante todo el proceso.

Se agradece a la Dra. Edna Sánchez Castrejón por su apoyo técnico en el laboratorio de Genómica Funcional del departamento de Biotecnología Marina del CICESE.

A la Unidad de NanoCaracterización (UNAC) por el apoyo en suministro de nitrógeno líquido con el apoyo técnico de Jaime Mendoza López y el Dr. Miguel Ángel Estrada.

Al personal administrativo del posgrado de Ciencias de la Vida, Biblioteca y el Departamento de Estudios de Posgrado por el apoyo brindado.

Con especial cariño a mis jefes inmediatos a la Dra. Blanca Claudia Farfán y el Dr. Miguel Ángel del Río Portilla que me permitieron realizar el doctorado y fueron un apoyo académico y personal importante, así como a los jefes del departamento de Acuicultura durante este periodo la Dra. Carmen Paniagua y el Dr. Juan Pablo Lazo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	xii
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1 Escenario actual de la producción de abulón en México.....	1
1.2 Sustitución de alimentos de origen pesquero	4
1.3 Trazabilidad de alimentos	5
1.4 Antecedentes	6
1.4.1 Marcadores moleculares y la identificación de especies en abulones del PNO	6
1.4.2 Análisis de curvas de disociación (HRM)	9
1.4.3 Estudios genómicos poblacionales de abulón.....	11
1.5 Justificación	13
1.6 Hipótesis.....	15
1.7 Objetivos	16
1.7.1 Objetivos generales.....	16
1.7.2 Objetivos específicos.....	16
Capítulo 2. Metodología.....	17
2.1 Selección de SNP para identificación de especies.....	17
2.1.1 Muestras de abulones y extracción de DNA	17
2.1.2 Secuenciación RAD-seq y detección de SNP	19
2.1.3 Selección de los SNP más informativos.....	20
2.1.3.1 SNP y su detección por HRM.....	21
2.2 Comparación de SNP y Mml para la identificación de especies de abulón	21
2.2.1 Muestras.....	21
2.2.2 Identificación de especie con Mml.....	22
2.2.2.1 Condiciones de amplificación y visualización.....	23
2.2.3 Identificación de especie con SNP.....	24

2.3	Análisis poblacional del abulón negro con SNP	24
2.3.1	Muestras.....	24
2.3.2	Preparación de librerías ddRAD-seq	25
2.3.3	Detección de SNP con genoma de referencia para el abulón negro	26
2.1.3.	Búsqueda de SNP bajo selección.....	27
2.3.4	Análisis de diversidad y estructura genética en el abulón negro.....	27
Capítulo 3.	Resultados	30
3.1	SNP para la identificación de especies	30
3.1.1	Secuenciación RAD-seq y detección de SNP	30
3.1.2	Selección de los SNP más informativos para la identificación de especies	31
3.1.3	SNP y su detección por HRM.....	33
3.2	Comparación de SNP y Mml.....	34
3.2.1	Identificación de especies de abulón con SNP	34
3.2.2	SNP bajo selección.....	36
3.2.3	Identificación de especies de abulón con Mml.....	36
3.3	Análisis poblacional del abulón negro con SNP	39
3.3.1	Detección de SNP con genoma de referencia en el abulón negro.....	39
3.3.2	Diversidad y estructura genética del abulón negro	40
Capítulo 4.	Discusión.....	46
4.1	SNP para la identificación de especies de abulón del PNO.....	46
4.2	Identificación de seis especies de abulón con SNP	48
4.3	Identificación de especies con Mml.....	49
4.4	Análisis poblacional del abulón negro.....	51
Capítulo 5.	Conclusiones	55
5.1	SNP para la identificación de especies de abulón del PNO.....	55
5.2	Comparación de Mml y detección de SNP por HRM para identificación de abulones del PNO	55
5.3	Análisis poblacional del abulón negro.....	56
Literatura citada	58	
Anexos.....	69	

Lista de figuras

Figura	Página
1. Distribución geográfica y batimétrica de las especies de abulón del Pacífico Nororiental (PNO). Distribución a lo largo de la línea de costa en barras y su profundidad en metros, especies y nombre común en la tabla insertada (basado en Cox Keith W., 1962; Geiger & Owen, 2012)..2	
2. Producción histórica de abulón, por especie, en México desde 1990 hasta 2018. Fuente de datos de CONAPESCA, 2020. En el eje principal se encuentran la producción de abulón amarillo (<i>H. corrugata</i>), azul (<i>H. fulgens</i>) y abulones sin identificar como Abulones sp. en barras apiladas; mientras que en el eje secundario en líneas punteadas corresponde para los abulones negro (<i>H. cracherodii</i>) en color negro, chino (<i>H. sorenseni</i>) en gris, rojo (<i>H. rufescens</i>) en rojo y pinto/rayado (<i>H. kamtschatkana</i>) en lila.3	
3. Principio de la técnica de <i>High Resolution Melting</i> (HRM). A partir de un amplicón al terminar la PCR se incrementa la temperatura para que ese amplicón de doble hebra(dsDNA) se separe (disocie) hasta llegar a dos hebras de cadena sencilla (ssDNA) y pueda ser detectado el tipo de SNP (homodúplex o heterodúplex) por la diferencia en la fluorescencia. 10	
4. Diagrama de la metodología aplicada..... 17	
5. Mapa de la procedencia de las muestras de abulón negro incluidas en el análisis poblacional. 25	
6. Árbol NJ basado en la matriz de distancia F_{ST} de las especies de abulón con distribución en México analizadas en el primer lote de muestras. 30	
7. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para los tres paneles de SNP obtenidos. (A) Total (1,127 SNP) representación 2D (LD1 y LD2) con agrupaciones señalizadas con hélices; (B) Alelos Privados (66 SNP) representación 3D y (LD1, LD2 y LD3), representación 2D (ver Anexo A, Figura 19); (C) Atípicos (24SNP) representación 2D (LD1 y LD2). Los puntos representan cada individuo con diferente color por especie: Abulón rojo (<i>H. rufescens</i> , AR), amarillo (<i>H. corrugata</i> , AM), azul (<i>H. fulgens</i> , AZ), negro (<i>H. cracherodii</i> , AN) y rayado/pinto (<i>H. kamtschatkana</i> , HK). 32	
8. Curvas de disociación de alta resolución (HRM) para la identificación de seis especies de abulón del Pacífico Nororiental, empalmadas. Abulón rojo (<i>H. rufescens</i>), amarillo (<i>H. corrugata</i>), azul (<i>H. fulgens</i>), negro (<i>H. cracherodii</i>), pinto/rayado (<i>H. kamtschatkana</i>) y chino (<i>H. sorenseni</i>). 34	
9. Curvas de disociación de alta resolución (HRM) para la identificación de seis especies de abulón del PNO. (A) Muestras control de tejido fresco, Rojo (<i>H. rufescens</i>), amarillo (<i>H. corrugata</i>), azul (<i>H. fulgens</i>), negro (<i>H. cracherodii</i>), pinto/rayado (<i>H. kamtschatkana</i>) y chino (<i>H. sorenseni</i>). (B) Muestra control y de productos enlatados CN: control negativo, lapa; M: muestra problema. (C) Muestra control abulón rojo, las muestras de producto enlatado: lapa, CN1 y CN2; muestras enlatadas problema, M1: Mar C&B abulón ENS BC y M2: El Rosarito abulón BCS. 35	

10. Curvas de disociación de alta resolución (HRM) para la identificación de organismos híbridos RAm (Rojo x Amarillo) y RAz (Rojo x Azul): (A) Amarillo (*H. corrugata*). (B) Rojo (*H. rufescens*). (C) Azul (*H. fulgens*)..... 36
11. Patrones de amplificación por PCR de marcadores monolocus (Mml) para la identificación de especies de abulones del Pacífico Nororiental. (A – D) son marcadores reportados (Tabla 3). (E) Marcador diseñado en este trabajo a partir de secuencias del gen *Verl* reportadas en el banco de datos genéticos GenBank. AR: Rojo (*H. rufescens*), AM: amarillo (*H. corrugata*), AZ: azul (*H. fulgens*), AN: negro (*H. cracherodii*), HK: pinto/rayado (*H. kamtschatkana*) y HS: chino (*H. sorenseni*). E: Escalera de 100 pb (Promega). 38
12. Marcadores monolocus (Mml) *Verl3* e *IDHv5* para la identificación de abulones híbridos. AM: amarillo (*H. corrugata*), AZ: azul (*H. fulgens*), AR: rojo (*H. rufescens*); RAz: híbrido Rojo x Azul; híbrido RAm: Rojo x Amarillo. E: escalera de 100 pb (Promega, G210A). 38
13. Estimación del coeficiente de parentesco con “kinship” en GenoDive con 11,152 marcadores SNP. (A) Mapa de calor de la matriz de parentesco de los 91 individuos estudiados y su árbol a la izquierda. (B) Mapa de calor de la matriz de parentesco entre 13 individuos de la localidad de FSJ y su árbol a la izquierda..... 41
14. Dirección de migración relativa de las localidades analizadas de abulón negro. Estimada con *divMigrate* en R con 11,152 SNP, empleando como distancia genética G_{ST} , sin filtro como umbral. La dirección y espesor de las flechas indican los niveles relativos de migración pareado, donde una mayor intensidad del color de las flechas indica un mayor flujo entre las localidades que están en círculos. Las localidades de norte a sur son: CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada B.C.; PCS: Puerto Canoas y FSJ: Faro San José en San Quintín B. C. 42
15. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para las nueve localidades estudiadas de abulón negro con 11,152 SNP en 91 individuos, con 30 componentes retenidos y dos funciones discriminantes. Las localidades de norte a sur son: CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC.; PCS: Puerto Canoas y FSJ: Faro San José en San Quintín BC..... 44
16. Estimación del número más probable de grupos con *Structure* harvester para nueve localidades de abulón negro con 11,152 SNP en 91 individuos. A: Logaritmo de probabilidad media ($\ln P[k]$) y B: Delta k (Δk)..... 45
17. Estructura genética de 91 individuos de abulón negro procedentes de nueve localidades con 11,152 SNP empleando K de 1 a 9, en la figura solo se muestra de k 2 a 5. Donde cada color corresponde a un componente o grupo genético. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC.; PCS: Puerto Canoas y FSJ: Faro San José en San Quintín BC.45
18. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para el panel Atípicos (24SNP). A: Representación 2D (LD1 y LD2) con agrupaciones señaladas con hélices; B: Representación 3D (LD1, LD2 y LD3); C: Probabilidad de pertenencia de cada individuo a cada especie. Los puntos representan cada individuo con diferente color por especie: rojo (*H. rufescens*), amarillo (*H. corrugata*), azul (*H. fulgens*), negro (*H. cracherodii*) y rayado/pinto (*H. kamtschatkana*). 70

19. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para el panel de Alelos Privados (66SNP). A: Representación 2D (LD1 y LD2); B: Representación 3D (LD1, LD2 y LD3); C: Probabilidad de pertenencia de cada individuo a cada especie. Los puntos representan cada individuo con diferente color por especie: rojo (*H. rufescens*), amarillo (*H. corrugata*), azul (*H. fulgens*), negro (*H. cracherodii*) y rayado/pinto (*H. kamtschatkana*). 70
20. Curvas de disociación de alta resolución (HRM) para la identificación de seis especies de abulón del PNO. Curvas individuales en las muestras control del panel 10 SNP para HRM. Abulón rojo AR (*H. rufescens*), amarillo AM (*H. corrugata*), azul AZ (*H. fulgens*), negro AN (*H. cracherodii*), pinto/rayado HK (*H. kamtschatkana*) y chino ch (*H. sorenseni*). 71
21. Fotos y descripción completa de muestras enlatadas para su identificación con HRM. La muestra control de abulón azul enlatado CP1 no presentó amplificación, al igual que las otras muestras control CP2, CP3, CP4, pero se agregó para visualizar el callo..... 71
22. Estimación del coeficiente de parentesco “kinship” en GenoDive con 11,152 SNP. Mapa de calor de la matriz de parentesco entre los 91 individuos para el resto de las localidades. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC. y PCS: Puerto Canoas en San Quintín BC. 72
23. Significancia de la red de migración relativa entre las localidades de abulón negro analizadas con 11,152 SNP. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC.; PCS: Puerto Canoas y FSJ: Faro San José en San Quintín BC. 73
24. Gráfica de la distribución poblacional basada en la primera función discriminante del DAPC (A) y el Valor del criterio de información bayesiano (BIC) por el número de grupos (B), en el análisis poblacional del abulón negro con 11,152 SNP, 91 individuos y nueve localidades. 74
25. Probabilidad posterior de pertenecer de cada individuo a la población predeterminada a partir del resultado de DAPC (Figura 15 y Figura 24) en 91 individuos con 11,152 SNP. Se retuvieron 30 componentes principales y dos funciones discriminantes. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC.; PCS: Puerto Canoas y FSJ: Faro San José en San Quintín BC. 74
26. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para siete localidades estudiadas de abulón negro con 11,152 SNP en 73 individuos, con 30 componentes retenidos y dos funciones discriminantes. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC. 75
27. Análisis de estructura genética sin las localidades sureñas en 73 individuos de abulón negro de siete localidades con 11,152 SNP. A: Número más probable de k sugerida por Δk de acuerdo con la prueba de Evanno et al., (2005). B: Probabilidad de pertenencia de cada individuo para tres grupos. C: Estructura genética con k2 y k3. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC. 76

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Especies de abulones, estado de conservación y número de individuos analizados para la identificación de especies del PNO.	18
2. Muestras de productos procesados para el análisis de marcadores monolocus (Mml) y SNP con HRM.....	22
3. Oligonucleótidos de los diferentes genes reportados evaluados en los abulones del PNO....	23
4. Procedencia de las muestras de abulón negro para el análisis poblacional. Sitio, abreviatura para identificar el sitio, año de muestreo, tamaño de muestras procesadas y el número de muestras empleadas en el análisis poblacional.	24
5. Valores de F_{ST} globales en pares usando el panel Total de SNP (arriba de la diagonal) y el panel de Atípicos (bajo la diagonal) para las cinco especies de <i>Haliotis</i> (IC 95% se muestran en paréntesis).....	31
6. Sensibilidad (S) y Especificidad (E) para los tres paneles de marcadores SNP desarrollados con las cinco especies de <i>Haliotis</i> del Pacífico Nororiental.	33
7. Estadísticos de diversidad genética del abulón negro para nueve sitios a lo largo de su distribución con 11,152 SNP.	40
8. Valores de F_{ST} en pares para las nueve localidades analizadas de abulón negro con 11,152 SNP en 91 individuos (arriba de la diagonal) y sus valores p de significancia (debajo de la diagonal).	43
9. Porcentaje de pertenencia para $K=5$ del análisis de STRUCTURE. n: número de individuos por sitio. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC.; PCS: Puerto Canoas y FSJ: Faro San José en San Quintín BC.....	44
10. Parámetros seleccionados para el análisis DAPC y número de grupos extraídos (k) para los tres paneles Total, Atípicos y Alelos Privados.	69
11. Número de individuos de las cinco especies de <i>Haliotis</i> asignadas en grupos DAPC, empleando las dos primeras funciones lineales discriminantes para los tres paneles de SNP.	69
12. Valores de F_{ST} en pares para siete localidades de abulón negro con 11,152 SNP en 73 individuos (arriba de la diagonal) y sus valores p de significancia (debajo de la diagonal).	75
13. Lista de abreviaturas.	77

Capítulo 1. Introducción

Los abulones son moluscos gasterópodos pertenecientes al género *Haliotis*, presentan una concha ovalada de superficie convexa. Dependiendo de la especie pueden presentar distintas características morfológicas, tanto en su concha: como número de poros respiratorios abiertos, coloración, rugosidad y tamaño, como en su tejido blando: color y características del manto y epipodios. El pie lo usa para su movilidad y adhesión al sustrato. Los epipodios son tentáculos sensoriales alrededor del manto que les permiten encontrar su alimento. Los abulones se encuentran asociados a bosques de macroalgas en sustratos rocosos, son herbívoros bentónicos y sedentarios (Cox Keith W., 1962; Rogers-Bennett et al., 2011).

A nivel mundial se han descrito alrededor de 75 a 130 especies y subespecies, en el Pacífico Nororiental (PNO) se encuentran distribuidas a diferentes profundidades siete especies de abulón, amarillo (*Haliotis corrugata*), azul (*H. fulgens*), chino (*H. sorenseni*), negro (*H. cracherodii*), plano (*H. walallensis*), rojo (*H. rufescens*), pinto/rayado (*H. kamtschatkana*) (Figura 1); mientras que en México, podemos encontrar en la costa este e islas de la península de Baja California (PBC), la presencia de seis especies de abulón siendo el abulón plano la única ausente (Cox Keith W., 1962; Geiger & Owen, 2012; NOAA, 2023). Las especies presentes en California hibridan de manera natural, ya que comparten hábitat entre ellas, aunque se ha reportado en una muy baja incidencia (Cox Keith W., 1962).

1.1 Escenario actual de la producción de abulón en México

Dentro de los alimentos de origen marino el abulón o la oreja de mar como se conoce en algunos países, es codiciado internacionalmente por su deliciosa carne (pie) y su concha. La producción global en 2018 fue de 187,360 toneladas (t) por acuicultura, siendo los principales productores China y Corea (87% y 10%, respectivamente), seguidos de Sudáfrica, Chile y Australia (con el 3% de la producción combinada restante). Mientras que de la producción global por pesca se reportó solo 5,613 t, donde Australia es el único país que mantiene una gran producción basada en pesca (56%), seguida de Japón (23.1%), Nueva Zelanda (11.4%) y México (9.5%) (FAO, 2020).

De las seis especies de abulón que se distribuyen en México, cinco están dentro de la norma oficial mexicana NOM-005-PESC-1993 para su explotación comercial (amarillo, azul, negro, rojo y chino) y su

producción oscila entre 270-500 t en los últimos años (CONAPESCA, 2017; Secretaría de Pesca, 1987; SEPESCABC, 2018).

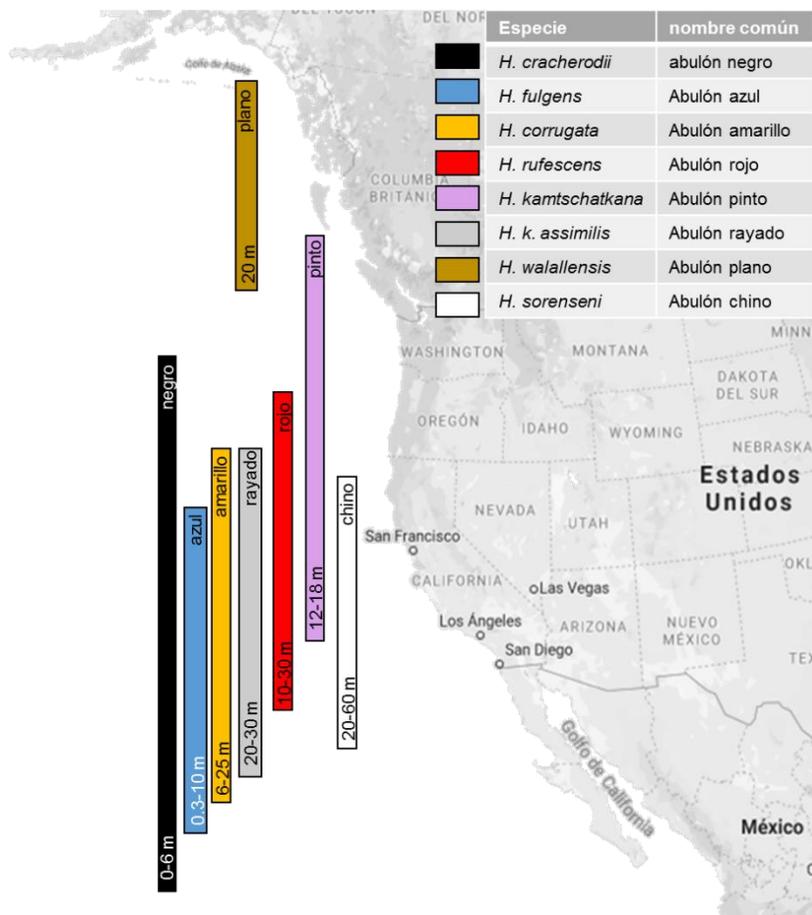


Figura 1. Distribución geográfica y batimétrica de las especies de abulón del Pacífico Nororiental (PNO). Distribución a lo largo de la línea de costa en barras y su profundidad en metros, especies y nombre común en la tabla insertada (basado en Cox Keith W., 1962; Geiger & Owen, 2012).

De las seis especies de abulón que se distribuyen en México, cinco están dentro de la norma oficial mexicana NOM-005-PESC-1993 para su explotación comercial (amarillo, azul, negro, rojo y chino) y su producción oscila entre 270-500 t en los últimos años (CONAPESCA, 2017; Secretaría de Pesca, 1987; SEPESCABC, 2018). Caben mencionar que la producción de abulón está compuesta principalmente por dos especies, abulón azul y amarillo (70.8% y 28.9%, respectivamente) y en un menor porcentaje por las otras tres especies (negro, rojo y chino) (Figura 2) (CONAPESCA, 2020; INAPESCA, 2018). Además, se tiene una producción por acuicultura de abulón rojo que oscila entre 20-50 t por año en sistemas terrestres (21 t en 2018) (FAO, 2020). Y en años recientes, el cultivo de abulón azul está siendo escalado de piloto a comercial (8 t en 2022 y se esperan 17 t en 2023; Domingo Aguilar, comm. pers., 2023). El recurso abulón se

comercializa principalmente como producto enlatado (90%) y en una menor proporción como productos frescos o congelados al mercado asiático y americano (CONAPESCA, 2020; SEPESCABC, 2018). Esta producción tiene un valor de \$10,749 millones de dólares (CONAPESCA, 2017).

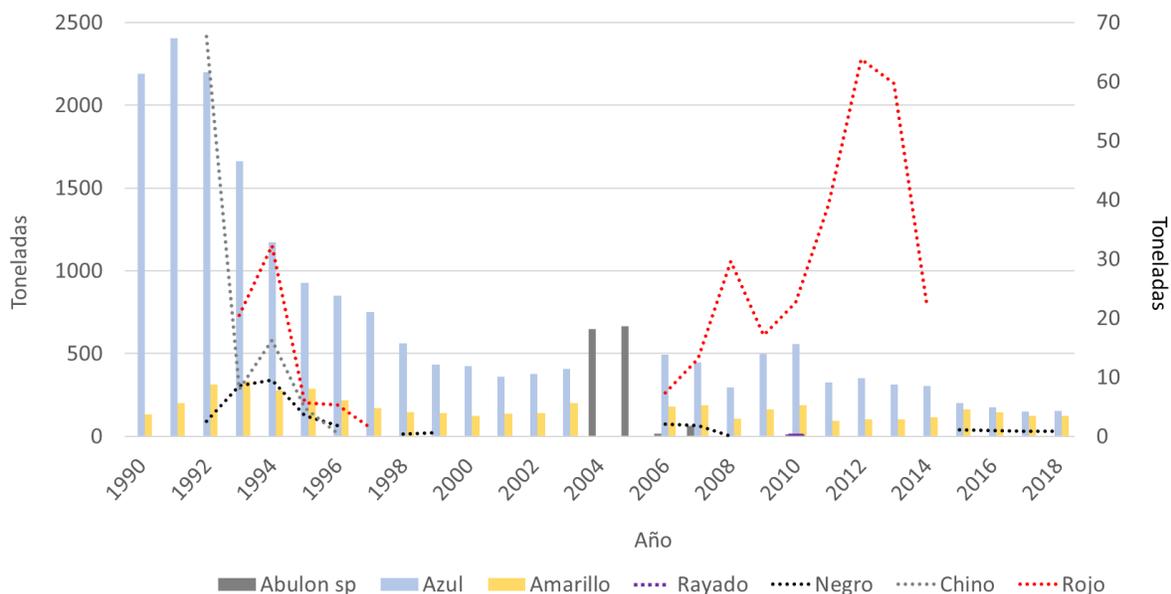


Figura 2. Producción histórica de abulón, por especie, en México desde 1990 hasta 2018. Fuente de datos de CONAPESCA, 2020. En el eje principal se encuentran la producción de abulón amarillo (*H. corrugata*), azul (*H. fulgens*) y abulones sin identificar como Abulones sp. en barras apiladas; mientras que en el eje secundario en líneas punteadas corresponde para los abulones negro (*H. cracherodii*) en color negro, chino (*H. sorenseni*) en gris, rojo (*H. rufescens*) en rojo y pinto/rayado (*H. kamtschatkana*) en lila.

La pesca solo se hace a través de cooperativas pesqueras y sociedades de producción rural con permisos o concesiones vigentes expedidas por la autoridad competente CONAPESCA, considerando cuotas de captura, tamaños mínimos, vedas estacionales, entre otras medidas establecidas en la norma oficial NOM-005-PESC-1993 (Diario Oficial de la Federación, DOF, 1994; Sierra-Rodríguez et al., 2006) para proteger el recurso. No obstante, en los últimos 30 años se ha observado una disminución en la producción de abulón, posiblemente como resultado de la disminución de las poblaciones naturales a consecuencia de la sobre pesca, mortalidades masivas por enfermedades y/o acontecimientos ambientales (Cook, 2014; NOAA, 2023; Searcy-Bernal et al., 2010). Además, existe pesca ilegal o no reportada, la cual se estima se extraen ilegalmente entre el 20-27% de la pesca comercial legal anual (Ponce-Díaz et al., 2013; Searcy-Bernal et al., 2010).

Las principales especies capturadas ilegalmente son el abulón azul (89%), y en menor medida, amarillo y negro (Zamora-García, 2016). Pero, por su fácil acceso al encontrarse en el intermareal y submareal, históricamente la especie más amenazada ha sido el abulón negro, al grado que dejó de observarse en la costa continental de la PBC en los años 90s. Mientras que, el abulón rojo y chino se encuentran a mayores profundidades y en densidades más bajas que las otras especies y, en consecuencia, la pesca ilegal de estas dos especies es probablemente menor (CONAPESCA, 2020; Geiger & Owen, 2012; Searcy-Bernal et al., 2010).

En México ninguna de las cinco especies de abulón de interés comercial (amarillo, azul, negro, rojo y chino) está catalogada con algún estatus de conservación o riesgo, favoreciendo su explotación sin control y con ello al comercio ilegal. Sin embargo, todas ellas han sido catalogadas como *en peligro crítico* (CR, *critically endangered*) o *en peligro* (ED, *endangered*) en la *Lista Roja de Especies Amenazadas* de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2023). Además, el abulón pinto/rayado se encuentra enlistado en el *Acta de Especies en Riesgo* (*Species at Risk Act*) (DFO Fisheries and Oceans Canada, 2020), y los abulones chino y negro están enlistados en el *Acta de Especies en Peligro de Extinción* (*Endangered Species Act, ESA*) desde el 2001 y el 2009, respectivamente; por lo que está prohibida su pesca o comercialización en Estados Unidos (NMFS, 2021; NOAA, 2023). No obstante, la producción de abulón en ese país ha disminuido de 250 t a 154 t, y no es suficiente para satisfacer la demanda interna, especialmente de California donde existe un sector de consumidores de origen asiático importante (Cook, 2014; FAO, 2020). Como resultado, este país se ha convertido en un importante mercado del producto abulón mexicano.

1.2 Sustitución de alimentos de origen pesquero

La sustitución de alimentos es un factor que contribuye a la pesca ilegal y representa un problema para el manejo sustentable y comercialización de productos pesqueros con gran impacto en la economía de productores, consumidores y a la preservación de la biodiversidad de los océanos (Oceana, 2019). En México se reportó que el 31% de los productos del mar no corresponden a lo que dicen vender en pescaderías, restaurantes y supermercados. Siendo las pescaderías el principal lugar donde existe sustitución de productos y además se registró que el 11.2 % de los productos analizados correspondían a 13 especies amenazadas (Oceana, 2019).

Los abulones, cuyo principal producto es el músculo del pie, se exportan principalmente enlatados (90%) y desconchados (CONAPESCA, 2017). Por lo cual, pierden sus rasgos morfológicos característicos, lo que dificulta la identificación de la especie y facilita el fraude alimentario (Aguilera-Muñoz et al., 2008; Aranceta-Garza et al., 2011; Olsen & Borit, 2018). Una práctica de fraude comúnmente encontrado en el comercio de abulón es la sustitución de especies o la adición de especies de menor valor. En este último caso, se ha reportado la presencia del recurso la lapa gigante (*Megathura crenulata*) (Aguilera-Muñoz et al., 2008; Aranceta-Garza et al., 2011) y el loco chileno (*Concholepas conchoepas*) (Aguilera-Muñoz et al., 2008) en productos enlatados como abulón.

Otro problema es que el abulón enlatado no incluye el nombre científico en la etiqueta. Por lo tanto, las especies en estado de preocupación para la conservación, como los abulones negro, chino y pinto/rayado, pueden ser comercializados sin declararse en los Estados Unidos o en los mercados internacionales. Por lo que, para proteger a las especies de abulón en peligro de extinción y los intereses de los consumidores (tanto monetariamente como en términos de salud), preservar la reputación de los abuloneros mexicanos y mantener una producción sustentable de este recurso crítico para la pesca y la acuicultura, es esencial fomentar la legalidad de los productos por medio de la identificación de especies y su rastreabilidad. Es decir, promover la trazabilidad del producto abulón mediante el desarrollo de un método rápido y preciso para identificar las especies de abulón en productos fresco-congelados y procesados (ej. enlatado salmuera).

1.3 Trazabilidad de alimentos

La trazabilidad es la capacidad de poder acceder a cualquier o toda la información relacionada con lo que está a consideración, a lo largo de todo su ciclo de vida, mediante identificaciones registradas (Olsen & Borit, 2018). La trazabilidad de acuerdo con el Codex Alimentario (*The Codex Alimentarius Commission Procedural Manual*; FAO/WHO, 1997) se define como “la capacidad de seguir el movimiento de un alimento a través de etapas específicas de producción, procesamiento y distribución” (Olsen & Borit, 2013). Por lo que la trazabilidad de los alimentos permite al consumidor conocer el paso de su producto por toda la cadena formal de suministro y tener la certeza de la autenticidad de los alimentos que está comprando, por medio de la información en las etiquetas (FAO y OMS, 2007; Vandenhoute & Jérôme, 2016).

En los últimos años la demanda internacional por productos pesqueros certificados ha crecido. Por lo cual, se ha hecho requisito esencial para su comercialización que las etiquetas indiquen el nombre científico de los organismos que los constituyen y que la información descriptiva en ellas no debe ser falsa o engañosa (FAO y OMS, 2007; Ríos Jara et al., 2007; Secretaría de Pesca, 1987). Un producto mal etiquetado puede llevar a causar un daño en aquellos consumidores sensibles a ciertos alimentos o cometer fraude al vender productos de especies con altos precios comerciales (Olsen & Borit, 2018), como los abulones y sustituirlos de manera parcial o total por otras especies de menor costo, como las lapas. Es por ello, que la necesidad de la verificación de las normas de etiquetado es un aspecto crucial para los consumidores, los productores y las autoridades.

Un reto adicional es que no siempre es posible hacer una identificación de especies por criterios morfológicos, sobre todo en especies fenotípicamente parecidas (crípticas) o aquellos organismos híbridos, como sucede con los abulones (Cox Keith W., 1962), aunado que se comercializa mayormente sin sus atributos que facilitan su identificación. En consecuencia, la identificación correcta de las especies es indispensable en productos enlatados y, por lo tanto, el desarrollo de métodos minuciosos con alta sensibilidad y especificidad para impulsar la trazabilidad y el buen manejo de los recursos pesquero y acuícolas.

1.4 Antecedentes

1.4.1 Marcadores moleculares y la identificación de especies en abulones del PNO

En las últimas décadas la genómica ha experimentado un notable avance para el descubrimiento y caracterización de marcadores moleculares con una amplia variedad de aplicaciones en diversas áreas de la biología, ecología, evolución y la acuicultura. Los marcadores moleculares desempeñan un papel fundamental en la identificación de especies, la asignación de parentesco, la caracterización de variabilidad genética y el análisis forense, entre otras (Arciniega-De Los Santos, 2012; Marini et al., 2012; Nadeem et al., 2018). Los marcadores moleculares son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético, aquellos que su biomolécula diana es el DNA (*Deoxyribonucleic acid*) pueden ser destinados a evaluar el grado de diversidad y estructuración genética en poblaciones naturales y de cultivo tanto en el DNA mitocondrial como el DNA nuclear (Figueras Huerta & Martínez Portela, 2009).

Existen diferentes tipos de marcadores moleculares que se diferencian por sus métodos de obtención, amplificación y secuenciación. Su principal objetivo es permitir la identificación de variantes que permitan discriminar entre los diferentes grupos de estudio (Nadeem et al., 2018). Estos marcadores moleculares se han convertido en herramientas esenciales en la investigación científica, ya que nos brindan la capacidad de analizar y comprender la diversidad genética de las especies, así como establecer relaciones evolutivas y parentesco entre individuos y poblaciones (Bernatchez et al., 2017).

Los marcadores moleculares más informativos, son aquellos que nos permiten observar la acumulación de la variación genética a través de las generaciones en regiones neutrales y no neutrales, incluyendo aquellas adaptativas, a lo largo del genoma (Anderson, 2010). Entre estos, se encuentran los marcadores microsatélites o secuencias sencillas repetidas (SSR: *single sequence repeats*), los Polimorfismos de nucleótido único (SNP: *single nucleotide polymorphisms*) y las secuencias genéticas (Bernatchez et al., 2017; Marsjan & Oldenbroek, 2006). Los marcadores moleculares nos pueden dar diferente información dependiendo de la región del genoma en la que se encuentren (Ogden & Linacre, 2015). En las regiones neutrales reflejan procesos a nivel de amplitud del genoma y responden a procesos demográficos gobernados por las fuerzas evolutivas como la deriva y migración, esto permite analizar la diversidad y estructura genética de las poblaciones, cambios en el tamaño efectivo poblacional, conectividad, y demografía histórica. Por otro lado, aparecen en regiones puntuales del genoma presentando frecuencias alélicas fuera de lo esperado (*outlier*) bajo el modelo neutral (regiones adaptativas) y proporcionan información sobre la variación fenotípica y los procesos de selección que experimenta una población en particular (Ogden & Linacre, 2015). En conjunto este tipo de información, tanto regiones neutrales como adaptativas, es de gran utilidad para identificar la procedencia de individuos de una población en una región específica, aunado a su aplicación para el estudio de la diversidad genética y la comprensión de los procesos evolutivos, permitiéndonos analizar patrones de herencia y adaptación en diferentes especies y poblaciones (Bernatchez et al., 2017; Larraín et al., 2018; Marsjan & Oldenbroek, 2006; Ogden & Linacre, 2015).

Los marcadores más utilizados en la investigación genética han sido los SSR, debido a su alta variabilidad (alto polimorfismo). Sin embargo, su desarrollo requiere un conocimiento previo de las secuencias objetivo y por lo general se necesitan entre 7 y 20 marcadores SSR para llevar a cabo estudios de diversidad genética. Es importante destacar que la genotipificación e interpretación de los resultados puede volverse un reto si los marcadores no están adecuadamente diseñados (Marsjan & Oldenbroek, 2006; Rentería-Alcántara, 2000; Vázquez et al., 2011). Por otra parte, los marcadores SNP permiten identificar la variación en una sola base del genoma, *locus*, lo cual hace necesario el empleo de un gran número de SNP, por lo

menos 100 para tener el poder estadístico para detectar la estructura genética poblacional (Helyar et al., 2011), no obstante, gracias al avance de la tecnología en las plataformas de secuenciación, como la secuenciación masiva de última generación, ahora es posible obtener un gran número de marcadores en estudios genómicos (>1000) y procesar simultáneamente múltiples muestras a un costo reducido (Bernatchez et al., 2017).

En la actualidad, los marcadores SNP se utilizan ampliamente en la identificación de especies, analizando solo una pequeña parte del organismo o producto de una manera rápida y rentable (Larraín et al., 2019; Negrini et al., 2008; Wilson et al., 2018). La técnica RAD-seq (*Restriction-site-associated DNA sequencing*) permite generar miles de SNP a la vez empleando una o más enzimas de restricción, incluso en especies no modelo (Baird et al., 2008; Davey & Blaxter, 2011). Sin embargo, el uso de miles de SNP no es práctico para la aplicación rutinaria en los laboratorios de análisis, ya que no todos los SNP son útiles para la identificación, incluso a nivel especie y, por lo tanto, es conveniente seleccionar aquellos SNP más informativos y tener un número más reducido para analizar (Anderson, 2010; Wilson et al., 2018). De esta manera, se maximiza la eficiencia y se optimiza el análisis genético en los laboratorios, garantizando resultados confiables y relevantes.

En el caso de los abulones del PNO, a nivel género se han llevado a cabo diversos estudios con marcadores moleculares monolocus (Mml) para su identificación de otros gasterópodos (Aguilera-Muñoz et al., 2008; Aranceta-Garza et al., 2011; Arciniega-De Los Santos, 2012; Ha et al., 2011; Vadopalas et al., 2006). Mientras que, a nivel de especie, sólo se ha descrito un marcador molecular basado en el gen de *Lisina* para la identificación del abulón pinto/rayado del resto de las especies que habitan el PNO, mediante la técnica estándar de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Supernault et al., 2010). Otros métodos están basados en la secuenciación de genes nucleares como el gen *Verl* (*vitelline envelope receptor for lysin*) (Supernault et al., 2010; Sweijd et al., 1998) o genes mitocondriales como la subunidad I de la citocromo oxidasa (*COI*) (Gruenthal & Burton, 2005; Metz et al., 1998; Park & Kijima, 2006) y el *16S rDNA* (Chan et al., 2012). Pero, estos métodos no logran discriminar con precisión todas las especies de abulón presentes en el PNO. Además, las técnicas que se emplean son laboriosas y requieren una considerable cantidad de tiempo para obtener y analizar los resultados (Aguilera-Muñoz et al., 2008; Gruenthal & Burton, 2005; Supernault et al., 2010).

Un ejemplo de ello se puede encontrar en el estudio realizado por Gruenthal y Burton (2005), donde por medio de las secuencias de los genes mitocondriales *COI* y *CytB* no les permitieron identificar a dos organismos que no eran abulón chino y que su inserción en el programa de repoblamiento de esta especie

pudo haber generado hibridación involuntaria. Estos organismos pudieron ser detectados porque se emplearon otros marcadores en el estudio (gen nuclear *Verl* y cinco SSR heterólogos), que permitieron su identificación como una especie diferente a la objetivo. No obstante, estos últimos marcadores no siempre pueden asegurar que amplifiquen en especies diferentes a las que fueron diseñados y su estandarización puede llegar a ser muy complicada.

Por otro lado, algunos estudios genómicos con marcadores SNP realizados en los abulones del PNO se han enfocado en estudiar la estructura poblacional, sobre todo en las especies de mayor importancia comercial, como lo son el abulón azul (Gruenthal et al., 2014; Mejía-Ruíz et al., 2020) y amarillo (Mares-Mayagoitia et al., 2021). Así como en la obtención de los genomas ensamblados a partir del análisis de uno o dos individuos (Masonbrink et al., 2019; Orland et al., 2022; C. Purcell et al., 2017). Donde Masonbrink y col. (2019) reportan con 1,784,991 SNP una clara divergencia entre las seis especies de abulones en California, de interés en este trabajo (abulón amarillo, azul, chino, pinto/rayado, negro y rojo). Estas diferencias genéticas fueron reportadas previamente con el gen parcial de *hemocianina* y *lisina* (empleando secuencias proteicas y genéticas), donde se logró discriminar cuatro de estas especies (abulón amarillo, azul, negro y rojo) en un grupo monofilético diferente a los abulones de Europa, Sudáfrica, Australia, Taiwán y Japón (Streit et al., 2006).

Pero ningún trabajo ha reportado marcadores monolocus o SNP con alto poder discriminante o algún método factible para la rápida identificación de las seis especies de abulón del PNO, sobre todo aquellas que es indispensable proteger, como lo es el abulón negro que es la especie más amenazada. Con el fin de lograr este objetivo, es posible utilizar la secuenciación RAD-seq para detectar un gran número de marcadores SNP homólogos que logren discriminar entre las diferentes especies de abulones del PNO con distribución en México. Además, al integrar el mayor número posible de especies y organismos en el estudio, se puede asegurar la detección de una amplia variedad y número de marcadores SNP. A partir de esta diversidad, es posible seleccionar un panel reducido de SNP que posean un mayor poder discriminante entre las especies de abulones.

1.4.2 Análisis de curvas de disociación (HRM)

Una vez que se han identificado los SNP de interés, ya sea mediante la selección de paneles reducidos o aquellos que son más informativos para el interés de la investigación, existe una alternativa para genotipificarlos utilizando el análisis de HRM (*High resolution melting*) (Liew et al., 2004). El principio de

esta técnica se basa en la disociación de las hebras de DNA al ir incrementando la temperatura a un fragmento amplificado por PCR o amplicón, que preferentemente debe tener una longitud menor a 300 pb (Verrez-Bagnis et al., 2018). Para el análisis es necesario añadir un colorante fluorescente altamente afín a la doble hebra (dsDNA), que permite detectar la temperatura a la que se van disociando las hebras hasta quedar en dos hebras de cadena sencilla (ssDNA), por lo que a mayor temperatura menor será la fluorescencia (Ririe et al., 1997). Cuando las hebras que se alinean perfectamente (homodúplex) tienen una temperatura media de disociación diferente de aquellas hebras que presentan una variante en la alineación (heterodúplex). Esa variante provoca que el alineamiento entre las hebras sea menos estable y tenga una temperatura de disociación menor que las homodúplex, que es detectada por la disociación del colorante a una determinada temperatura (Chagné, 2015).

Equipos de PCR en tiempo real o PCR cuantitativo (qPCR) permiten realizar y analizar este tipo de datos. Donde se normalizan los datos y se cuantifica la variación en la intensidad de fluorescencia en los productos de PCR permitiéndonos conocer su genotipo o la presencia del SNP que deseamos (Figura 3).

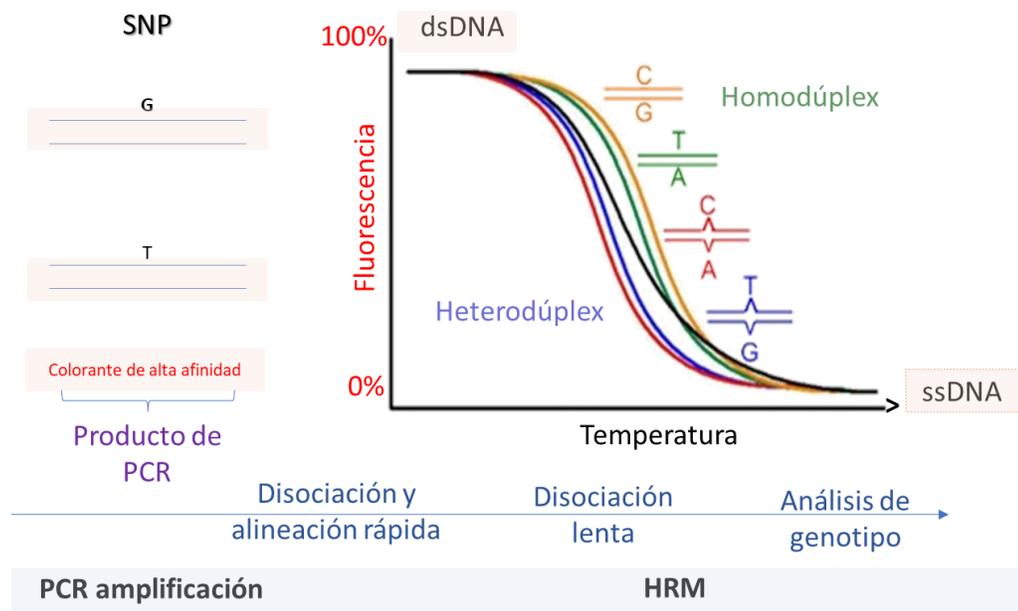


Figura 3. Principio de la técnica de *High Resolution Melting* (HRM). A partir de un amplicón al terminar la PCR se incrementa la temperatura para que ese amplicón de doble hebra(dsDNA) se separe (disocie) hasta llegar a dos hebras de cadena sencilla (ssDNA) y pueda ser detectado el tipo de SNP (homodúplex o heterodúplex) por la diferencia en la fluorescencia.

Esta técnica se ha usado con éxito en la identificación de especies en una amplia variedad de productos alimenticios (Buglione et al., 2020; Druml & Cichna-Markl, 2014; Quintrel et al., 2021), y presenta ventajas

respecto a otras técnicas en sensibilidad, costos y tiempo de obtención de resultados (sólo 1.5 h) (Verrez-Bagnis et al., 2018), e incluso tiempo de estandarización de técnica entre laboratorios. Esto la hace más atractiva para su aplicación que las técnicas convencionales en la industria de alimentos (que emplean Mml y por lo general dirigidos a genes mitocondriales). Teniendo además como reto que no siempre la muestra a identificar es de la mejor calidad e integridad, como sucede en los productos enlatados, por lo que el empleo de marcadores de alto peso molecular termina siendo inadecuado.

El análisis por HRM nos permite simplificar la detección de la presencia o no de los SNP y con ello la información para la que fueron seleccionados. Como puede ser la identificación de especies, el origen o procedencia de la muestra o algún atributo fenotípico de interés.

1.4.3 Estudios genómicos poblacionales de abulón

En México, las especies más estudiadas debido a su interés comercial y a sus densidades son el abulón amarillo y el abulón azul. Recientemente, se han identificado marcadores SNP neutrales para estas dos especies, los cuales revelan patrones distintivos de estructura genética que no concuerdan con las zonas de captura en la PBC (Mares-Mayagoitia et al., 2021; Mejía-Ruiz et al., 2020). En el caso del abulón rojo, los reportes que existen son de pocas localidades silvestres en México y Estados Unidos (Córdova-Secundino, 2018). Mediante marcadores SSR se ha determinado que existe una pérdida de diversidad genética, bajo flujo de migración y estructura genética entre estas localidades. Sin embargo, es necesario llevar a cabo evaluaciones con marcadores genéticos de alta resolución como los SNP a lo largo de la distribución de la especie, ya que no se ha reportado estructura genética con diferentes tipos de marcadores en localidades de California en esta especie (Gruenthal, 2007).

La captura de abulón pinto/rayado es baja, sólo existe un registro de su producción en 2014, pese a que no se encuentra dentro la Carta Nacional Pesquera (CONAPESCA, 2020; Sierra-Rodríguez et al., 2006) y se desconoce el estado genético de las poblaciones silvestres en la PBC, al igual que del abulón chino, por su baja densidad en los bancos naturales (CONAPESCA, 2020; NOAA, 2023; Sierra-Rodríguez et al., 2006). Por otra parte, respecto al abulón chino, su pesca es legal (Secretaría de Pesca, 1987) aunque hoy en día es raro encontrar ejemplares en la naturaleza (comentario por pescadores) y se han registrado capturas esporádicas en los años 90s y en 2014 (CONAPESCA, 2020; Sierra-Rodríguez et al., 2006) (Figura 2). En California, EUA está prohibida su pesca desde 1997 y a pesar de que se están realizando tareas de recuperación, las poblaciones naturales siguen en descenso (Stierhoff et al., 2012). En un estudio Hawk y

Geller (2019) observaron la misma diversidad de haplotipos con secuencias del gen *COI* en muestras de conchas históricas de 1940-80 y recientes del 2000-08 en California, mientras que la diversidad de las muestras históricas de México fue menor a la observada en las muestras históricas de EUA. Generando la idea de que es probable que y las poblaciones de abulón chino en México se encuentren más cercanas a la extinción (Hawk & Geller, 2019; Tegner et al., 1996).

Con respecto a la especie más amenazada y susceptible por su distribución batimétrica (intermareal 0-6 m, Figura 1), el abulón negro *H. cracherodii*, en localidades de California, EUA se observó con secuencias del gen *COI*, SSR (heterólogos) y AFLPs, divergencia significativa entre localidades de islas al sur y la costa central de California posiblemente por aislamiento por distancia (Gruenthal & Burton, 2008). Además de una divergencia significativa en localidades de la costa, con dispersión larval restringida y bajo flujo genético, por lo que su recuperación es poco probable a pesar de las restricciones de pesca (Chambers et al., 2006; Gruenthal & Burton, 2008; Hamm & Burton, 2000). Mientras que, en el estudio realizado por Cepeda-Ochoa (2019), con SSR especie-específicos, se encontró estructura genética a lo largo de la distribución de la especie en México. Detectándose tres grupos: 1) dos localidades de California (Beldade et al., 2012), 2) cinco localidades de la costa de la PBC y 3) Isla Guadalupe. Las localidades de la PBC presentaron una dispersión larval bidireccional con un flujo genético significativamente mayor de norte a sur con alta retención local, por lo que la baja densidad poblacional y las condiciones oceanográficas heterogéneas puede estar promoviendo la diferencia genética con California y ligeramente entre ellas, más que por distanciamiento geográfico. Además, se reportaron en todas las localidades de la PBC un alto índice de endogamia, exceso de homocigosis, por lo que muy probable y aún están pasando por un cuello de botella (Cepeda-Ochoa, 2019). Conjuntamente, a lo largo de su distribución en la PBC, en 25 zonas evaluadas, las poblaciones de abulón negro presentaron una densidad de 0 a 0.227 organismos/m² (Ibarra-Macias et al., 2019), muy por debajo de lo requerido para una recuperación natural (0.34 organismos/m²) a lo largo de toda la distribución de la especie (Vanblaricom et al., 2009).

La baja diversidad de esta especie por sobrepesca y mortalidades masivas por enfermedades, debido a su alta susceptibilidad a organismos patógenos presentes en su hábitat (Crosson et al., 2014; Cruz-Flores, 2013; Neuman et al., 2010), la ha dejado aún más susceptible a no poder soportar las constantes presiones que están sobre ella. A pesar que se recolonicen naturalmente localidades donde antes no se observaba al abulón negro, los altos índices de endogamia (Cepeda-Ochoa, 2019; Chambers et al., 2006; Gruenthal & Burton, 2008), nos sugiere que los nuevos descendientes tendrán niveles bajos de diversidad genética, fomentado por el apareamiento entre organismos relacionados y por ende contribuyendo a la endogamia, lo cual puede favorecer a la especie por la transmisión de genes resistentes de los progenitores

sobrevivientes a las nuevas generaciones o ser perjudicial ante más amenazas ambientales (Chambers et al., 2006; Crosson et al., 2014), como futuros eventos Niño (aumento de la temperatura del mar).

Todas las especies de abulón en México están catalogadas como en deterioro, no obstante, se ha observado que las medidas del plan de manejo están funcionando para el abulón amarillo y azul (INAPESCA, 2018). Aun así, es necesario el continuo monitoreo y generación de conocimiento para poder implementar mejores medidas para el resto de las especies y hacer un buen manejo de los recursos de interés económicos y ecológicos y así aspirar a asegurar su permanencia a largo plazo. Además, identificar las poblaciones más vulnerables de una especie, e inferir potenciales efectos de continuar con las medidas actuales de manejo y en su caso poder mantener o mejorarlas para preservar la biodiversidad dentro de los bancos naturales (Valenzuela-Quiñonez, 2016). Ejemplo de ello, es la reciente evaluación del programa de restauración del abulón pinto/rayado al norte de California con marcadores SNP (Dimond et al., 2022) y el estudio realizado por Gruenthal y colaboradores (2014) para el desarrollo y empleo de una herramienta genómica en la recuperación del abulón azul, donde determinaron con 1,206 SNP, que la mejor estrategia para el repoblamiento del abulón azul es la translocación de organismos de un área más poblada a otra de menor o nula densidad de organismos.

Lamentablemente, para el abulón negro no se cuenta con la tecnología para producir semilla para hacer repoblamientos, como sí se hace para el abulón amarillo y azul. Sin embargo, se está considerando nuevamente su captura de manera comercial, ya que se está observando nuevamente la presencia de abulón negro en algunas localidades. Lo que hace necesario conocer su estructura poblacional y diversidad genética entre las localidades a lo largo de la PBC y sobre todo en esas localidades recientemente colonizadas, que apoyen a implementar estrategias de manejo y conservación adecuadas para apoyar a la recuperación de sus bancos naturales a mediano y largo plazo.

1.5 Justificación

México es el país con mayor litoral de América Latina y cuenta con la presencia de seis especies de abulón, algunas de las cuales hibridan de manera natural, representando un gran potencial de recurso para impulsar la producción pesquera y acuícola. Sin embargo, actualmente los bancos naturales se encuentran disminuidos por problemas ambientales, sobrepesca, pesca ilegal y falta de protección. Aunado a lo anterior, el escaso monitoreo de especies y registros en todas las especies de abulón genera un desconocimiento de las densidades y la salud genética de las poblaciones naturales, siendo alarmante en

las especies que se han catalogado en peligro crítico (IUCN, 2023) y de extinción (NMFS, 2021), abulón negro y chino, lo cual puede deberse en gran medida por la falta de herramientas diseñadas a la identificación de este recurso a nivel especie favoreciendo posibles actos ilícitos debido la prohibición de su comercio en EUA, mientras que en México es legal. Por lo que existe una necesidad de poder generar herramientas que permitan identificar a las seis especies de abulón con distribución en México y, que a su vez permitan apoyar la conservación de aquellas especies más susceptibles.

Por lo que en este trabajo se propuso desarrollar marcadores SNP que permitan hacer trazabilidad genómica, al poder identificar a las seis especies de abulón del PNO y seleccionar los marcadores SNP más informativos para generar paneles reducidos de SNP, que hagan factible su uso para pruebas rutinarias. Cuya aplicación tiene un alto potencial ecológico, tecnológico y comercial. Además de hacer un análisis genómico poblacional en diferentes localidades del abulón negro para determinar su estructura poblacional y diversidad genómica. Con ello, contribuir con herramientas que apoyen en la conservación de estas especies, evitar posibles actos ilícitos como sustitución de alimentos y la generación de conocimiento genético para el abulón negro en la PBC (Figura 1).

Por lo anterior, se plantearon una serie de preguntas para tratar de resolver estos retos, que son las siguientes:

¿Cuál es la información genética interespecífica, que comparten las seis especies de abulón del PNO, que nos permitirán desarrollar marcadores SNP con alto poder discriminante para identificar una especie del resto?

¿Cuál es el mejor criterio para la selección de marcadores SNP que formen paneles reducidos y permitan la identificación a nivel especie con un alto poder discriminante? ¿Serán los que se encuentren bajo selección (*outliers*) o aquellos que se han fijado en una especie como resultado de la evolución del género?

¿La metodología propuesta, para la detección de los marcadores SNP por HRM, tendrá un mejor desempeño en la identificación de especies comparada con las técnicas tradicionales usadas (PCR de Mml) actualmente?

¿Será posible la detección de estos marcadores SNP seleccionados en muestras de productos procesados que presentan DNA degradado con fines de trazabilidad genética?

¿Será posible evidenciar el aporte genético de cada parental en organismos híbridos con los marcadores SNP que son capaces de discriminar las diferentes especies del PNO?

Con respecto a las preguntas relacionadas con el abulón negro, que es la especie más amenazada y con mayor distribución geográfica según datos históricos, pero que sufrió eventos de mortalidad que disminuyeron las poblaciones en algunas localidades hasta el 95%, se planteó lo siguiente:

¿Será posible encontrar diversidad y estructura genética entre localidades continentales, que muestran señales de recuperación natural, utilizando marcadores SNP?

¿Será posible encontrar marcadores SNP *outliers* o bajo selección que los caractericen en regiones y nos permitan hacer asignación de origen geográfico?

1.6 Hipótesis

La evolución del género *Haliotis* en el Pacífico Nororiental ha dado lugar a una amplia diversidad genética en sus especies, y estudios de amplitud del genoma denotan una clara divergencia entre la mayoría de las especies de abulón en la región. Entonces, es posible desarrollar, identificar y seleccionar un conjunto reducido de marcadores SNP como herramienta de rápida detección y alto poder discriminante para realizar una discriminación precisa de las seis especies de abulones del Pacífico Nororiental.

Debido a que el abulón negro *H. cracherodii* se encuentra en peligro crítico, ocasionado principalmente por eventos de mortalidad masiva en el pasado, y a que actualmente existen evidencias de recolonización en el sur de su distribución, se espera encontrar bajos niveles de diversidad y una significativa divergencia genética entre poblaciones a lo largo de su distribución geográfica.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivos generales

- ❖ Determinar las diferencias genómicas entre seis especies de abulones del Pacífico Nororiental (PNO) para desarrollar y estandarizar herramientas moleculares factibles para trazabilidad genética, con base en marcadores SNP de alto poder discriminante.
- ❖ Evaluar la diversidad y estructura genética del abulón negro *Haliotis cracherodii* en localidades con signos de recuperación natural, mediante marcadores SNP.

1.7.2 Objetivos específicos

1. Determinar las diferencias genómicas entre seis especies de abulones del PNO para desarrollar un panel de marcadores SNP que permitan discriminar entre ellas.
2. Identificar marcadores SNP con alto poder discriminante entre especies, que puedan ser empleados para su detección mediante una técnica sencilla, rápida y económica (curvas de disociación, HRM).
3. Comparar el desempeño de las técnicas actuales (marcadores monolocus) y la técnica propuesta (HRM con SNP) para certificar las especies de abulón en productos enlatados e identificar híbridos de abulón producidos artificialmente (RAz y RAm).
4. Evaluar la estructura y diversidad genética del abulón negro *H. cracherodii* entre nueve localidades, con marcadores SNP.
5. Determinar si existen marcadores SNP *outliers* que permitan la asignación de origen geográfico entre las localidades de abulón negro *H. cracherodii* estudiadas.

La realización de los objetivos se abordó en tres partes generales como se muestra en la Figura 4 del siguiente capítulo.

Capítulo 2. Metodología

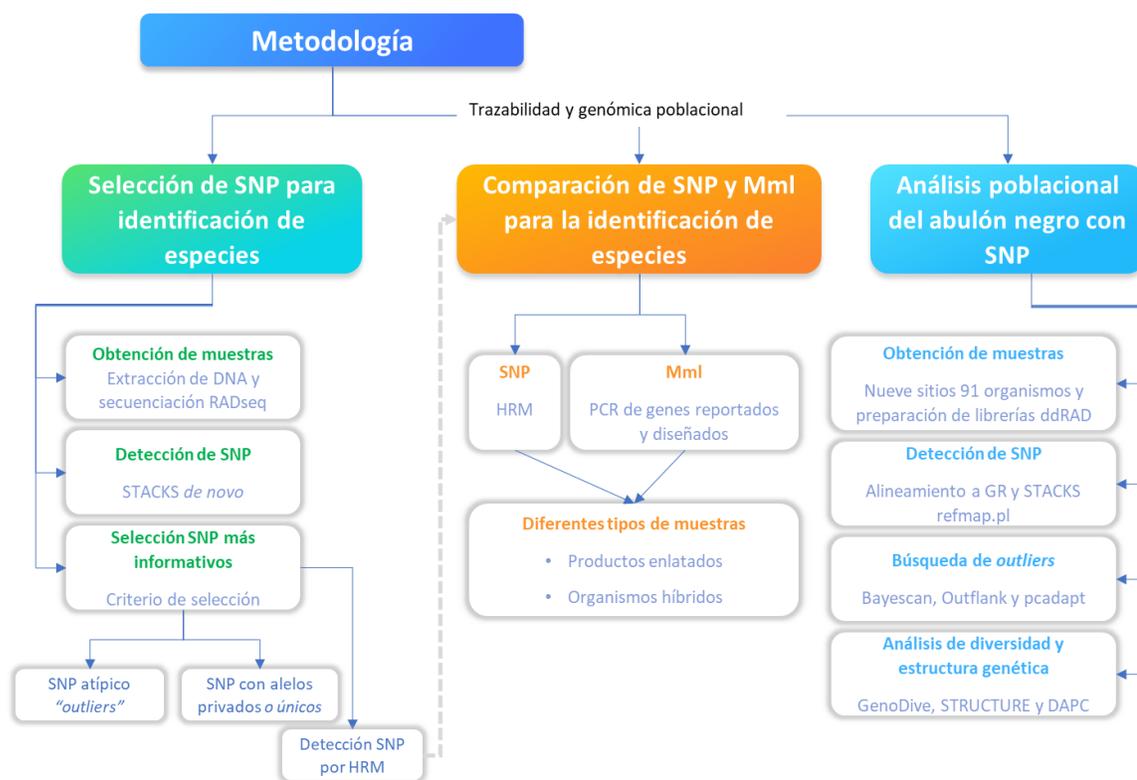


Figura 4. Diagrama de la metodología aplicada.

2.1 Selección de SNP para identificación de especies

2.1.1 Muestras de abulones y extracción de DNA

Para realizar este estudio, se realizó un primer muestreo obteniéndose un total de 231 abulones adultos de más de 90 mm de longitud de concha (Tabla 1), utilizando una técnica no destructiva a partir de tentáculos epipodiales (Slabbert & Roodt-Wilding, 2006). Las muestras fueron almacenadas en etanol al 99 % a -20 °C hasta la extracción del DNA. Los organismos analizados fueron manipulados con cuidado para evitar sobre estresarlos, obedeciendo las normas éticas y se siguieron todas las normas institucionales aplicables para el cuidado de los animales (Moltschaniwskyj et al., 2007). La identificación de las especies se realizó con base en las características morfológicas de concha, pie, manto y epipodio (Geiger & Owen,

2012). Para *H. kamtschatkana*, se han descrito dos subespecies, *H. k. kamtschatkana* (abulón pinto) y *H. k. assimilis* (abulón rayado). No obstante, nueva evidencia indica que los taxones son una sola especie (Owen & Raffety, 2017). Por lo tanto, este estudio de investigación se refiere a esta especie como abulón pinto/rayado (*H. kamtschatkana*).

Tabla 1. Especies de abulones, estado de conservación y número de individuos analizados para la identificación de especies del PNO.

Especie	Nombre común	Cantidad (n)	Localidad	Procedencia ¹	Estado ² NOAA / IUCN
<i>H. corrugata</i>	Abulón amarillo	24	Ensenada y Punta Canoas	Silvestre	P/CR
<i>H. cracherodii</i>	Abulón negro	45	Ensenada	Silvestre	ESA/CR
<i>H. fulgens</i>	Abulón azul	35	Ensenada, Punta Canoas e Isla Guadalupe	Silvestre	P/CR
<i>H. kamtschatkana</i>	Abulón pinto/rayado	13	Ensenada	Silvestre	P/EN
<i>H. rufescens</i>	Abulón rojo	113	Ensenada	Silvestres (12, 10.6%), Cultivo (101, 89.4%)	P/CR
<i>H. sorenseni</i>	Abulón chino	1	Ensenada	Silvestre	ESA/CR
		231	totales		

¹ todos los organismos silvestres fueron obtenidos a través de las cooperativas pesqueras, organismos de cultivo obtenidos de la granja "Abulones Cultivados S. A. de C. V.", ubicada en el Ejido Eréndira, Baja California, México.

² estado de acuerdo con la NOAA, 2023: P= preocupación y ESA = en peligro de extinción en *the Endangered Species Act*, estado de acuerdo con IUCN, 2023: EN = en peligro, CR = en peligro crítico.

Dado que fue difícil encontrar organismos de las seis especies, se realizó un segundo muestreo con el objetivo de aumentar el número de muestras de abulón chino, pero principalmente para abarcar más localidades de abulón negro y poder evaluar si hay diferencia y estructura genética en su distribución geográfica (Figura 1), el detalle de las muestras se describe en el apartado 2.3.1. Sin embargo, para la especie de abulón chino no se logró obtener más organismos, por lo que se agregaron muestras certificadas para abulón chino, pinto (*H. k. kamtschatkana* y rayado *H. k. assimilis*), proporcionadas por el Dr. James Moore del Californian Department of Fish and Wildlife, la Dra. Kristin Aquilino del UC Davis Bodega Bay Marine Laboratory (No incluidas en el análisis, solo para estandarización de la metodología, sección 2.2).

A partir del tejido almacenado, las muestras se procesaron por medio del kit comercial DNAeasy® Blood & Tissue (QIAGEN®, Valencia, CA) o el protocolo de fenol cloroformo (Parimoo & Parimoo, 2003), dependiendo de la disponibilidad de tejido. La calidad y cantidad del material genético se evaluó mediante

las relaciones de absorbancia 260/280 y 230/260 por espectrometría en el equipo NanoDrop™2000 (Thermo Frisher Scientific). Mientras que, su integridad fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Posteriormente, se normalizaron todas las muestras a la misma concentración y se confirmó su concentración por espectrometría con la química del Kit de ensayos de DNAdS Qubit™ BR (Thermo Frisher Scientific) en el equipo Qubit® 3.0 (Thermo Frisher Scientific) a un volumen final de 20 ng/ul.

2.1.2 Secuenciación RAD-seq y detección de SNP

La secuenciación del material genético de las muestras se realizó en dos lotes debido a como se fueron adquiriendo las muestras. Del primer lote de muestras (Tabla 1), una vez normalizadas la concentración del DNA de las muestras fueron enviadas a la empresa Floragenex Inc. (Portland, OR, USA) donde se llevó a cabo la preparación de la biblioteca con la enzima *SbfI* y la secuenciación de los “RAD-tags” “single-end” con el equipo HiSeq2500 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Una vez obtenidas las secuencias (lecturas), se siguió el flujo de trabajo con el programa STACKS v2.5 para el desarrollo y genotificado de los marcadores SNP *de novo* descrito por Catchen et al., (2013).

Todas las lecturas de calidad (Phred 33) se desmultiplexaron, filtraron y recortaron a 75 pb utilizando el módulo “process_radtags” en STACKS. Ocho muestras fueron excluidas del análisis debido al bajo número de lecturas obtenidas. Sólo las muestras con más de 1 millón (M) de lecturas se consideraron para generar los SNP con el módulo “ustacks” y estableciendo los parámetros *-m 6* y *-M 4* (profundidad mínima y número de diferencias máximas permitidas, respectivamente), utilizando el tipo de modelo “snp”. La construcción del catálogo se creó con el módulo “cstacks”, se incluyó dos individuos de cada especie que tuvieran entre 3.3 y 3.5 millones (M) de lecturas de profundidad (10 organismos en total, dado que la especie abulón chino no se incluyó por solo ser un organismo).

El genotificado se realizó utilizando el módulo “sstacks” para obtener un archivo de genotipo en el módulo “populations” en formatos Genepop y VCF. Los supuestos falsos SNP se eliminaron aplicando los siguientes filtros de calidad: a) SNP con un éxito de genotificado inferior al 70% y frecuencia de alelos menores (MAF) inferior al 5% por especie. b) SNP no genotificados en las cinco especies. c) SNP con desviaciones significativas de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en tres o más especies. d) Sólo se mantuvo un SNP bialélico por secuencia RAD “RAD-tag” (Araneda et al., 2016). Se construyó un árbol del vecino más cercano (neighbor-joining, NJ) a partir del formato Genepop como archivo de entrada. El

análisis NJ ilustra las relaciones genéticas de las cinco especies de abulón con la matriz de distancia F_{ST} utilizando POPTREE2 con 10,000 réplicas de arranque (Takezaki et al., 2010).

2.1.3 Selección de los SNP más informativos

La selección de los SNP más informativos para la identificación de especies entre estas cinco especies de abulón (primer lote de muestras) se realizó utilizando dos criterios: a) con Alelo Atípico o bajo selección (outlier): SNP con valores altos del índice de fijación de Wright (F_{ST}), detectando F_{ST} atípicos en cinco corridas de pruebas con FDIST2 (Beaumont y Nichols, 1996), el método se realizó en LOSITAN (Antao et al., 2008) con 1,000,000 de simulaciones, intervalo de confianza (IC) 0.995, tasa de “false discovery” de 0.1 y un tamaño de submuestreo de 50. Sólo se seleccionaron los *loci* con valor F_{ST} por encima del límite superior del IC del 99.5% de distribución F_{ST} y presentes en las cinco corridas LOSITAN para detectar diferenciación entre especies. b) con Alelo Privado: se seleccionaron SNP con alelos privados específicos de la especie, es decir, un alelo fijado en una especie con el alelo alternativo fijado en las otras cuatro especies. Los análisis se realizaron con estos tres paneles de SNP.

El F_{ST} global y pareado entre las especies, junto con los intervalos de confianza del 95%, se estimaron con el panel Total (1,127 SNP), el panel de Atípicos (24 SNP) y el panel de Alelos Privados (66 SNP) mediante bootstrapping utilizando el paquete R *diversity* con 10,000 repeticiones (Keenan et al., 2013). Para los tres paneles de marcadores SNP, se realizó un análisis discriminante de componentes principales (DAPC, por sus siglas en inglés) para agrupar a los individuos genéticamente relacionados en un agrupamiento Bayesiano diferente, libre de suposiciones sobre el equilibrio de Hardy-Weinberg o el desequilibrio de ligamiento (Jombart et al., 2010; Jombart & Ahmed, 2011).

Para los tres paneles evaluados, los individuos fueron reasignados a especies utilizando los criterios de frecuencia de Paetkau D. et al. (1995) con el algoritmo Leave-one-Out (LOO, por sus siglas en inglés), implementado en GeneClass2.0 (Piry et al., 2004). En este método, se considera que los individuos están correctamente asignados si la probabilidad de asignación a su especie es mayor que la probabilidad de ser asignados a cualquier otra especie. El rendimiento de la asignación se evaluó mediante el uso de índices de sensibilidad (S) y especificidad (E). En este caso, la sensibilidad es la capacidad del panel de SNP para identificar correctamente individuos de una especie determinada. Por otro lado, la especificidad es la capacidad del panel de marcadores SNP para excluir correctamente a los individuos que no pertenecen a una especie determinada (Jilberto et al., 2017; Larraín et al., 2014).

2.1.3.1 SNP y su detección por HRM

Una vez obtenido el panel con mayor poder de asignación se diseñaron oligonucleótidos para la detección de los SNP más informativos por medio de HRM. Aquellos con las mejores características fueron sintetizados y probados (secuencias no mostradas, el número de catalogo innova DIID INND00156-2022, patente en preparación). Por último, las combinaciones de oligonucleótidos que representaron los SNP seleccionados fueron los que permitieron una clara identificación entre las especies analizadas.

2.2 Comparación de SNP y Mml para la identificación de especies de abulón

Los marcadores reportados actualmente para la identificación de las especies del PNO, son los genes *Lisina* y *Verl* (Supernault et al., 2010) y el RFLP del gen *COI* (Q. Li et al., 2004). Estos, se compararon mediante su amplificación por PCR con los SNP más informativos para cada especie detectados por HRM y con ello definir la metodología más eficiente que permitiera diferenciar especies de abulón a partir de muestras no destructivas (epipodio), de productos procesados (enlatados) e incluso ver su desempeño con abulones híbridos (RAz = rojo x azul y RAm = rojo x Amarillo) obtenidos artificialmente en laboratorio.

2.2.1 Muestras

Para la parte de comparación entre los Mml y el genotipificado de SNP, se seleccionaron cinco muestras de DNA de cada especie, procedentes de organismos bien identificados morfológicamente, como grupos control para cada especie. Las especies de abulón chino y pinto/rayado se corroboró su correcta asignación por morfología y secuenciación de los genes *COI* y *Verl*, además del uso de muestras certificadas para la estandarización de la metodología. 10 organismos híbridos obtenidos artificialmente en laboratorio, cinco híbridos RAz y cinco híbridos RAm.

Las muestras de productos enlatados de diferentes marcas en el mercado mexicano fueron: dos con etiqueta de “tipo abulón Lapa” (CN1 y CN2), tres latas procedentes de la empresa Litoral de BC, S.P.R. que se tiene certeza que contiene abulón y su especie está descrita en la etiqueta (CP1, CP2, CP3 y CP4), una de ellas contenía dos organismos por lo que se tomó muestra de cada uno (CP3 y CP4), cuatro muestras de productos enlatados que se manejaron a ciegas (M1, M2, M2, M3 y M4), pero que en su etiqueta sugerían contener abulón (Anexo B, Figura 21) que se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Muestras de productos procesados para el análisis de marcadores monolocus (Mml) y SNP con HRM.

Tipo de Muestra	ID	Nombre comercial (marca)	Presentación	Especie en etiqueta	No de organismos	Observaciones
Control negativo	CN1	Fortuna	Enlatado	Lapa sin sp.	Trozos	Marca característica de Lapa (<i>Megathura sp.</i>)
	CN2	Fortuna	Enlatado	Lapa sin sp.	2 y medio	Marca característica de Lapa (<i>Megathura sp.</i>)
Control positivo	CP1	Litoral	Enlatado	<i>H. fulgens</i>	1 y medio	callo característico de abulón
	CP2	Litoral	Enlatado	<i>H. rufescens</i>	medio	callo característico de abulón
	CP3 y CP4	Litoral	Enlatado	<i>H. cracherodii</i>	2	callo característico de abulón
Muestras a ciegas	M1	*	Enlatado	*	*	*
	M2	*	Enlatado	*	*	*
	M3	*	Enlatado	*	*	*
	M4	*	Enlatado	*	*	*

* Las marcas de las muestras a ciegas empleadas en el análisis se encuentran en el Anexo B (Figura 21).

2.2.2 Identificación de especie con Mml

En el estudio realizado por Supernault et al., (2010) se propone como Mml para la identificación de las especies del PNO el gen *Verl* el cual describen que presenta un patrón de bandeo diferente entre ellas. Por otro lado, proponen al gen *lisina* como un buen marcador para ayudar a prevenir la venta ilegal del abulón pinto, ya que permiten discriminar esta especie del resto y además podría ser amplificado en muestras degradadas o productos procesados por ser de bajo peso molecular (63 pb). Considerando esto, en este trabajo, ambos genes fueron evaluados para hacer la identificación de especies entre las seis especies del PNO. Además, la digestión del gen *COI* fue descrita por Park & Kijima (2006) en *H. rubra*, *H. d. hannai*, *H. midae* y *H. rufescens* (abulón rojo, de interés en este estudio), por lo que se evaluó si es útil para la identificación de especies de los abulones de la PBC.

Adicionalmente, empleando las secuencias del gen *Verl* de todos los organismos del género *Haliotis* presentes en el GeneBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>, 2017 termino de búsqueda “Haliotis Verl”), obtenidas dentro del grupo de trabajo del Laboratorio de Genética Acuícola del CICESE y por parte de NOAA Fisheries, Southwest Fisheries Science Center, La Jolla, California por el Dr. John R. Hyde (datos no mostrados), se diseñaron siete pares de oligonucleótidos (artículo en prep.) con la finalidad de ser empleados para identificar a nivel especie por diferencia de tamaño del amplicón y comparar su

eficiencia contra los marcadores SNP informativos detectados por HRM, para discriminar entre las diferentes especies del PNO.

2.2.2.1 Condiciones de amplificación y visualización

Las reacciones de PCR con los Mml previamente reportados (Tabla 3) y con los nuevos marcadores diseñados a partir del gen *Verl* por especie se prepararon para las 10 muestras de abulones híbridos y 10 muestras de productos procesados (Tabla 2.) con dos réplicas técnicas de cada una. Para ello se empleó la enzima Taq Polimerasa (Kapa Biosystems®, 0.5 U) y los reactivos del kit de amplificación de la misma marca: buffer A (1X), dNTPs (0.2 mM), cada oligonucleótido (0.2 µM) y 100 ng totales de DNA a un volumen final de reacción de 10 µl (Tabla 3). Las reacciones de PCR se corrieron en los termocicladores T100 (Bio-Rad) y Veriti® (Applied Biosystems).

Las condiciones de corrida para cada gen se probaron de acuerdo con lo descrito por los autores y algunas de ellas se optimizaron para mejorar el patrón de bandeo. Para los oligonucleótidos diseñados, el ciclo de corrida consistió en: una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, posteriormente 30 ciclos a 94°C por 30 s de desnaturalización, 60°C por 40 s de alineamiento, 72°C por 30 s de extensión; y una extensión final 72°C por 5 min. Al finalizar la PCR los productos amplificados se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con el colorante GelRed (Biotium, Inc. Fremont, CA) y visualizados en un fotodocumentador Gel-Doc® XR+ (Bio-Rad, California EUA).

Tabla 3. Oligonucleótidos de los diferentes genes reportados evaluados en los abulones del PNO.

Gen	Nombre	Secuencia 5'-3'	Autor	Tm (°C)	Modificación
16S	16SAR	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Kessing et al., 1989	40 (10X) y 47 (20X)	56 (30X)
	16SBR	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT			
Verl3	DFOVERL F	TCCAGGGGCATGTGTATTC	Supernault et al., 2010	52	56
	VERL R2	TTGGCTGGAATGCTSTC	Galindo et al., 2003; Supernault et al., 2010		
Lisina	Hkalyex2 F	GAGATCATTGTTCGATGG	Supernault et al., 2010	56	-
	Hkalyex2 R	GAATGGTCCGCCATTAAC			
COI	COIF	TGATCCGGCTTAGTCGGAAGTGC	Metz et al., 1998	55	56
	COIR	GAT GTG TTG AAA TTA CGG TCG GT			

2.2.3 Identificación de especie con SNP

Para la identificación de los SNP seleccionados se utilizó la química comercial kit Fast Evagreen qPCR Master Mix (Biotium, Inc. Fremont, CA) a un volumen final de reacción de 15 ul. Las reacciones de PCR se realizaron en el termociclador de tiempo real Rotor-Gene Q 5plex (QIAGEN®, Valencia, CA). El análisis de la corrida se realizó con el programa Rotor-Gene Q que viene con el equipo.

2.3 Análisis poblacional del abulón negro con SNP

2.3.1 Muestras

Para el análisis poblacional en la especie de abulón negro, que es la más amenazada y que se ha observado un ligero incremento en su densidad en los últimos años (comentario por pescadores; Ibarra-Macias et al., 2019), se obtuvieron muestras de dos sitios en Estados Unidos, donadas por el Dr. John Hyde de NOAA Fisheries, y nueve sitios de la PBC (Tabla 4), su localización puede observarse en el mapa de la Figura 5. Los organismos procedentes de Isla de Cedros e Isla Guadalupe se excluyeron para el análisis poblacional debido al bajo número de individuos que pasaron controles de calidad, descritos en la siguiente sección 2.3.2.

Tabla 4. Procedencia de las muestras de abulón negro para el análisis poblacional. Sitio, abreviatura para identificar el sitio, año de muestreo, tamaño de muestras procesadas y el número de muestras empleadas en el análisis poblacional.

Sitio	ID	Año de muestreo	Tamaño de muestra	Análisis poblacional
Mud Creek, Dana Point Harbor, CA.	CMC	2017	12	5
Isla de San Miguel, CA.	CSM	2008	6	6
Baja Mar, Ensenada, B.C.	BJM	2018	24	10
Isla Todos Santos, Ensenada, B.C.	ITS	2018	12	9
Saldamando, Ensenada, B.C.	SLM	2017	23	13
Punta Banda, Ensenada, B.C.	PBD	2018	18	12
Bahía de Todos los Santos, Ensenada, B.C.	BTS	2017	18	18
Puerto Canoas, San Quintín, B. C.	PCS	2020	5	5
Faro San José, San Quintín, B. C.	FSJ	2021	24	13
Isla de Cedros, B. C.*	ICD	1997	13	x
Isla Guadalupe, B. C.*	IGP	2019	4	x
Total			159	91

*Sitios excluidos del análisis poblacional por bajo número de organismos.

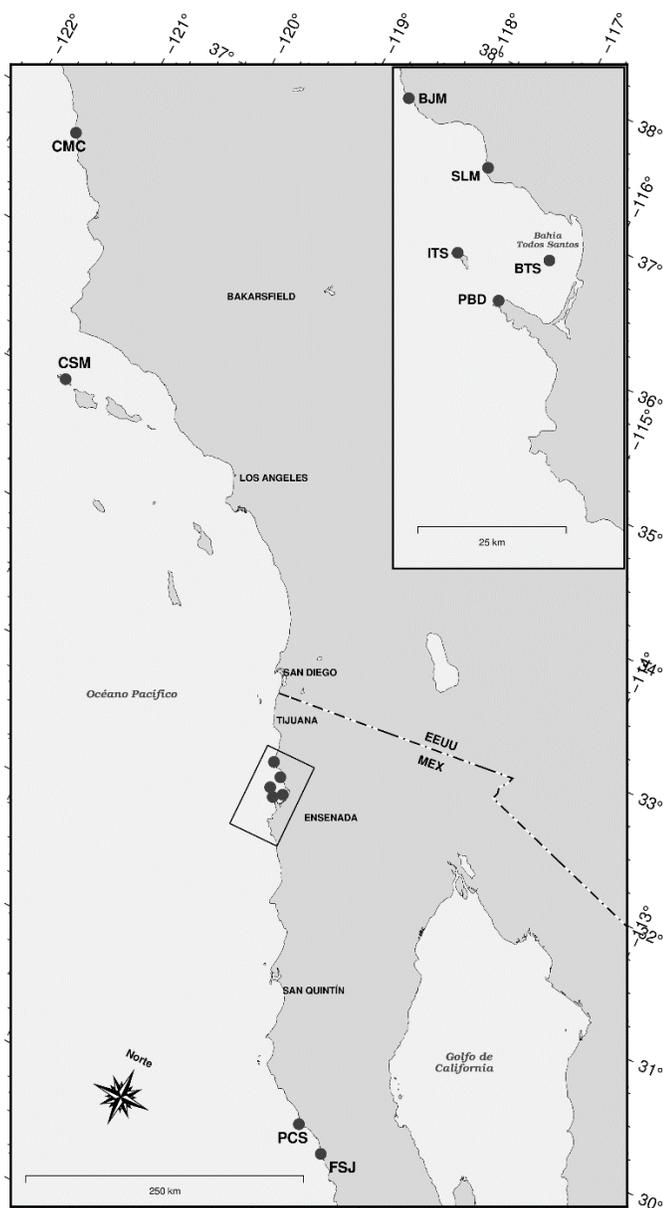


Figura 5. Mapa de la procedencia de las muestras de abulón negro incluidas en el análisis poblacional.

2.3.2 Preparación de librerías ddRAD-seq

Las muestras de abulón negro obtenidas en el segundo lote (Tabla 4) fueron procesadas como se describe en el apartado 2.1.1 para la obtención de su material genético. La preparación de las bibliotecas se realizó de acuerdo con el protocolo de ddRAD-seq (Peterson et al., 2012). Donde, primero se realizó una doble digestión del DNA normalizado con las enzimas de restricción: *EcoRI*-HF (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) y *MspI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). Posteriormente, se ligaron los adaptadores P1

(48-barcodes) y P2 (común) con la ligasa T4 (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). Se elaboraron pools equimolares independientes a partir de cada conjunto 48 barcodes para crear un total de 12 pools, 11 con 47 organismos y uno de 18 individuos (cada pool con una réplica técnica). La distribución de los organismos entre los pools fue al azar para evitar el efecto de *batch*. A cada pool, se le realizó una selección de fragmentos de aproximadamente 500 pb mediante una doble selección con perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, Indianapolis, EUA) con la combinación 0.7X-1.5X. Los fragmentos seleccionados se enriquecieron por PCR y se agregó un índice específico por cada pool. Por último, las librerías finales se conformaron por la combinación equimolar de dos o más pools, y fueron secuenciadas en tres líneas de secuenciación Illumina Hi-Seq X con lecturas “Pair end” de 150 pb (NovoGene, E.S.A.).

2.3.3 Detección de SNP con genoma de referencia para el abulón negro

Los datos de secuenciación mostraron que todas las lecturas presentaron una buena calidad (Phred 30), por lo que se procesaron con STACKS v2.5 siguiendo el flujo de trabajo descrito por Catchen et al., (2013) y Rochette et al., (2017). Las secuencias se desmultiplexaron y eliminaron aquellas lecturas sin etiquetas que no fueron llamadas y aquellas con baja calidad, utilizando el módulo “process_radtags” de STACKS. Se hizo un alineamiento empleando el borrador del genoma de referencia del abulón negro “GCA_GCA_022045235.1” que se encuentra a nivel de “scaffolds” (Orland et al., 2022) con el programa BWA (H. Li & Durbin, 2010) y se eliminaron los alineamientos ambiguos, suplementarios y aquellos no mapeados, para conservar sólo aquellos que se mapearon apropiadamente con un valor de calidad por arriba de phred 30 con el programa SAMtools (H. Li et al., 2009). Para el desarrollo y genotipificado de los marcadores SNP se empleó la opción de *refmap.pl* para la obtención de los SNP en un archivo con formatos Genepop y VCF en STACKS. Se analizó el número de lecturas por individuo y se dejaron sólo aquellos que presentaron una profundidad de más de 0.75 M de lecturas (Tabla 4).

Los marcadores SNP que fueron seleccionados cumplieron con los siguientes filtros de calidad: a) SNP genotipificados en el 80% de los individuos y una frecuencia de alelos menores (MAF) superior al 3% por sitio, b) se retuvo solo un SNP bialélicos por lectura o “RAD-tag”, c) SNP con desviaciones significativas del EHW en menos del 50% de las localidades evaluado con el paquete en R pegas v1.1 (Paradis, 2010) y posterior corrección FDR-BY, d) SNP con menos del 10% de datos faltantes por individuo y por *loci* evaluados con el programa VCFtools v0.1.6 (Danecek et al., 2011) y e) se redujeron los marcadores con el comando *--thin* 500 en VCFtools v0.1.6 (Danecek et al., 2011) para evitar una cercanía entre ellos de menos de 500 pb y se retuvieron aquellos marcadores SNP que no estuvieran ligados con un umbral de r^2 de 0.2

empleando el comando `--indeep-pairwise 100 10 0.2` en el programa PLINK v 1.9 (S. Purcell et al., 2007). Como resultado de la combinación de estos filtros se obtuvo un panel total de 11,152 SNP en 91 individuos genotipificados de un total de 159 muestras (Tabla 4).

Para obtener los archivos en formatos de entrada de acuerdo con cada programa posterior de análisis se emplearon los programas PDGspider (Lischer & Excoffier, 2012), GenoDive (Meirmans, 2020) y VCFtools (Danecek et al., 2011) y PLINK (S. Purcell et al., 2007).

2.1.3. Búsqueda de SNP bajo selección

A partir de los SNP filtrados para abulón negro se buscaron *loci* outliers (candidatos bajo selección), que potencialmente se encuentren bajo selección por condiciones del ambiente. Para ello se emplearon tres programas diferentes: BAYESCAN v.2.1 (Foll & Gaggiotti, 2008), Pcadapt v.4.3.3 (Privé et al., 2020) y OutFLANK (Whitlock & Lotterhos, 2015). El programa BAYESCAN emplea un método bayesiano que identifica a los *loci* bajo selección mediante la estimación de una probabilidad posterior para cada *locus*, calculando los coeficientes de F_{ST} para cada localidad y contrasta dos modelos uno con selección y otro sin selección (Foll, 2012).

Por otra parte, el programa pcadapt v.4.3.3, es un paquete en R que realiza un análisis de componentes principales y calcula los valores de p para detectar marcadores bajo selección, basándose en la correlación entre la variación genética y los primeros componentes principales (K) (Luu et al., 2017). Mientras que, OutFLANK es un paquete en R que usa la probabilidad de la distribución de F_{ST} para los marcadores neutros y con ella asigna valores a cada *locus* para detectar aquellos marcadores bajo selección (Whitlock & Lotterhos, 2015). La detección de estos marcadores candidatos altamente divergentes nos permite identificar marcadores SNP específicos a un sitio o localidad y con ello hacer asignación de origen (Ogden, 2008; Ogden & Linacre, 2015).

2.3.4 Análisis de diversidad y estructura genética en el abulón negro

Para evaluar la diversidad genética entre las localidades se calcularon los estadísticos de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), también el número de alelos (NA), número de alelos efectivos (NAe) y el coeficiente de endogamia (F_{IS}), que estima si hay una desviación del EHW, en el programa GenoDive

(Meirmans, 2020). Esto se realizó para cada *loci* y localidad con los parámetros por omisión, la desviación estándar para cada estadístico fue calculada por “jackknifing over *loci*” y los intervalos de confianza (IC) por “bootstrapping over *loci*” (10,000 iteraciones). Se evaluó la presencia de alelos privados (AP) con el paquete en R poppr v2.9.3 (Kamvar et al., 2014). Por último, la riqueza alélica (RA) se determinó con el paquete en R DiveRsity 1.9.9 (Keenan et al., 2013).

Para el análisis de estructura genética entre las localidades muestreadas de abulón negro, se utilizaron varios enfoques. Por una parte, se calcularon los valores de diferenciación poblacional pareada F_{ST} entre todas las localidades o poblaciones en GenoDive (Meirmans, 2020), utilizando los parámetros por omisión con 999 permutaciones y se determinó la significancia estadística de los valores de probabilidad calculados (*p-valor*) posterior a corrección de Bonferroni.

También, se realizó un análisis de Discriminante de Componentes Principales (DAPC; por sus siglas en inglés) (Jombart et al., 2010; Jombart & Ahmed, 2011) para agrupar a los individuos genéticamente relacionados en un agrupamiento bayesiano diferente. Este análisis está libre de suposiciones sobre el EHW o el desequilibrio de ligamiento (Jombart et al., 2010) en el paquete de R Adegenet v2.1.10 (Jombart et al., 2010) y se empleó la validación cruzada con la función “xvalDapc” en el mismo paquete para seleccionar el número apropiado de componentes principales a retener y evitar un sobreajuste. Posteriormente, el número de clusters o grupos fue evaluado con la función “find.clusters” con el Criterio de Información Bayesiano (BIC) y finalmente, se realizó el DAPC con la función “dapc”. Para inferir el número de clusters y el DAPC se utilizaron el número de componentes retenidos con “xvalDapc”.

Además, mediante el programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), se evaluó el número de grupos genéticos más probable (K) y la probabilidad de que un individuo pertenezca a cada agrupamiento de acuerdo con sus frecuencias alélicas. Cada simulación se ejecutó con un calentamiento de 10,000 iteraciones y 100,000 iteraciones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), con intervalo de K de 1 a 9 con 6 iteraciones, suponiendo que cada localidad es un agrupamiento o población. Los resultados se emplearon para seleccionar la probabilidad de K mediante la prueba de Evanno sugerida por delta K (Δk) y el logaritmo de probabilidad media ($\ln P[K]$) (Evanno et al., 2005) en el programa Structure Harvester Web v0.6.94 (Earl & vonHoldt, 2012). La visualización del resultado de STRUCTURE fue por medio del servidor CLUMPACK (Kopelman et al., 2015).

Por otra parte, se realizaron otros análisis para evaluar el tamaño efectivo de la población (N_e) calculado con el método de desequilibrio de ligamiento con NeEstimator v2.1 (Do et al. 2014). Y el análisis de

parentesco entre las muestras con la función *-relatedness2* en VCFtools v0.1.6 (Danecek et al., 2011) y la relación de parentesco “kinship” basado en la probabilidad relativa de identidad por descendencia de los alelos dentro de cada par de individuos comparados en GenoDive (Meirmans, 2020).

Por último, los niveles de migración relativa direccional entre individuos de las poblaciones a partir de las frecuencias alélicas se evaluaron con el paquete de R *diversity* 1.9.9 (Keenan et al., 2013). Para ello, se empleó la función *divMigrate*, que detecta asimetrías en los patrones de flujo de genes basados en la distancia genéticas G_{ST} , que determina el flujo de alelos entre las localidades a evaluar empleando 1000 iteraciones y sin filtro como umbral (Sundqvist et al., 2016).

Capítulo 3. Resultados

3.1 SNP para la identificación de especies

3.1.1 Secuenciación RAD-seq y detección de SNP

Se obtuvieron con éxito más de 370 millones de lecturas para un total de 261 abulones del primer lote de muestras. En el primer paso del flujo de trabajo de STACKS, se excluyeron ocho muestras (tres rojos, tres negros, un pinto/rayado) por tener menos de 1 millón de lecturas. Debido a que solo se contó con un individuo para el abulón chino, este fue excluido del análisis. La predicción de número de RADtags esperados con SimRAD fue de 21,180, mientras que la media del número obtenido por muestra fue de 27,462 RADtags con STAKCS. El número de posibles marcadores SNP incluidos en el catálogo fue de 150,326 *loci*. Después del filtrado y procesado en STACKS, se redujeron de 2,998 a 1,127 SNP en 223 individuos de las cinco especies de abulón que fueron seleccionados para ser analizados. El árbol NJ basado en la matriz de distancia F_{ST} por pares (Figura 6) reveló cinco grupos, en concordancia con las cinco especies analizadas en el primer lote de muestras (Tabla 1).

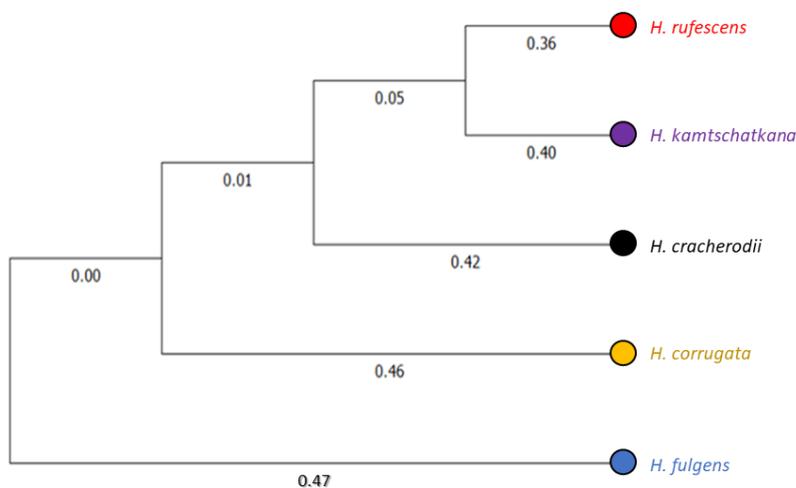


Figura 6. Árbol NJ basado en la matriz de distancia F_{ST} de las especies de abulón con distribución en México analizadas en el primer lote de muestras.

3.1.2 Selección de los SNP más informativos para la identificación de especies

El primer criterio de selección fue con base en los F_{ST} atípicos, este criterio detectó 24 SNP (panel Atípicos). El segundo criterio, con alelos privados logró identificar un total de 66 SNP (panel Alelos Privados), mostrando la mayor diferenciación genética entre las cinco especies de ambos criterios (Tabla 5). Los SNP Atípicos y de Alelos Privados no coincidieron, todos fueron distintos. La distribución de los *loci* encontrados por el panel de Alelos Privados fue cuatro *loci* con alelos únicos en abulón rojo, 22 en amarillo, 27 en azul, nueve en negro y cuatro en el pinto/rayado.

Los valores de F_{ST} global promedio (IC 95%) obtenidos para los paneles Total (1,127), Atípicos (24) y Alelos Privados (66) fueron de 0.893 (0.892–0.894), 0.8520 (0.843–0.862) y 1.0 (no se pudo estimar ningún IC), respectivamente. Los valores de F_{ST} por pares para los paneles Total y Atípico se muestran en la Tabla 5, mientras para el panel de Alelos Privados estas estadísticas siempre fueron 1.0.

Tabla 5. Valores de F_{ST} globales en pares usando el panel Total de SNP (arriba de la diagonal) y el panel de Atípicos (bajo la diagonal) para las cinco especies de *Haliotis* (IC 95% se muestran en paréntesis).

Especie	Rojo	Amarillo	Azul	Negro	Pinto/rayado
Rojo		0.892 (0.890 - 0.893)	0.912 (0.911 - 0.913)	0.852 (0.850 - 0.854)	0.734 (0.730 - 0.739)
Amarillo	0.835 (0.822 - 0.850)		0.937 (0.936 - 0.939)	0.892 (0.890 - 0.894)	0.926 (0.923 - 0.929)
Azul	0.833 (0.823 - 0.844)	0.972 (0.966 - 0.977)		0.914 (0.913 - 0.916)	0.933 (0.931 - 0.936)
Negro	0.796 (0.784 - 0.814)	0.992 (0.987 - 0.995)	0.984 (0.974 - 0.994)		0.855 (0.849 - 0.855)
Pinto/rayado	0.315 (0.300 - 0.330)	1.000	0.990 (0.983 - 0.997)	0.993 (0.987 - 0.996)	

Rojo (*H. rufescens*), amarillo (*H. corrugata*), azul (*H. fulgens*), negro (*H. cracherodii*) y pinto/rayado (*H. kamtschatkana*).

Usando DAPC, se extrajeron tres funciones discriminantes lineales (LD) que explicaron el 92.0, 99.3 y 98.7% de la varianza alélica de los datos para el panel Total, Atípicos y Alelos Privados, respectivamente (los parámetros seleccionados para el DAPC se muestran en el Anexo A (Tabla 10). El DAPC de los paneles Total y Alelos Privados identificaron cinco grupos, coincidiendo con las cinco especies de *Haliotis* (Figura 7 A y B). En el caso del panel de Atípicos, solo se identificaron cuatro grupos, dado que no discriminó entre los abulones rojos y pinto/rayados (Figura 7 C y Anexo A, Figura 18). Se obtuvo una asignación exitosa del

100% de individuos a cada especie usando los paneles Total y Alelos Privados y coincidió con los resultados de la clasificación en DAPC (Anexo A, Tabla 11 y Figura 19).

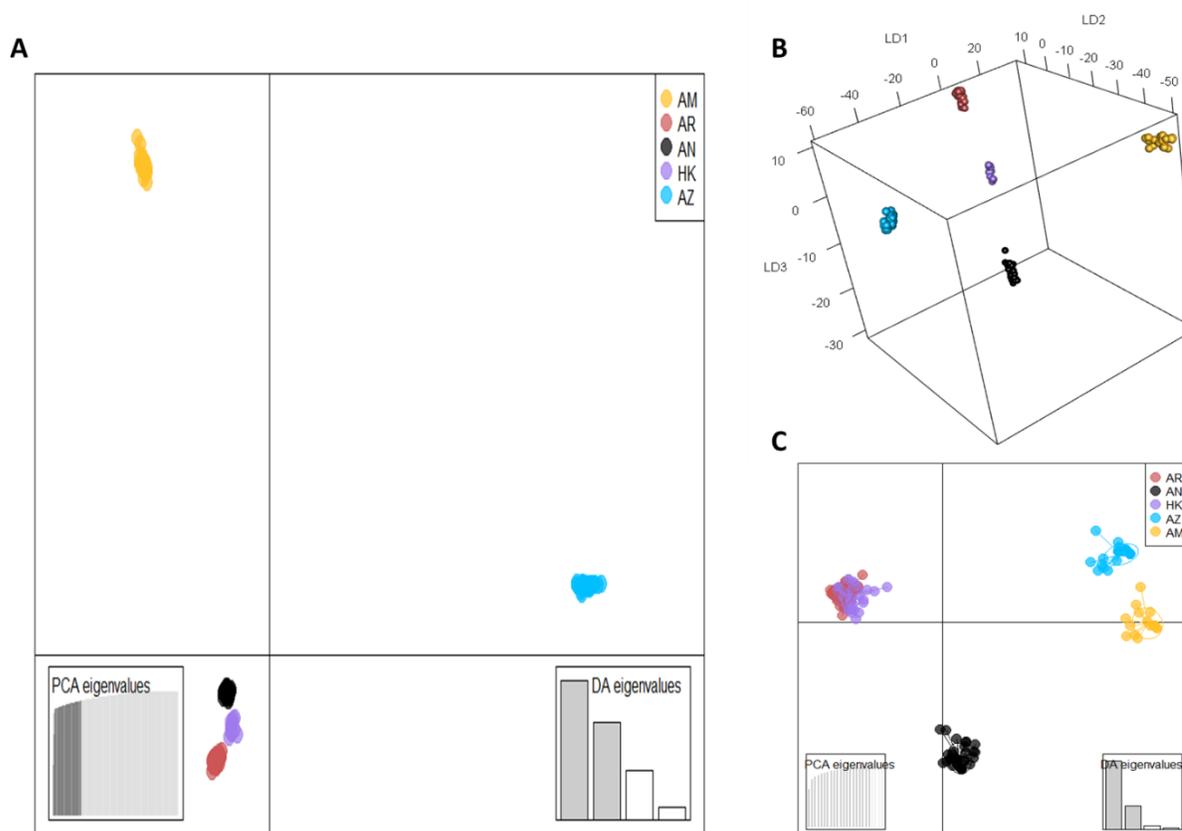


Figura 7. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para los tres paneles de SNP obtenidos. (A) Total (1,127 SNP) representación 2D (LD1 y LD2) con agrupaciones señaladas con hélices; (B) Alelos Privados (66 SNP) representación 3D y (LD1, LD2 y LD3), representación 2D (ver Anexo A, Figura 19); (C) Atípicos (24SNP) representación 2D (LD1 y LD2). Los puntos representan cada individuo con diferente color por especie: Abulón rojo (*H. rufescens*, AR), amarillo (*H. corrugata*, AM), azul (*H. fulgens*, AZ), negro (*H. cracherodii*, AN) y rayado/pinto (*H. kamtschatkana*, HK).

Por otra parte, la asignación de individuos fue de 100% para cada especie con los paneles Total y Alelos Privados usando LOO en GeneClass2.0. El panel Atípicos asignó incorrectamente tres abulones rojos al grupo de pinto/rayados, mostrando un mejor desempeño en la asignación que en el análisis DAPC, que agrupó a todos los individuos pinto/rayados con los abulones rojos (Figura 7 C, Anexo A, Figura 19). Para ambos análisis DAPC y LOO, el panel de Alelos Privados con 66 SNP mostró el mismo desempeño que el panel Total con 1,127 SNP. La sensibilidad y la especificidad alcanzaron un máximo valor de 1.0 para los paneles Total y Alelos Privados, lo que indicó un rendimiento óptimo en la identificación correcta de

individuos de estas cinco especies de *Haliotis* y excluyéndolas de grupos diferentes a los proceden (Tabla 6).

Tabla 6. Sensibilidad (S) y Especificidad (E) para los tres paneles de marcadores SNP desarrollados con las cinco especies de *Haliotis* del Pacífico Nororiental.

	Panel total / Panel Alelos Privados		Panel Atípicos	
	S	E	S	E
Rojo	1	1	0.974	0.973
Amarillo	1	1	1	1
Azul	1	1	1	1
Negro	1	1	1	1
Pinto/rayado	1	1	0.986	1

Sensibilidad (S) y Especificidad (E). Abulón rojo (*H. rufescens*), amarillo (*H. corrugata*), azul (*H. fulgens*), negro (*H. cracherodii*) y pinto/rayado (*H. kamtschatkana*).

3.1.3 SNP y su detección por HRM

A partir del panel Alelos Privados, que presentó mejor rendimiento para discriminar entre las cinco especies, se contó con 66 secuencias RADtags para el diseño de los oligonucleótidos, el cual se realizó empleando el programa AmplifX 2.0.7 (Jullien, 2019). Donde se eligieron dos opciones por especie y se mandaron sintetizar aquellos que representaron las opciones con mejores características (p. ej. sin problemas de estructuras secundarias, diferencias de la temperatura de alineamiento entre el oligonucleótidos sentido y anti sentido, presencia del SNP fuera del sitio de diseño de los oligonucleótidos, que el SNP fuera clase I o II, entre otros).

Posteriormente, se estandarizaron las condiciones de amplificación para obtener un sólo amplicón, sin dímeros. En la Figura 8 se observan las curvas de disociación de alta resolución obtenidas de las diferentes especies, estas se encuentran empalmadas en esta figura, pero cada una fue generada de forma independiente (Anexo B, Figura 20). Para cada especie, se muestran los mejores candidatos de oligonucleótidos que lograron asignar correctamente las muestras a la especie a la que pertenecían.

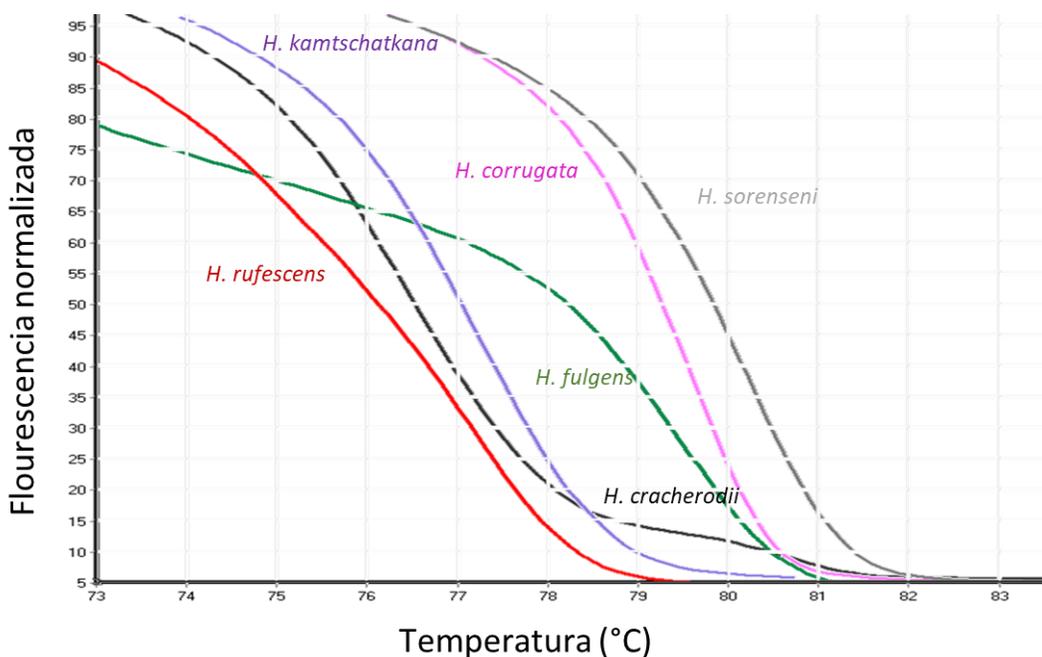


Figura 8. Curvas de disociación de alta resolución (HRM) para la identificación de seis especies de abulón del Pacífico Nororiental, empalmadas. Abulón rojo (*H. rufescens*), amarillo (*H. corrugata*), azul (*H. fulgens*), negro (*H. cracherodii*), pinto/rayado (*H. kamtschatkana*) y chino (*H. sorenseni*).

3.2 Comparación de SNP y Mml

3.2.1 Identificación de especies de abulón con SNP

La identificación de las seis especies de abulón con la técnica de HRM, al detectar los SNP a partir del panel de Alelos Privados, logró tener una buena asignación de las especies para las muestras control. Al diferenciar cada especie con su marcador específico del resto (Figura 8 y Figura 9 A).

Conjuntamente, se probaron estos marcadores SNP con muestras de productos enlatados (Tabla 2.). Sin embargo, de las 10 muestras procesadas, solo seis muestras amplificaron para algún marcador específico (16S), y fueron dos muestras de productos señalados en la etiqueta como lapa “Tipo abulón” (CN1 y CN2, controles negativos) y las cuatro muestras que se analizaron a ciegas (M1, M2, M3 y M4, muestras problema) (Figura 9 B). De estas muestras amplificaron CN1, CN2 y dos de las muestras problema M1 y M2, solo para el marcador que identifica a la especie abulón rojo. Para el resto de los marcadores SNP no

amplificaron, en caso de que no saliera alguna de las muestras se repetía la reacción una vez más para confirmar el resultado, y estos resultados fueron consistentes en las réplicas técnicas.

La muestra problema M1 dio una curva más cercana al abulón rojo (Figura 9 C), posteriormente se corroboró que esta muestra pertenece a una lata marca Mar C&A cuya etiqueta dice contener abulón de Ensenada, sin especificar la especie (Anexo B, Figura 21). Por las características del callo para esta muestra M1, tiene una alta probabilidad de corresponder a un abulón, mientras que la otra muestra problema que amplificó, M2 salió negativa para ser abulón rojo, y su callo se observa más semejante al de las lapas CN2 y CN2 (Anexo B, Figura 21).

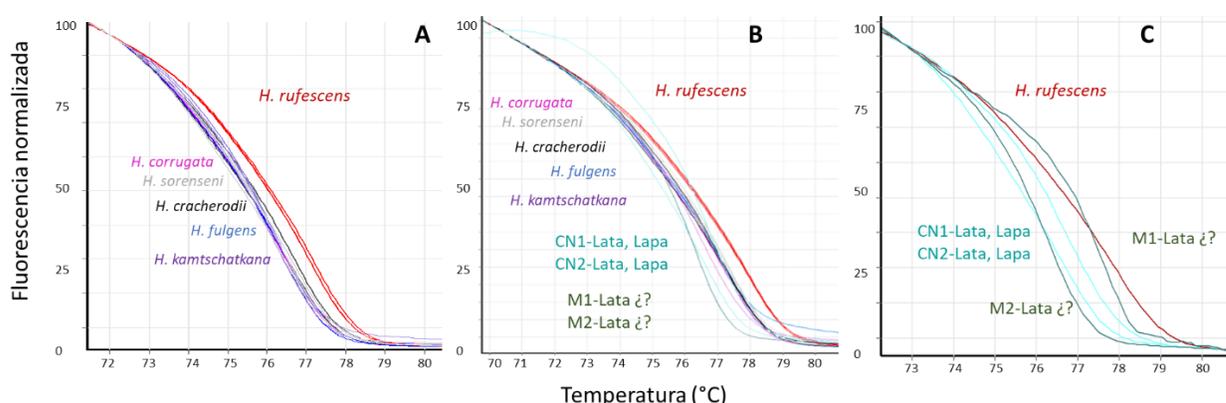


Figura 9. Curvas de disociación de alta resolución (HRM) para la identificación de seis especies de abulón del PNO. (A) Muestras control de tejido fresco, Rojo (*H. rufescens*), amarillo (*H. corrugata*), azul (*H. fulgens*), negro (*H. cracherodii*), pinto/rayado (*H. kamtschatkana*) y chino (*H. sorenseni*). (B) Muestra control y de productos enlatados CN: control negativo, lapa; M: muestra problema. (C) Muestra control abulón rojo, las muestras de producto enlatado: lapa, CN1 y CN2; muestras enlatadas problema, M1: Mar C&B abulón ENS BC y M2: El Rosarito abulón BCS.

Adicionalmente se probaron los marcadores SNP para las especies de abulón rojo, amarillo y azul para su detección con HRM en 10 organismos híbridos, cinco correspondientes al híbrido RAm (Rojo x Amarillo) y cinco al híbrido RAz (Rojo x Azul). De ellos, tres organismos RAm y cuatro RAz amplificaron con los tres marcadores. De los tres RAm, uno dio una curva más cercana al abulón amarillo (Figura 10 A), mientras que los otros dos y los cuatro organismos RAz dieron curvas más cercanas al abulón rojo (Figura 10 B y C), los resultados fueron consistentes con sus réplicas técnicas.

Los resultados obtenidos nos indican que la técnica HRM es funcional y adecuada para detectar los marcadores SNP y que estos nos permiten hacer identificación de especies. En las muestras control los resultados nos indican que son confiables, pero es necesario mejorar los métodos de extracción de DNA

en productos enlatados y buscar otro criterio de selección de marcadores SNP para la identificación de organismos híbridos, ya que su desempeño no permitió identificar la especie de ambos parenterales Rojo y Amarillo para RAm y Rojo y Azul para RAz.

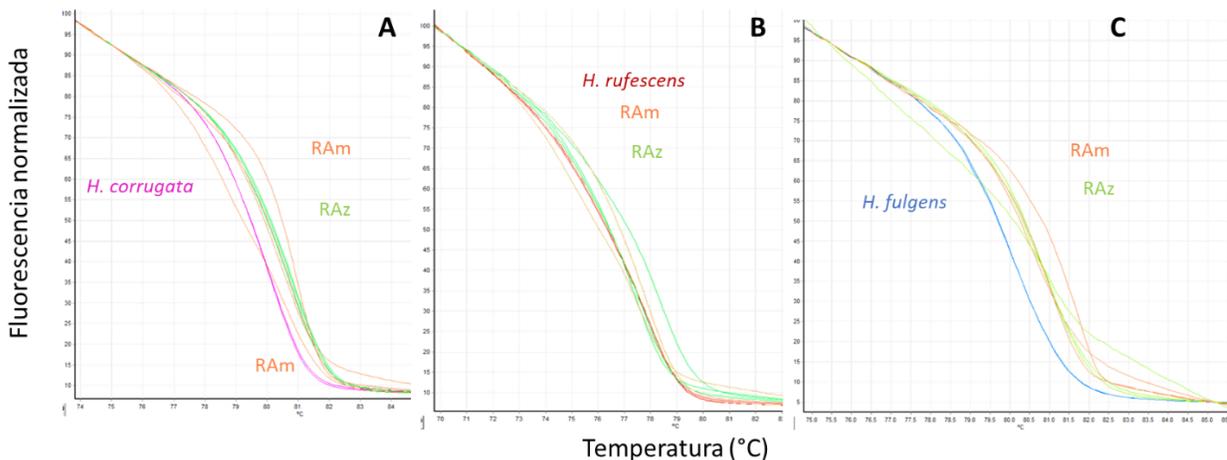


Figura 10. Curvas de disociación de alta resolución (HRM) para la identificación de organismos híbridos RAm (Rojo x Amarillo) y RAz (Rojo x Azul): (A) Amarillo (*H. corrugata*). (B) Rojo (*H. rufescens*). (C) Azul (*H. fulgens*).

3.2.2 SNP bajo selección

Respecto al análisis para buscar *loci outliers* candidatos o posiblemente bajo selección, con el fin de apoyar a los marcadores informativos para trazabilidad a nivel localidad, se evaluaron en tres programas distintos. En Bayescan solo se encontró un *loci* candidato, en pcadapt se encontraron 469 *loci* candidatos para una tasa esperada de falsos descubrimientos inferior al 5% (con corrección Bonferroni). Mientras que con OutFLANK se encontraron 48 *loci* candidatos. No obstante, ninguno de los *loci* coincidió en los tres programas, solo dos *loci* coincidieron en dos de los tres programas. Por lo que se consideró que el conjunto de 11,152 SNP como neutrales, ya que no se observó una señal evidente de acuerdo con los programas para considerar que hay SNP bajo selección.

3.2.3 Identificación de especies de abulón con Mml

Con motivo de comparar las opciones que se tienen reportadas actualmente se analizó el desempeño de los Mml de la Tabla 3 con las mismas muestras empleadas para evaluar los SNP, cinco abulones de cada

especie como muestras control y las muestras descritas en la Tabla 2, con sus réplicas técnicas. En caso de que no saliera alguna de las muestras o réplicas se repetía la reacción una vez más para confirmar el resultado.

Los genes *16S* (Figura 11 A) y *COI* dieron el mismo tamaño de amplicón en las seis especies de abulón aquí estudiadas, por lo que estos marcadores fueron usados para evaluar la calidad del DNA obtenido. Además, fueron secuenciados para tener una mayor certeza de la identificación de la especie de la muestra. Principalmente, de los abulones chino y pinto/rayado, dado su complicada asignación por características morfológicas.

Así mismo, se realizó el RFLP-PCR, la digestión de la amplificación del gen *COI* con la enzima de restricción *XbaI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA). Sin embargo, sólo digirió muestras de abulón pinto/rayado permitiendo identificarla del resto (Figura 11 B). Para ese fin, el marcador del gen de *Lisina* (Supernault et al., 2010) también nos permite identificar esta especie y por su tamaño (63 pb) este marcador tiene potencial para su uso en productos procesados. Un problema observado en la amplificación de este marcador fue la presencia de dímeros, los cuales no pudieron eliminarse aun cuando se realizaron varias modificaciones a las condiciones de amplificación (Figura 11 C).

Por otra parte, el gen *Verl* reportado por Supernault et al., (2010) permite discriminar diferentes especies de *Haliotis*. En este trabajo, este gen mostró múltiples productos de amplificación (bandeo inespecífico) y a pesar de que se aumentó la temperatura de alineamiento, no se observó una mejora en su amplificación (Figura 11 D).

Dado estos resultados, se decidió diseñar marcadores a partir de las secuencias reportadas en el banco de datos genéticos GeneBank de este gen y se diseñaron siete pares de oligonucleótidos para su amplificación parcial considerando las diferencias entre especies. Los resultados demostraron que tres pares presentaron el mismo tamaño de amplicón en las seis especies, por lo que no permiten discriminar entre ellas. Y del resto, sólo un marcador (IDHv5) presentó un patrón de amplificación (bandeo) diferente entre tres especies (Figura 11 E). Por lo que, los Mml más informativos resultaron ser *Verl3* y el IDHv5 porque permiten discriminar entre más de una especie a la vez. A pesar de que en algunas muestras se observaron bandas inespecíficas de todas las especies, los resultados fueron consistentes entre las réplicas, indicando que las condiciones empleadas son estables. También, se observó mejor amplificación en muestras de tejido fresco o sin procesar, pero el bandeo inespecífico hace necesario el empleo de más de un marcador para confirmar el resultado.

Con respecto a las muestras de abulones híbridos, a pesar de que todas ellas dieron amplificación para al menos uno de los once Mml evaluados en este trabajo, sólo unas cuantas muestras presentaron amplificación para los Mml más informativos, seis para *Verl3* y cuatro para IDHv5 (Figura 12). Mientras que, para los productos enlatados seis de ellas sí amplificaron para el *16S* con un amplicón de aproximadamente 500 pb. Sin embargo, no amplificó ninguna muestra para los Mml *Verl3*, ni IDHv5.

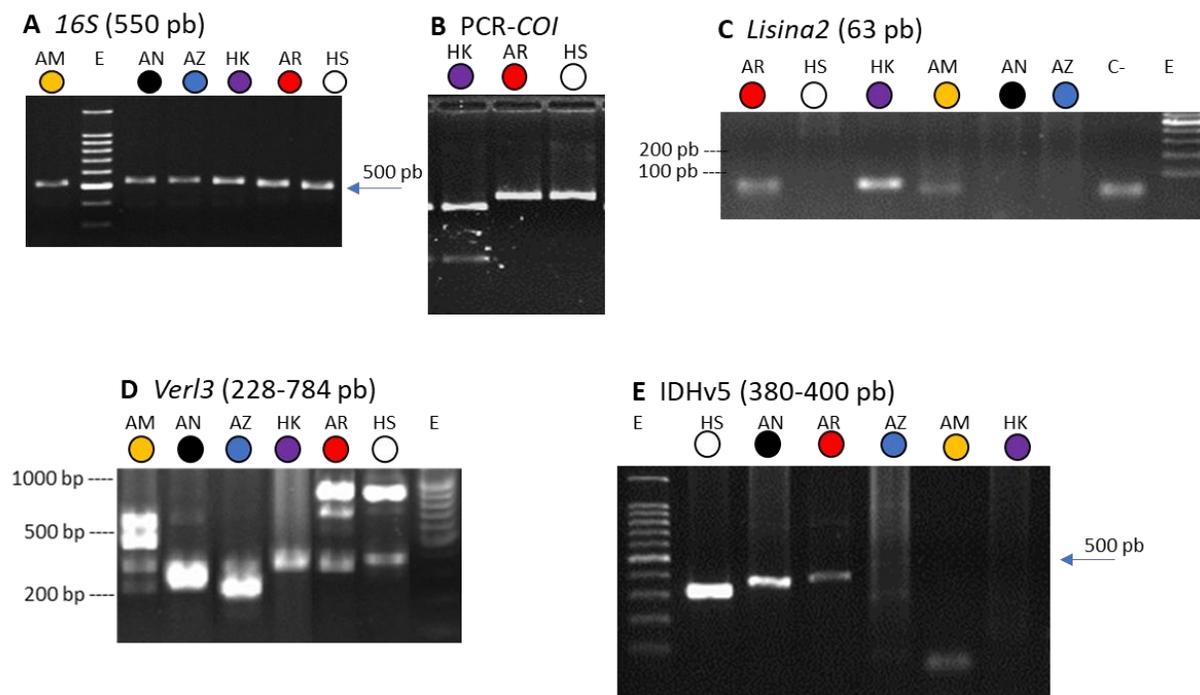


Figura 11. Patrones de amplificación por PCR de marcadores monolocus (Mml) para la identificación de especies de abulones del Pacífico Nororiental. (A – D) son marcadores reportados (Tabla 3). (E) Marcador diseñado en este trabajo a partir de secuencias del gen *Verl* reportadas en el banco de datos genéticos GenBank. AR: Rojo (*H. rufescens*), AM: amarillo (*H. corrugata*), AZ: azul (*H. fulgens*), AN: negro (*H. cracherodii*), HK: pinto/rayado (*H. kamtschatkana*) y HS: chino (*H. sorenseni*). E: Escalera de 100 pb (Promega).

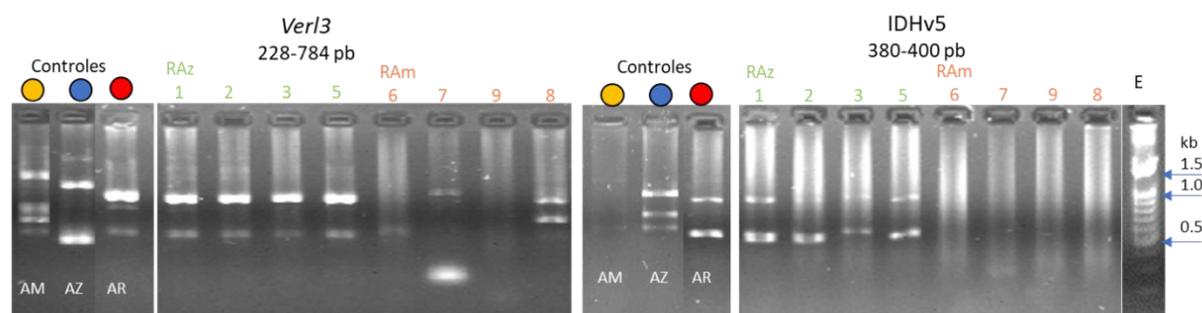


Figura 12. Marcadores monolocus (Mml) *Verl3* e IDHv5 para la identificación de abulones híbridos. AM: amarillo (*H. corrugata*), AZ: azul (*H. fulgens*), AR: rojo (*H. rufescens*); RAz: híbrido Rojo x Azul; híbrido RAm: Rojo x Amarillo. E: escalera de 100 pb (Promega, G210A).

Por lo que estos resultados nos dicen que las opciones actuales solo nos permiten hacer identificación del abulón chino de manera confiable con una sola amplificación por PCR del marcador IDHv5, y para identificar al abulón pinto/rayado con un PCR del gen *Lisina2*, con una confirmación necesaria con RFLP-COI.

Los marcadores *Ver13* y el diseñado a partir de ese gen IDHv5, pueden ayudar como pruebas exploratorias para hacer una discriminación entre el resto de las cinco especies de abulón, debido a que pueden presentar bandeo inespecífico por características propias del organismo y no tanto por la condición o tipo la muestra (tejido fresco o callo enlatado). Por lo que es necesario el empleo de más de un marcador (*Ver13*, IDHv5, *Lisina2* y RFLP-COI) o de la secuenciación de uno de ellos (p.ej. 16S) para poder dar una asignación más confiable, si se quiere emplear Mml.

3.3 Análisis poblacional del abulón negro con SNP

3.3.1 Detección de SNP con genoma de referencia en el abulón negro

Del segundo lote, de las muestras de abulón negro se obtuvieron más de 380 millones de lecturas de secuencias. Sin embargo, 67 muestras presentaron menos de 0.75 M de lecturas cada una, por lo que se excluyeron en el primer paso del flujo de trabajo de STACKS, quedando un total de 92 muestras con un intervalo de 0.79 a 7.36 M de lecturas. Donde, el 94.25% de las lecturas se mapearon correctamente al borrador del genoma de referencia publicado para esta especie (con menor número de scaffolds, GCA_022045235.1) (Orland et al., 2022).

Después de los filtros de calidad y eliminación de alineamientos ambiguos quedaron un total de 281,033,664 lecturas, de las cuales se conservó el 86.6% y se tuvo un promedio de 3,054,714 lecturas por muestra. El número de *loci* genotificados en el catálogo fue de 494,219 *loci* y 19,576 SNP conservados, con una profundidad promedio por muestra de 15.6x (intervalo 4.8x - 45.7x). Después del procesado en STACKS y del filtrado, se redujeron a 16,996 SNP en 92 individuos con menos del 10% de datos faltantes y una profundidad mayor a 10x. No se encontró ningún marcador fuera del EHW en más del 50% de las localidades y solo se encontró un *loci* duplicado que fue eliminado.

Los SNP remanentes se redujeron (adelgazaron) para evitar tener marcadores ligados a una distancia de 500 pb descartando 1,045 *loci* y posteriormente se eliminaron 4,799 *loci* por estar en desequilibrio de ligamiento ($r^2 > 0.2$). Solo una muestra correspondiente a IGP pasó los filtros de calidad, por lo que no se consideró para el análisis poblacional. Finalmente, el conjunto de SNP fue en total de 11,152 *loci* para 91 individuos en nueve localidades (Tabla 4).

3.3.2 Diversidad y estructura genética del abulón negro

Para evaluar la diversidad del abulón negro a lo largo de su distribución contamos con nueve sitios, dos de ellos en California y el resto en la PBC, variando la cantidad de individuos de 5 a 18 (Tabla 4). Se tuvo una riqueza alélica global de 1.54 y un número de alelos efectivos de 1.2; y solo las localidades de PBD y FSJ presentaron alelos privados (5 y 164, respectivamente).

Tabla 7. Estadísticos de diversidad genética del abulón negro para nueve sitios a lo largo de su distribución con 11,152 SNP.

Sitio	n	RA	NA	NAe	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>F_{IS}</i>
CMC	5	1.55	1.550	1.237	0.158	0.175	0.095*
CSM	6	1.57	1.634	1.248	0.166	0.183	0.091*
BJM	10	1.57	1.773	1.245	0.165	0.179	0.078*
ITS	9	1.58	1.751	1.252	0.169	0.183	0.080*
SLM	13	1.57	1.837	1.246	0.163	0.179	0.085*
PBD	12	1.57	1.825	1.245	0.165	0.179	0.075*
BTS	18	1.58	1.913	1.250	0.166	0.182	0.088*
PCS	5	1.54	1.544	1.235	0.159	0.173	0.081*
FSJ	13	1.34	1.568	1.124	0.077	0.097	0.198*
Global	91	1.54	2	1.210	0.154	0.170	0.091*
¹ DE		0.08	0	0.002	0.001	0.001	0.002
² IC 2.5%		1.48	2	1.206	0.152	0.168	0.087
IC 97.5%		1.60	2	1.213	0.156	0.172	0.095

n: número de individuos, RA: Riqueza alélica, NA: número de alelos, NAe: número de alelos efectivos, *Ho*: heterocigosidad observada, *He*: heterocigosidad esperada y *F_{IS}*: coeficiente de endogamia. RA: Calculado con *diveR*sity y prueba *t-test Student*. El resto de los estadísticos se calcularon con *GenoDive*. **Negrita** y *: valores con significancia estadística con corrección Bonferroni.

¹ DE: Desviación estándar de *F* se obtuvo a través de jackknifing sobre *loci*.

² IC: Los intervalos de confianza del 95% de las estadísticas *F* se obtuvieron mediante el bootstrapping sobre *loci*.

El valor global de la heterocigosidad observada (*Ho*) fue de 0.154, con un intervalo de 0.077 y 0.169 (FSJ e ITS), mientras que para la heterocigosidad esperada (*He*) fue de 0.170, variando entre un intervalo de

0.097 y 0.183 (FSJ y CSM, ITS). En todos los casos, la H_o fue menor a la H_e . Los valores de los estadísticos de diversidad evaluados fueron semejantes entre las localidades, excepto por la localidad más sureña FSJ que presentó los valores más bajos. El coeficiente de endogamia global (F_{IS}) fue de 0.091, con un intervalo de 0.075 a 0.198 (PBD y FSJ), y resultó significativo en todas las localidades indicando tendencia a la endogamia (Tabla 7).

Para la estimación del coeficiente de parentesco con “kinship” en GenoDive (Figura 13 A) se encontró relación entre hermanos (segundo grado) para algunos individuos de la localidad de FSJ (-0.21 a 0.21, Figura 13 B), mientras que se encontró que hay relación de tercer grado en las comparaciones pareadas de algunos individuos de las localidades de ITS (-0.2 a 0.03), SLM (-0.2 a 0.03) y PBD (-0.2 a 0.06) (Anexo C, Figura 22). Donde, en lo referido a los grados de consanguinidad existentes, hay que señalar: Primer grado de consanguinidad: padres e hijos. Segundo grado de consanguinidad: hermanos, abuelos y nietos. Tercer grado de consanguinidad: bisabuelos, biznietos, tíos y sobrinos (Manichaikul et al., 2010).

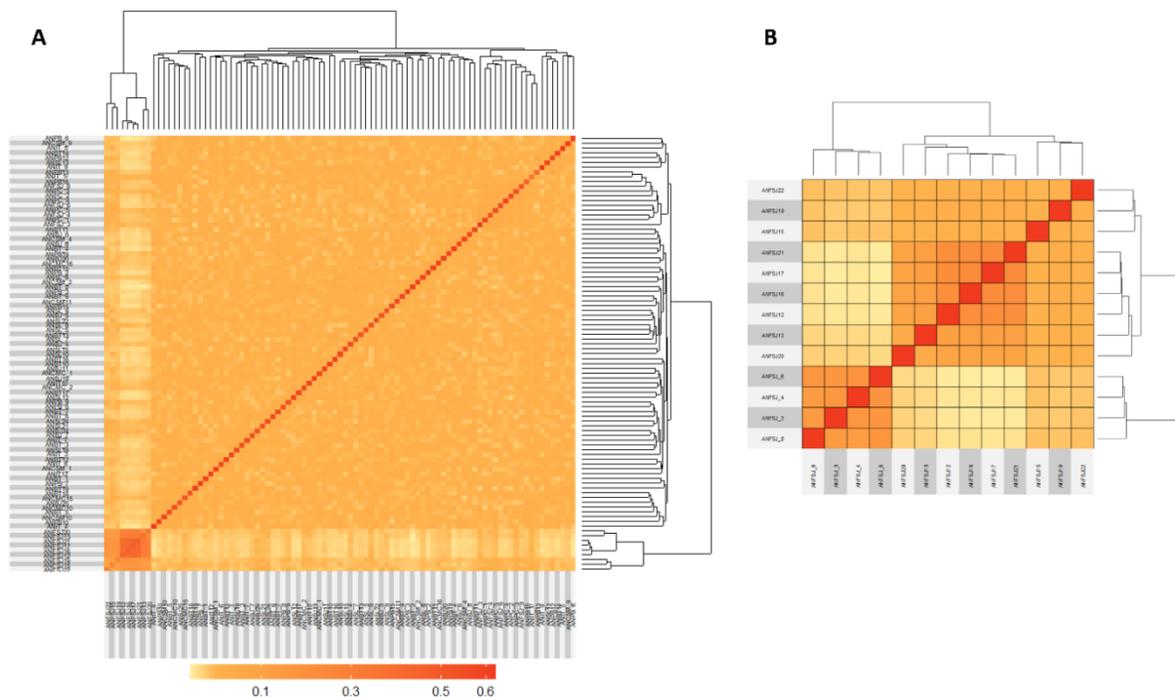


Figura 13. Estimación del coeficiente de parentesco con “kinship” en GenoDive con 11,152 marcadores SNP. (A) Mapa de calor de la matriz de parentesco de los 91 individuos estudiados y su árbol a la izquierda. (B) Mapa de calor de la matriz de parentesco entre 13 individuos de la localidad de FSJ y su árbol a la izquierda.

La estimación del tamaño poblacional efectivo para la mayoría de las localidades dio valores de infinito, excepto para la localidad de FSJ, la cual se estimó de $N_e=2$ (con 95% de los IC *Jackknifing over sample* de 0.9 – 22.6) con un valor menor de frecuencia alélica 0.02.

Respecto a los patrones de migración relativa direccional, basados en la distancia genética G_{ST} se observó que hay un alto flujo genético entre todas las localidades (Manichaikul et al., 2010). La parte norte de la PBC presenta un mayor flujo entre sus localidades (BJM, ITS, SLM, PBD, BTS), evidentemente dada su cercanía menor a 15 km entre ellas (Figura 5), y en menor medida con las localidades de California (CMC y CSM) y PCS, en ambas direcciones (Figura 14). Siendo la localidad de FSJ la única que dio valores con significancia de una migración relativa direccional de salida de migrantes, teniendo un mayor flujo con PBD, seguido de SLM, ITS y BJM, luego de CMC, CSM y PCS (Anexo D, Figura 23).

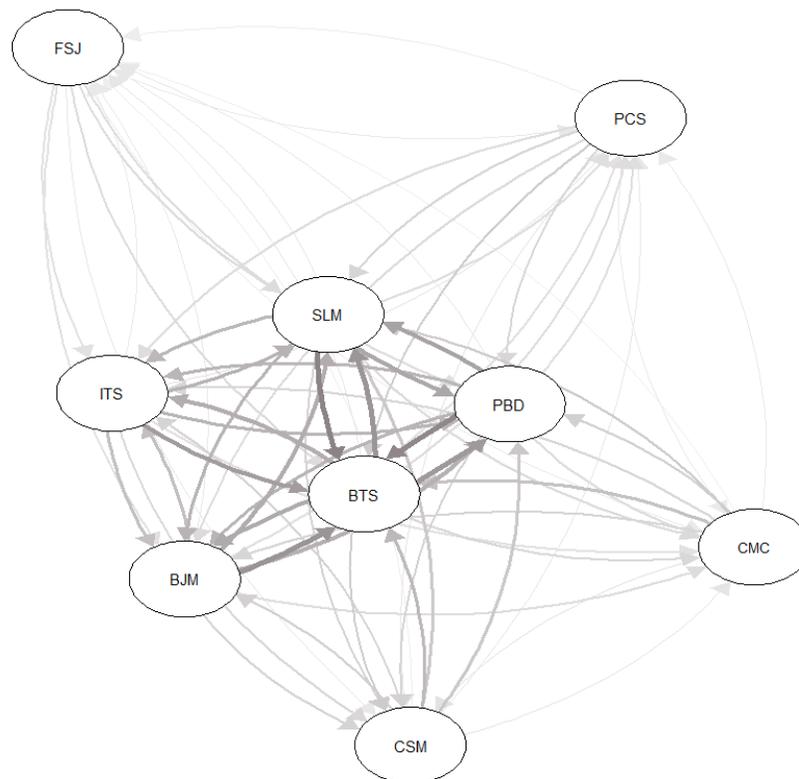


Figura 14. Dirección de migración relativa de las localidades analizadas de abulón negro. Estimada con divMigrate en R con 11,152 SNP, empleando como distancia genética G_{ST} , sin filtro como umbral. La dirección y espesor de las flechas indican los niveles relativos de migración pareado, donde una mayor intensidad del color de las flechas indica un mayor flujo entre las localidades que están en círculos. Las localidades de norte a sur son: CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada B.C.; PCS: Puerto Canoas y FSJ: Faro San José en San Quintín B. C.

La diferenciación genética entre las localidades presentó el mismo patrón de agrupación entre los diferentes análisis. El valor del estadístico F_{ST} global fue de 0.018 (DE: 0.001 y CI del 95% 0.017 - 0.019), con un intervalo de (-0.001 – 0.105), con diferencias significativas entre las dos localidades más sureñas (PCS

y FSJ) con respecto a las localidades norteñas ($p \leq 0.001$, posterior a corrección Bonferroni), entre la localidad de PCS con BJM, SLM y BTS; y FSJ con CSM, ITS, SLM, PBD y BTS (Tabla 8).

En el análisis DAPC las localidades formaron dos agrupaciones ($BIC = 2$), una con las siete localidades del norte (CMC, CSM, BJM, ITS, SLM, PBD, BTS) y otro con las dos localidades del sur (PCS y FSJ) explicado en los primeros 30 componentes principales, con dos funciones discriminantes, con una proporción de varianza conservada de 47% (Figura 15 y Anexo E, Figura 24). La probabilidad posterior de pertenecer de cada individuo a la población pre establecida (cada localidad corresponde a una población) de acuerdo con el resultado del DAPC se puede ver en el Anexo E (Figura 25).

Tabla 8. Valores de F_{ST} en pares para las nueve localidades analizadas de abulón negro con 11,152 SNP en 91 individuos (arriba de la diagonal) y sus valores p de significancia (debajo de la diagonal).

Sitio	CMC	CSM	BJM	ITS	SLM	PBD	BTS	PCS	FSJ
CMC	--	0.002	0.000	0.001	0.001	0.004	0.000	0.014	0.105
CSM	0.210	--	0.001	0.002	0.005	0.003	0.002	0.012	0.104*
BJM	0.441	0.111	--	0.000	0.001	0.000	0.000	0.013*	0.085
ITS	0.253	0.050	0.394	--	0.001	-0.001	0.000	0.012	0.088*
SLM	0.339	0.002	0.078	0.260	--	0.001	0.001	0.012*	0.080*
PBD	0.031	0.031	0.369	0.809	0.110	--	0.001	0.012	0.080*
BTS	0.428	0.053	0.456	0.626	0.038	0.218	--	0.012*	0.076*
PCS	0.007	0.004	0.001*	0.002	0.001*	0.002	0.001*	--	0.103
FSJ	0.003	0.001*	0.002	0.001*	0.001*	0.001*	0.001*	0.012	--

Negrita y *: valores con significancia estadística con corrección Bonferroni.

Mientras que para el análisis de STRUCTURE, se encontró que el valor más probable de K , inferido por la prueba de Evanno, fue de $K=5$ (Figura 16). La probabilidad de pertenecer de cada individuo a los cinco grupos se muestra en la Tabla 9 y Figura 17, variando con lo obtenido por los valores de F_{ST} (Tabla 8) y DAPC (Figura 15).

Para tratar de encontrar una probable estructuración entre las localidades norteñas, se excluyeron las dos localidades más sureñas (PCS y FSJ) (Anexo F), lo cual resultó en valores de F_{ST} con diferencia significativa entre las localidades de CSM e ITS y SLM y a su vez SLM con PBD (Tabla 12). El análisis BIC del DAPC no pudo determinar un valor de K , por lo que se seleccionó un K de 3, dado que ese valor resultó como el óptimo en el análisis de STRUCTURE con base en la prueba de Evanno et al., (2005) (Anexo F, Figura 27), y

se observó una ligera tendencia de CSM a alejarse del resto de las localidades, pero sin llegar a separarse totalmente lo cual se observa en la primer función discriminante (Anexo F, Figura 26).

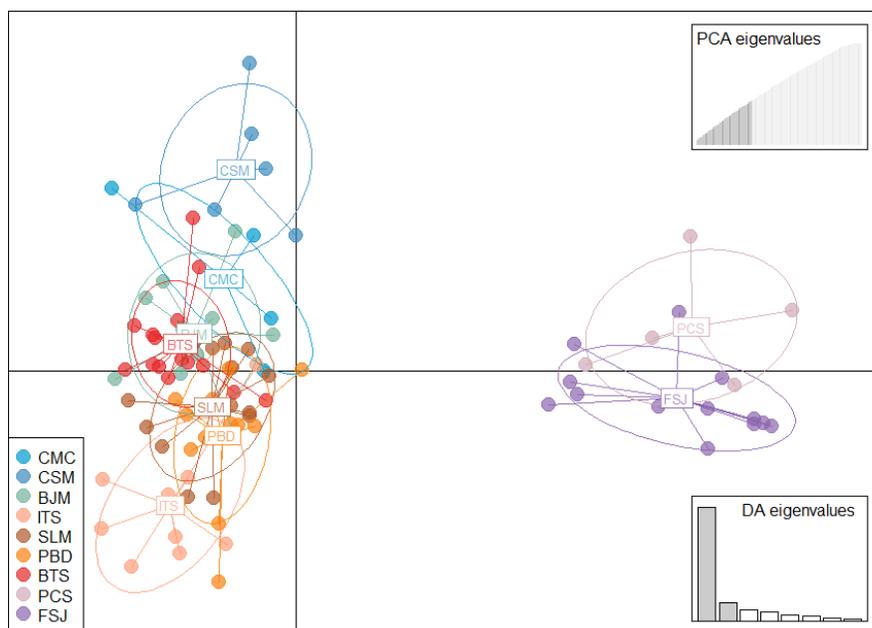


Figura 15. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para las nueve localidades estudiadas de abulón negro con 11,152 SNP en 91 individuos, con 30 componentes retenidos y dos funciones discriminantes. Las localidades de norte a sur son: CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC.; PCS: Puerto Canoas y FSJ: Faro San José en San Quintín BC.

Tabla 9. Porcentaje de pertenencia para K=5 del análisis de STRUCTURE. n: número de individuos por sitio. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC.; PCS: Puerto Canoas y FSJ: Faro San José en San Quintín BC.

Sitio	CMC	CMS	BJM	ITS	SLM	PBD	BTS	PCS	FSJ
n	5	6	10	9	13	12	18	5	13
1	0.33	0.10	0.49	0.16	0.49	0.19	0.18	0.02	0.01
2	0.02	0.20	0.31	0.60	0.18	0.58	0.42	0.02	0.00
3	0.51	0.59	0.07	0.12	0.22	0.10	0.30	0.07	0.01
4	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.02	0.01	0.76	0.34
5	0.13	0.10	0.11	0.11	0.11	0.12	0.10	0.13	0.64

A pesar de que en el último análisis se sugiere una K de 5 lo que nos indicaría una estructura genética en cinco componentes, al analizar el conjunto de datos con STRUCTURE con un valor de K de 5 la prueba de Evanno et al., (2005) nos sugiere que la K más probable es de 2 agrupaciones genéticas, separando solo a

la localidad de FSJ del resto. Por lo que, en consenso los resultados de los análisis realizados nos indican que las localidades se están estructurando en dos agrupaciones genéticas (norte y sur).

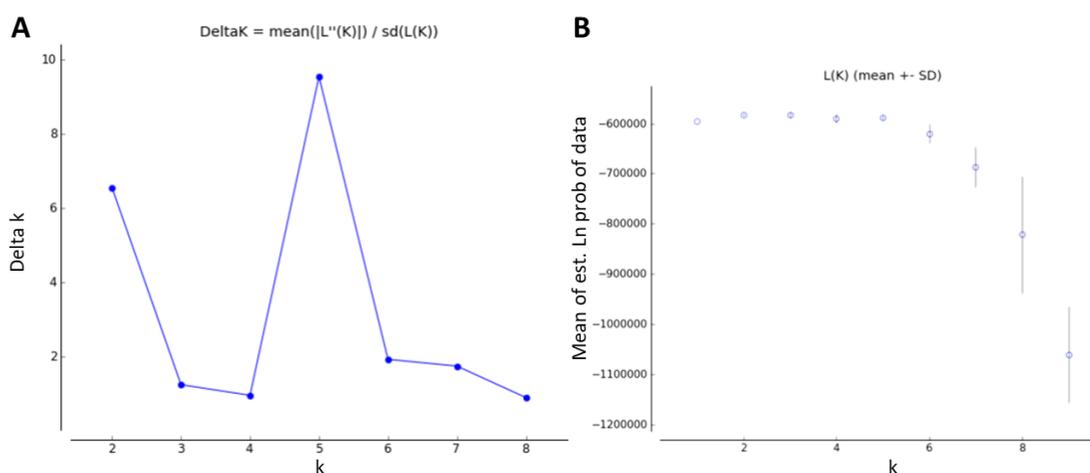


Figura 16. Estimación del número más probable de grupos con Structure harvester para nueve localidades de abulón negro con 11,152 SNP en 91 individuos. A: Logaritmo de probabilidad media ($\ln P[k]$) y B: Delta k (Δk).

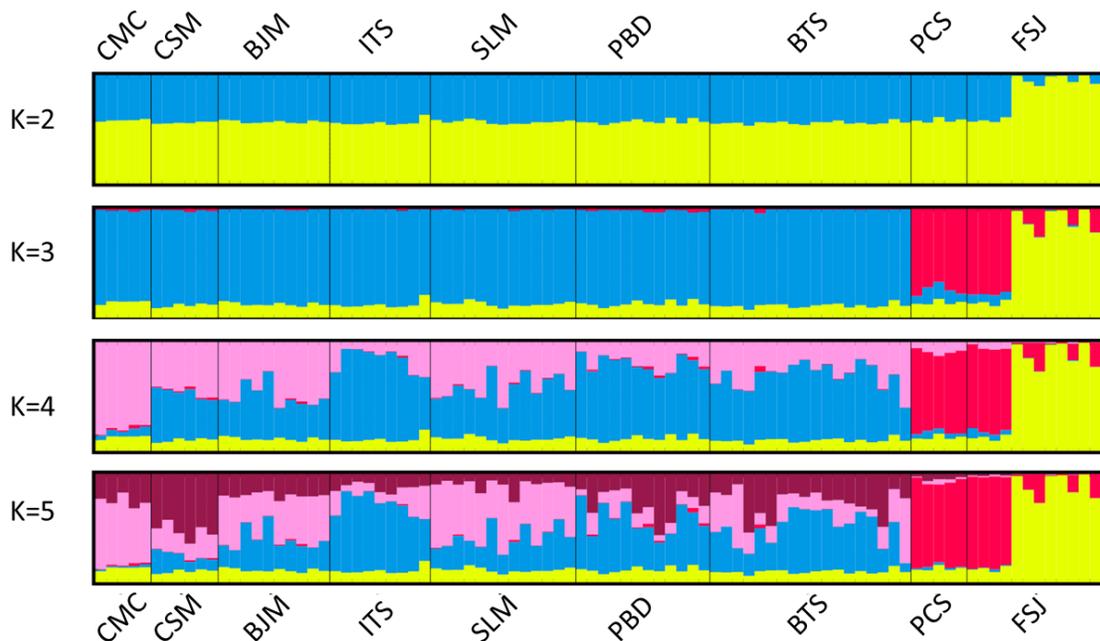


Figura 17. Estructura genética de 91 individuos de abulón negro procedentes de nueve localidades con 11,152 SNP empleando K de 1 a 9, en la figura solo se muestra de k 2 a 5. Donde cada color corresponde a un componente o grupo genético. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC.; PCS: Puerto Canoas y FSJ: Faro San José en San Quintín BC.

Capítulo 4. Discusión

4.1 SNP para la identificación de especies de abulón del PNO

La identificación de especies entre el género *Haliotis* es relevante debido al alto valor comercial y el estado de peligro de extinción de algunas especies (Tabla 1). Este estudio de investigación desarrolló SNP en cinco especies de abulón del Pacífico presentes en México. Los más informativos fueron seleccionados para identificar con confianza a *H. rufescens* (abulón rojo), *H. corrugata* (abulón rosa), *H. fulgens* (abulón verde), *H. cracherodii* (abulón negro) y *H. kamtschatkana* (roscado/abulón pinto).

Los marcadores SNP son ubicuos y hacen posible tener una amplia cobertura del genoma, muestran bajas tasas de mutación y son relativamente fáciles de genotipificar ya que la mayoría son bialélicos y rentables cuando se necesitan analizar muchas muestras (Bernatchez et al., 2017; Marsjan & Oldenbroek, 2006; Ogden & Linacre, 2015). Por lo tanto, se han utilizado con fines comerciales y de conservación (Kirk & Freeland, 2011; Reitzel et al., 2013; Wenne, 2018), identificación de especímenes (Quintrel et al., 2021; Wilson et al., 2018), estructura genética de poblaciones (Busch et al., 2014; Mejía-Ruíz et al., 2020; Valenzuela-Muñoz et al., 2013) y asignación de origen (Araneda et al., 2016; del Rio-Lavín et al., 2022; Storer et al., 2012), entre otros.

Se han descubierto marcadores SNP en especies del género *Haliotis* con diferentes técnicas y propósitos. En California y en la PBC los estudios que utilizan RADseq y ddRAD han encontrado 1,209 y 2,170 SNP, respectivamente, en *H. fulgens* para describir la estructura de la población (Gruenthal et al., 2014; Mejía-Ruíz et al., 2020). También 1,739 de los SNP obtenidos por ddRAD se utilizaron para evaluar la concordancia entre poblaciones biológicas y unidades administrativas en la pesquería de *H. corrugata* a lo largo de la costa oeste de la PBC (Mares-Mayagoitia et al., 2021). Además, Los SNP se pueden descubrir a partir de datos de secuenciación transcriptómica, como los descritos para los abulones rojos silvestres en California para revelar la adaptación local (691 SNP; De Wit & Palumbi, 2013) y abulones rojos criados en criaderos en Chile para la determinación del sexo (622 SNP; Valenzuela-Muñoz et al., 2013). Finalmente, se descubrieron 1,784,991 SNP secuenciando o resecuenciando el genoma nuclear completo de las mismas seis especies estudiadas aquí. Estos SNP se utilizaron para estudiar las relaciones filogenéticas entre estas especies y evidencian una clara divergencia entre las especies analizadas (Masonbrink et al., 2019).

Hasta donde sabemos, un panel reducido de marcadores SNP no se ha usado antes para identificar especies del género *Haliotis*. Los 1,127 marcadores SNP (Panel Total) desarrollados en este estudio reveló diferencias genéticas que permitieron discriminar entre las cinco especies, se excluyó en esta parte al abulón chino (sección 2.1.1). La mayor diferencia genética fue entre el abulón azul y amarillo ($F_{ST} = 0.937$) y el abulón pinto/rayado ($F_{ST} = 0.933$). La diferenciación genética más pequeña fue entre el abulón rojo y el pinto/rayado ($F_{ST} = 0.734$).

Teniendo en cuenta que no todos los SNP de todo el genoma son igualmente informativos para discriminar entre especies y generar paneles con un gran número de ellos no son prácticos para el análisis de rutina, una reducción del número de marcadores con alto poder discriminatorio es deseable para diferenciar las cinco especies de abulón (Storer et al., 2012; Wilson et al., 2018). Esta opción ofrece ventajas en la reducción de costos y tiempo de análisis, haciendo que su aplicación sea más confiable que los enfoques monolocus (Mml). Para propósitos de identificar a nivel especie, usando un enfoque multilocus basado en varios SNP informativos es recomendado su desarrollo con el mayor número de especies posible. Deben mostrar polimorfismo bajo intraespecies y relativamente alto polimorfismo entre especies (Larraín et al., 2019; Ogden, 2008).

Se han utilizado muchos criterios para seleccionar los SNP más informativos con este fin, como el valor atípico “outliers” de F_{ST} , la diferencia máxima en la frecuencia de alelos (MAF_{MAX}) (Larraín et al., 2019; Quintrel et al., 2021) o seleccionando marcadores después de aplicar un DAPC (Wilson et al., 2018). En este estudio, junto con el valor atípico de F_{ST} , también se utilizó para identificar especies el criterio del alelo privado, es decir, la variante de un alelo del SNP se fija solo en una especie y la alternativa del alelo es fijado en las otras especies (Szpiech & Rosenberg, 2011).

Es posible utilizar este criterio entre especies del mismo género ya que comparten SNP conservados debido a su historia evolutiva compartida. Cuando se compararon ambos criterios utilizados para seleccionar SNP informativos, el de alelos privados supera al de Atípicos, mostrando una asignación 100% correcta de las cinco especies analizadas con sólo 66 SNP. Lo más importante, estos SNP pueden separar el abulón negro en peligro de extinción, así como el abulón pinto/rayado en peligro, del abulón rojo que es cultivable, demostrando ser el mejor criterio para la selección de los SNP, con mejor poder de discriminación entre especies.

En este estudio, el abulón negro estuvo estrechamente relacionado con el rojo y el abulón pinto/rayado, de acuerdo con la matriz distante F_{ST} (Figura 6) y el Análisis DAPC con los paneles Total (1,127 SNP; Figura

7 A) y Alelos Privados (66 SNP, Figura 7 B y Anexo A, Figura 19). Sin embargo, Masonbrink et al., (2019) reporta que el abulón negro está más cerca de los abulones amarillo y azul, analizando dos individuos de cada especie y estudiando la relación filogenética entre ellos usando SNP genómicos. Mientras que, en este estudio, el panel Atípicos (24 SNP, Figura 7 C y Anexo A, Figura 18) separa el abulón negro del grupo de rojo y pinto/rayado, lo cual es consistente con los resultados de Masonbrink et al., (2019). La diferencia entre ambos estudios es que éste está realizando un análisis de población para identificar un panel de SNP informativos muy reducido para separar estas especies, y Masonbrink et al., (2019) utilizaron una gran cantidad de SNP para abordar relaciones entre las especies de abulón.

Por otro lado, el abulón pinto/rayado es comúnmente confundido con el abulón chino (*H. sorenseni*) cuando se utilizan las características morfológicas y datos genéticos de Mml (Gruenthal & Burton, 2005; Supernault et al., 2010). Pero millones de marcadores SNP permiten la discriminación entre estas dos especies de abulón (Masonbrink et al., 2019). En este estudio, a pesar de la falta de suficientes muestras de abulón chino para incluir esta especie, el panel Alelos Privados separó la especie pinto/rayado de las demás (negro, azul, amarillo y rojo).

Los tres paneles desarrollados en esta investigación proporcionan un método de confianza para identificar especies de abulón de México. Los 1,127 SNP recientemente desarrollados para las especies de *Haliotis* fueron útiles para la identificación de especies de *H. rufescens* (abulón rojo), *H. corrugata* (abulón amarillo), *H. fulgens* (abulón azul), *H. cracherodii* (abulón negro) y *H. kamtschatkana* (abulón pinto/rayado). El criterio del alelo privado permitió la selección de 66 SNP altamente informativos.

4.2 Identificación de seis especies de abulón con SNP

Para aumentar la aplicabilidad de estos marcadores, en este estudio se seleccionaron los SNP más informativos para identificar especies a partir del panel de Alelos Privados, para genotipificar estos marcadores por medio de análisis de curvas de disociación (HRM), ya que es una tecnología rápida y que también se puede aplicar en productos procesados (cocidos, enlatados, etc.) con DNA degradado porque utiliza amplicones de tamaño pequeño (inferior a 150 pb).

Se seleccionaron 10 SNP y se evaluaron en las seis especies de abulones, es decir se incluyó a la especie de abulón chino, para ver si lograban discriminar esta especie a pesar de que no se incluyó en la selección de los SNP más informativos. Y se logró hacer una correcta identificación de las seis especies de abulón.

Se probó su aplicación en organismos híbridos, no obstante, en lugar de ver curvas de disociación características de organismos híbridos, los organismos empleados en el análisis presentaron curvas como si pertenecieran a una especie pura. Por lo que para esta aproximación el pequeño panel de SNP para HRM del criterio de alelos privados no es el adecuado, por lo que se necesitaría buscar marcadores que sean homocigotos diferentes para un alelo en las especies puras.

Adicionalmente, se retaron estos marcadores para su detección en productos enlatados. Donde dos de los productos que sugerían contener abulón en la etiqueta, sin incluir nombre científico, se asignó uno a abulón rojo, mientras que el segundo no correspondió a ninguna de las especies de abulón y dio una curva semejante a los productos que eran “Tipo abulón” lapa (control negativo), además que este producto presentaba características de callo diferentes a las que presentan los callos de abulón (Anexo B, Figura 21), confirmando una actividad fraudulenta o engañosa. Aranceta-Garza et al., (2011) describieron esta situación de fraude alimentario, donde con un marcador molecular fueron capaces de identificar abulón (específicamente rojo, amarillo y azul) y encontraron que dos de cada siete productos mexicanos de abulón en realidad no contenían abulón, pero solo en tres especies y con resultados en dos días. Con la diferencia que la detección de los marcadores aquí desarrollados permite obtener resultados en 45 min una vez obtenido el DNA y sin el empleo de reactivos peligrosos como la poliacrilamida o el empleo de sondas que elevaría el costo del análisis, por lo que el uso de estos marcadores es factible y mostró ser funcional en productos enlatados, llegando a identificar a nivel especie.

4.3 Identificación de especies con Mml

En este trabajo se buscaron y evaluaron las opciones actuales para la identificación rápida de las seis especies de abulón del PNO mediante la amplificación de un Mml y eran escasas, encontramos que solo permitían identificar a nivel especie al abulón pinto/rayado (Supernault et al., 2010), por lo que era necesario realizar una secuenciación si se deseaba identificar al resto de las especies, o el empleo de técnicas laboriosas que implican la obtención de resultados en tiempos mayores a 48 horas (Aranceta-Garza et al., 2011).

La digestión del gen *COI* con la enzima de restricción *XbaI* (RFLP-PCR de *COI*) permitió la identificación correcta del abulón pinto/rayado del resto de las especies, pero el resultado es más tardado, por lo que la opción más rápida para identificar a esta especie es el marcador de *Lisina2*, sin embargo, a diferencia de lo reportado por Supernault et al., (2010), encontramos que no es adecuado, ya que presentó dímeros o

una banda inespecífica muy cercana al tamaño de banda espera (63 pb) en algunas muestras de abulón amarillo y rojo, lo cual nos llevaría a llegar a un posible falso positivo.

Solo dos marcadores *Ver13* y el IDHv5 (Figura 11) amplificaron de manera consistente en todas las muestras analizadas como para discriminar a nivel especie. El marcador *Ver13* pese a que presentó un patrón de bandeo que permite la identificación de más de una especie, también presenta bandeo inespecífico en todas las especies complicando su interpretación, siendo útil sólo como una prueba exploratoria. Mientras que, de los marcadores diseñados a partir de secuencias en este gen, solo el IDHv5 dio un patrón de bandeo para discriminar tres especies a la vez, siendo conveniente porque permite discriminar a las dos especies que se encuentran en peligro de extinción abulón chino y negro del abulón rojo que es cultivable y puede tener aplicabilidad en caso de no contar con un equipo de PCR en tiempo real que es necesario para la detección de los SNP por HRM, pero solo en tejido fresco, ya que no amplificaron en las muestras enlatadas a pesar de que el Mml IDHv5 es de bajo peso molecular (300-400 pb).

El tamaño del marcador parece no ser el único factor para elegir un Mml, ya que el *16S* de 500 pb sí amplificó en las mismas muestras que los SNP detectados por HRM, por lo que al diseñar Mml en regiones con un gran número de copias, como es el DNA mitocondrial podría ser una buena alternativa para muestras enlatadas. Dado estos resultados con el *16S*, se vuelve necesario, para futuros análisis, ver en qué regiones o genes se encuentran los marcadores SNP aquí desarrollados.

Debido a que existe la posibilidad de encontrar abulones híbridos en la naturaleza y existe interés por cultivarlos, es importante contar con marcadores que permitan identificarlos. Uno de los objetivos de esta investigación fue ver cómo se comportaban los SNP para HRM y los Mml evaluados en organismos híbridos, razón por la que los Mml en el DNA mitocondrial no fueron considerados como más informativos. Lamentablemente, el criterio de selección de los marcadores SNP no es el más adecuado para identificar híbridos y los Mml (*Ver13* y el IDHv5) tampoco permitieron su identificación.

No obstante, el pequeño panel de SNP para HRM (10 SNP) mostró un desempeño mejor que los Mml, ya que amplificaron en algunos de los productos enlatados. Por lo que el uso de los marcadores SNP informativos desarrollados en este estudio puede prevenir el comercio de especies prohibidas en otros países (DFO Fisheries and Oceans Canada, 2020; NMFS, 2021), permiten un control más estricto de los peligros para la inocuidad de los alimentos mediante la inclusión de riesgos potenciales por alérgenos alimentarios no declarados y evitar el fraude alimentario mediante la sustitución del abulón con otros moluscos de menor precio.

Por lo que los dos paneles reducidos (Atípicos, 24 SNP y Alelos Privados, 66 SNP), el pequeño panel de SNP para HRM (10 SNP), así como el Mml IDHv5 tienen aplicación potencial para el control de actividades ilegales, no declaradas y pesca no reglamentadas, como herramientas de trazabilidad alimentaria, contribuyendo a la sostenibilidad de estos recursos. Conjuntamente, solventan la necesidad de tener marcadores para la identificación de las seis especies y en especial la identificación del abulón chino y abulón negro, que tienen importancia comercial y de conservación para el comercio de México.

Disponer de herramientas rápidas y prácticas para identificar las especies es el primer paso para la protección de los recursos ya que permite el control y aplicación de medidas de manejo pesquero. Además, los métodos para identificación de especies son útiles para comprobar la información del etiquetado sobre la trazabilidad de los alimentos, desincentivando el fraude alimentario y el comercio de especies amenazadas. Los paneles de SNP desarrollados en este estudio, la detección de los SNP por HRM y las tres opciones de Mml que logran discriminar las seis especies de abulón del PNO pueden ser aplicadas en el control de rutina por parte de agencias gubernamentales, la industria y los estudios académicos.

4.4 Análisis poblacional del abulón negro

En este trabajo se buscó generar información que nos permitiera analizar por medio de marcadores SNP la diversidad genética del abulón negro en peligro crítico y complementar con lo reportado con SSR (Cepeda-Ochoa, 2019) para apoyar con información relevante para su consideración en el manejo de la especie a nivel comercial y de conservación. El trabajo abarcó muestras de dos sitios de California, una en la parte continental y otra procedente de una isla al sur de California, y muestras procedentes de la PBC en 6 sitios con una distancia de aproximadamente 350 km, resultando en una distancia de más de 950 km en total (Figura 5).

Se encontró un bajo nivel de divergencia genómico poblacional que divide en dos grupos a las localidades norteñas incluidas las de California (CMC, CSM, BJM, ITS, SLM, PBD, BTS), y las localidades sureñas (PCS y FSJ), esto se encuentra soportado por los análisis con F_{ST} , STRUCTURE y DAPC. Así mismo, existe un alto flujo genético entre las localidades norteñas y en menor grado de las localidades sureñas con respecto a las norteñas. A diferencia con lo encontrado con ocho SSR para la localidad sureña de FSJ, donde no se observó diferencias en las frecuencias alélicas, respecto a localidades más norteñas en la costa mexicana (Cepeda-Ochoa, 2019).

Por otra parte, FSJ fue la localidad con mayor número de alelos privados (AP) de las dos que presentaron AP (PBD con 5 y FSJ con 164), además de tener menos ingreso de migración relativa (Figura 14), consistente con ser la localidad con mayor coeficiente de endogamia, donde se observó una relación de parentesco entre hermanos en algunos pares de individuos de esta localidad.

Si bien, todas las localidades se encontraron en endogamia, como se esperaba en una especie tan reducida por muertes masivas y sobre pesca. La presencia de organismos no fue igual en todas las localidades, siendo más abundantes en BJM, SLM y FSJ, lo cual coincide con las localidades con mayor densidad de organismos/m² 0.2 ,0.08 y 0.1, respectivamente (Cepeda-Ochoa, 2019; Ibarra-Macias et al., 2019). Sin embargo, el Ne calculado fue menor en FSJ respecto al resto, indicando que el apareamiento entre hermanos está afectando el Ne, generando una disminución en la diversidad genética. Por lo que, probablemente se esté dando una retención larval local en FSJ, como se ha reportado en localidades de la costa continental en California (Gruenthal & Burton, 2008; Hamm & Burton, 2000).

Los organismos presentes son descendientes de los sobrevivientes a las mortalidades masivas en los 90s, si bien el agente causal de esas mortalidades se encuentra presente en toda la zona de la PBC (*rickettsia Candidatus Xenohaliotis californienses CXc*), principalmente en la zona sur (Cruz-Flores et al., 2016) y a pesar de que se han seguido presentando eventos Niño (NOAA, 2023), que por el aumento de la temperatura del agua deja susceptibles a los abulones ante la bacteria (Crosson et al., 2014), se ha logrado ver nuevamente al abulón negro en la zona continental de México, al grado que se ha determinado viable su captura por parte de las cooperativas (CONAPESCA, 2020; CONAPESCA & SEPESABC, 2018). A diferencia de lo reportado para las localidades de California, que a pesar de que cerraron pesquería desde 1997 y se enlistó al abulón negro como en peligro de extinción en 2009, no se ha logrado recuperar, sobre todo en aquellos lugares donde hay la presencia de CXc y una densidad menor de 0.34 organismos/m², densidad mínima necesaria para asegurar un asentamiento larval (Neuman et al., 2010).

Por lo que al presentar una mayor densidad de organismos FSJ favorece su asentamiento larval y al no llegar migrantes, con base en la migración relativa asimétrica con el resto de las localidades (Anexo D, Figura 23), incluso con PCS que es la localidad más cercana (aprox. 30 km), se promueve las diferencias encontradas en este estudio para esta localidad respecto al resto, como ya se mencionó antes. Además, no se encontró la presencia de marcadores que sugieran una adaptación local al momento de esta investigación.

Con SSR se reportó una migración a microescala entre las localidades norteñas, lo cual coincide con este estudio, pero discrepa en el flujo genético a macroescala de las localidades norteñas a FSJ (Cepeda-Ochoa, 2019). Aquí se observó ese flujo a macroescala, en sentido opuesto, de FSJ a las localidades norteñas (Anexo D, Figura 23). Si bien se presenta en menor grado, la distribución de los grupos por STRUCTURE y el F_{ST} nos indican que sí hubo un intercambio genético, el cual es con PBD (la otra localidad con AP y con relación de tercer grado en algunos pares de individuos), seguido de SLM, ITS (localidades con relación de parentesco del tercer grado) y BJM. Por lo que probablemente otros factores oceanográficos pueden estar variando esta señal de migración en la misma localidad, en diferente tiempo (SSR en 2018 y este trabajo con SNP 2021).

La baja diversidad genética en los individuos, presencia de AP y mayor densidad de organismos sugieren que FSJ está en expansión y posiblemente termine aislándose genéticamente del resto, como IGP que presentó diferencias genéticas con SSR e incluso se han observado diferencias morfológicas en los organismos (Cepeda-Ochoa, 2019; Geiger & Owen, 2019), fomentado por el difícil acceso a los organismos como para que se dé su captura ilegal o sobrepesca. Esta diferencia genética en IGP con respecto a las localidades de la costa continental también fue reportada con SNP en abulón azul (Mejía-Ruiz et al., 2020).

Sin embargo, en este trabajo las muestras no fueron suficientes para incluir IGP en el análisis y contrastar los resultados con los SSR. Ya que en abulón amarillo con SNP no se encontró diferencias genéticas entre FSJ e IGP a pesar de que tienen una distancia aproximadamente de 250 km (Mares-Mayagoitia et al., 2021), por lo que es necesario continuar con el monitoreo del abulón negro en estas localidades y ver si hay conectividad entre ellas.

PCS fue la otra localidad que presentó diferencias genéticas con el resto de las localidades norteñas, a diferencia con FSJ, esta localidad no se observó una buena densidad de organismos que pueda sugerir un buen reclutamiento de larvas para su recuperación natural. No obstante, PCS no presentó una migración relativa asimétrica y de acuerdo con los valores de F_{ST} se encontró que difiere con BJM, SLM y BTS (Tabla 8), por lo que probablemente presenta un flujo genético con más localidades, pero en menor grado que el que se da entre las localidades norteñas (Figura 14).

El contar con marcadores SNP puede apoyar al monitoreo de esta especie y dado que se reanuda su captura comercial con base en la densidad que evalúan las cooperativas, es necesario contar con información genética de las localidades que pueden ser más afectadas y es necesario proteger o identificar localidades susceptibles para translocar organismos como medidas de repoblamiento en lugares donde ya

desapareció el abulón negro. Para este tipo de decisiones es importante contar la información genética por sitios y monitorear este tipo de estrategias para saber si realmente hay una recuperación con una diversidad genética que les permita a los organismos soportar próximos eventos Niño, o generar estrategias de conservación como se hace para el abulón azul y amarillo con producción de semilla.

Capítulo 5. Conclusiones

5.1 SNP para la identificación de especies de abulón del PNO

El panel Total (1,127 SNP) permite la identificación de especies de abulón presentes en el Pacífico Nororiental (*H. fulgens* azul, *H. corrugata* amarillo, *H. rufescens* rojo, *H. cracherodii* negro y *H. kamtschatkana* pinto/rayado).

El panel Alelos Privados presentó un desempeño igual que el panel Total de 1,127 SNP con tan solo 66 SNP, haciéndolo una herramienta con potencial aplicación para la identificación y trazabilidad de estas cinco especies. Mientras que el panel Atípicos (24 SNP) permite la discriminación de cuatro especies, agrupa al abulón rojo con el pinto/rayado. Por lo que el mejor criterio para la selección de SNP más informativos fue el de alelos privados.

El pequeño panel de SNP (10 SNP) para su detección por HRM seleccionados del panel Alelos Privados permitió la correcta asignación de las seis especies de abulón del PNO, con resultados rápidos y sencillos de interpretar, incluso en productos enlatados.

5.2 Comparación de Mml y detección de SNP por HRM para identificación de abulones del PNO

Las opciones de Mml reportados hasta la fecha para la identificación rápida de abulones del PNO fueron escasas y solo permitían identificar a nivel especie al abulón pinto/rayado. De las dos opciones para identificar esta especie la mejor opción fue el RFLP-PCR del gen *COI* con la enzima de restricción *XbaI*, lo cual consume más tiempo que un resultado por PCR o HRM.

El marcador *Lisina1*, *16S*, *COI* y tres marcadores diseñados a partir de la secuencia de *VerI* no permitieron diferenciar entre las seis especies del Pacífico mexicano, ya que dieron un amplicón del mismo tamaño para las seis especies.

El marcador *Verl3* mostró un patrón de bandas diferente en las seis especies de abulones, pero con bandas inespecíficas que no se observan en todos los organismos analizados, incluso si son de la misma especie, por lo que es conveniente considerar la banda más intensa para su análisis y no es recomendable su uso como único marcador para la identificación de especies, ya que puede ser impreciso.

El diseño de oligonucleótidos a partir de la secuenciación del gen *Verl* nos permitió diseñar un marcador IDHv5 capaz de discriminar a la vez entre tres de las seis especies de abulón, el abulón negro y chino, ambas en peligro de extinción y el abulón rojo, la especie cultivable, pero solo en muestras de tejido fresco.

En productos enlatados es difícil contar con DNA mayor de 300 pb, generalmente. Por lo que el desarrollo de SNP y su detección por HRM es más factible, accesible y rápido. Donde el pequeño panel de SNP para HRM probó su aplicabilidad y funcionabilidad en productos enlatados, a diferencia de los Mml *Lisina2*, *Verl3* y IDHv5 que no amplificaron en ninguna muestra de este tipo.

Los Mml *Lisina2*, *Verl3* y IDHv5 y los SNP para HRM no permitieron la identificación de las dos especies que conforman a los organismos híbridos, identificaron a una sola, por lo que no se consideran adecuados para su identificación.

Tanto los marcadores SNP desarrollados en este estudio y su detección por HRM como los Mml para la identificación de especies, pueden ser herramientas para emplearse como pruebas de rutina, lo cual apoyaría a comprobar la información del etiquetado sobre la trazabilidad de los alimentos, proporcionar herramientas rápidas y sencillas para la conservación del recurso abulón; además de desincentivar se realicen prácticas de fraude alimentario y/o el comercio de especies amenazadas.

5.3 Análisis poblacional del abulón negro

Se encontró una ligera estructura genómica que divide en dos grupos a las localidades norteñas (BJM, ITS, SLM, PBD, BTS), incluidas las de California (CMC y CSM), y las localidades sureñas (PCS y FSJ), donde a pesar de su distancia geográfica (aprox. 300 km), mostraron tener un alto flujo genético entre ellas. No se encontró evidencia que esta diferenciación fuera por adaptación local de los individuos de PCS y FSJ, sino más bien por una baja diversidad por efecto de deriva genética promovida por una reciente colonización y un apareamiento entre familiares, mantenida por una posible retención larval local.

Todas las localidades se encontraron en endogamia, como se esperaba en una especie tan reducida por muertes masivas y sobre pesca, tres localidades presentaron parentesco de tercer grado entre individuos (PBD, SLM e ITS) y una localidad presentó relación de parentesco entre hermanos (FSJ). La cual presentó menor migración relativa y en consecuencia el mayor coeficiente de endogamia, un tamaño efectivo poblacional alarmante de $N_e=2$.

A pesar de que no se logró obtener marcadores *outliers* que pudiesen ser evaluados para hacer una asignación de origen, se logró obtener información genómica y genética, además de la relación que existe entre las localidades, donde nuevamente se observa el abulón negro. Información que puede contribuir para tomar medidas para un mejor manejo y conservación de la especie.

Por lo que se recomienda continuar con el monitoreo de las localidades donde nuevamente se observa el abulón negro y emplear estos marcadores para evaluar posible divergencia genética principalmente en las localidades sureñas. Así como las herramientas diseñadas en este trabajo para estimular la conservación y manejo sustentable del recurso abulón.

Literatura citada

- Aguilera-Muñoz, F., Valenzuela-Muñoz, V., & Gallardo-Escárate, C. (2008). Authentication of commercial Chilean mollusks using ribosomal internal transcribed spacer (ITS) as specie-specific DNA marker. *Gayana (Concepción)*, 72(2), 178–187. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382008000200007>
- Anderson, E. C. (2010). Assessing the power of informative subsets of loci for population assignment: standard methods are upwardly biased. *Molecular Ecology Resources*, 10(4), 701–710. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02846.x>
- 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(1), 323. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-323>
- Aranceta-Garza, F., Perez-Enriquez, R., & Cruz, P. (2011). PCR-SSCP method for genetic differentiation of canned abalone and commercial gastropods in the Mexican retail market. *Food Control*, 22(7), 1015–1020. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.025>
- Araneda, C., Larraín, M. A., Hecht, B., & Narum, S. (2016). Adaptive genetic variation distinguishes Chilean blue mussels (*Mytilus chilensis*) from different marine environments. *Ecology and Evolution*, 6(11), 3632–3644. <https://doi.org/10.1002/ece3.2110>
- Arciniega-De Los Santos, A. (2012). *Identificación molecular de larvas de moluscos gasterópodos mediante el gen 18S ARNr* [Tesis de maestría]. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Zachary, A., Selker, E. U., Cresko, W. A., & Johnson, E. A. (2008). *Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers*. 3(10), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003376>
- Beldade, R., Bell, C. A., Raimondi, P. T., George, M. K., Miner, C. M., & Bernardi, G. (2012). Isolation and characterization of 8 novel microsatellites for the black abalone, *Haliotis cracherodii*, a marine gastropod decimated by the withering disease. *Conservation Genetics Resources*, 4(4), 1071–1073. <https://doi.org/10.1007/s12686-012-9709-3>
- Bernatchez, L., Wellenreuther, M., Araneda, C., Ashton, D. T., Barth, J. M. I., Beacham, T. D., Maes, G. E., Martinsohn, J. T., Miller, K. M., Naish, K. A., Ovenden, J. R., Primmer, C. R., Young Suk, H., Therkildsen, N. O., & Withler, R. E. (2017). Harnessing the Power of Genomics to Secure the Future of Seafood. *Trends in Ecology and Evolution*, 32(9), 665–680. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2017.06.010>
- Buglione, M., Petrelli, S., Notomista, T., de Filippo, G., Gregorio, R., & Fulgione, D. (2020). Who is who? High Resolution Melting analysis to discern between hare species using non-invasive sampling. *Conservation Genetics Resources*, 12(4), 727–732. <https://doi.org/10.1007/s12686-020-01153-9>
- Busch, S., Friedman, C., Gruenthal, K., Gustafson, R., & Kushner, D. (2014). Status Review Report for Pinto Abalone (*Haliotis kamtschatkana*). *Noaa*, 1–240. <http://www.nmfs.noaa.gov/pr/species/StatusReviews/pinto-abalone-status-review-2014.pdf>

- Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., & Cresko, W. A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 3124–3140. <https://doi.org/10.1111/mec.12354>
- Cepeda-Ochoa, M. (2019). Caracterización genética poblacional del abulón negro (*Haliotis cracherodii*) en Baja California, México [Tesis de maestría]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Chagné, D. (2015). Application of the High-Resolution Melting Technique for Gene Mapping and SNP Detection in Plants. En J. Batley (Ed.), *Plant Genotyping: Methods and Protocols* (Vol. 1245, pp. 151–159). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1966-6>
- Chambers, M. D., VanBlaricom, G. R., Hauser, L., Utter, F., & Friedman, C. S. (2006). Genetic structure of black abalone (*Haliotis cracherodii*) populations in the California islands and central California coast: Impacts of larval dispersal and decimation from withering syndrome. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 331(2), 173–185. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2005.10.016>
- Chan, W.-H., Ling, K.-H., Shaw, P.-C., Chiu, S.-W., & Pui-Hay But, P. (2012). Application of FINS and multiplex PCR for detecting genuine abalone products. *Food Control*, 23, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.024>
- CONAPESCA. (2017). *Anuario estadístico de Acuicultura y Pesca*. <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca>
- CONAPESCA. (2020). *Producción pesquera por estado*. SIAP- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. http://www.campomexicano.gob.mx/raw_pesca_gobmx/seccionar.php
- CONAPESCA, S. S., & SEPESABC, 2018. (2018). *Informe estadístico Resumen Anual de Producción Pesquera y Acuícola de Baja California*. <https://www.ceieg.bajacalifornia.gob.mx/wp-content/uploads/2023/01/Produccion-Pesquera-y-Acuicola-por-especi.pdf>
- Cook, P. A. (2014). The Worldwide Abalone Industry Peter. *Modern Economy*, 5, 1181–1186. <https://doi.org/10.4236/me.2014.513110>
- Córdova-Secundino, E. (2018). Diversidad genética de poblaciones naturales y de cultivo de abulón rojo (*Haliotis rufescens*) en localidades de California y Baja California [Tesis de Maestría]. CICESE.
- Cox Keith W. (1962). *California Abalones, Family Haliotidae*.
- Crosson, L., Wight, N., VanBlaricom, G., Kiryu, I., Moore, J., & Friedman, C. (2014). Abalone withering syndrome: distribution, impacts, current diagnostic methods and new findings. *Diseases of Aquatic Organisms*, 108(3), 261–270. <https://doi.org/10.3354/dao02713>
- Cruz-Flores, R. (2013). *Distribución, prevalencia e intensidad de Xenohaliotis californiensis parásito del abulón Haliotis fulgens y Haliotis corrugata, en la península de Baja California, México* [Tesis de Maestría]. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Cruz-Flores, R., Cáceres-Martínez, J., Muñoz-Flores, M., Vásquez-Yeomans, R., Hernández Rodríguez, M., Ángel Del Río-Portilla, M., Rocha-Olivares, A., & Castro-Longoria, E. (2016). Hyperparasitism by the bacteriophage (*Caudovirales*) infecting Candidatus *Xenohaliotis californiensis* (Rickettsiales-like prokaryote) parasite of wild abalone *Haliotis fulgens* and *Haliotis corrugata* from the Peninsula of

- Baja California, Mexico. *Journal of Invertebrate Pathology*, 140, 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.09.001>
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., & Durbin, R. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156–2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- Davey, J. L., & Blaxter, M. W. (2011). RADseq: Next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics*, 9(5), 416–423. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elq031>
- De Wit, P., & Palumbi, S. R. (2013). Transcriptome-wide polymorphisms of red abalone (*Haliotis rufescens*) reveal patterns of gene flow and local adaptation. *Molecular Ecology*, 22(11), 2884–2897. <https://doi.org/10.1111/mec.12081>
- del Rio-Lavín, A., Díaz-Arce, N., Larraín, M. A., Araneda, C., Rodríguez-Ezpeleta, N., Jiménez, E., & Pardo, M. Á. (2022). Population structure and geographic origin assignment of *Mytilus galloprovincialis* mussels using SNPs. *Aquaculture*, 550(737836), 737836. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737836>
- DFO Fisheries and Oceans Canada. (2020). *Species at Risk Act (SARA)*. 2019-11-29. <https://www.dfo-mpo.gc.ca/species-especies/profiles-profil/northernabalone-ormeaunordique-eng.html>
- Diario Oficial de la Federación (DOF). (1994). *Aviso por el que se da a conocer el establecimiento de épocas y zonas de veda para la pesca de diferentes especies de la fauna acuática en aguas de jurisdicción federal de los Estados Unidos Mexicanos*. Miércoles 16 de marzo de 1994. http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4678590&fecha=16/03/1994
- Dimond, J. L., Bouma, J. V., Carson, H. S., Gavery, M. R., O'Brien, C., Simchick, C., & Sowul, K. (2022). Efficacy of Endangered Pinto Abalone (*Haliotis kamtschatkana*) Stock Restoration in the Southern Salish Sea From a Genomic Perspective. *Frontiers in Conservation Science*, 3(June), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcosc.2022.911218>
- Druml, B., & Cichna-Markl, M. (2014). High resolution melting (HRM) analysis of DNA - Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*, 158, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.111>
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). Structure Harvester: A website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- FAO. (2020). *Producción acuícola mundial*. FIGIS-Colecciones de Estadísticas de Pesca. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/es>
- FAO y OMS. (2007). *Etiquetado de los alimentos* (Quinta edi). <https://www.fao.org/3/a1390s/a1390s.pdf>
- Figueras Huerta, A., & Martínez Portela, P. (2009). *Genética y Genómica en Acuicultura*.
- Foll, M. (2012). *BayeScan v2.1 User Manual*. 10 pp. <http://www.gnu.org/licenses/>

- Foll, M., & Gaggiotti, O. (2008). A Genome-Scan Method to Identify Selected Loci Appropriate for Both Dominant and Codominant Markers: A Bayesian Perspective. *Genetics*, 180(2), 977–993. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.092221>
- Geiger, D. L., & Owen, B. (2012). *Abalone Worldwide Haliotidae*.
- Geiger, D. L., & Owen, B. (2019). The family Haliotidae Rafinesque, 1815 in the northeast Pacific. *Zoosymposia*, 13(1), 53–60. <https://doi.org/10.11646/zoosymposia.13.1.6>
- Gruenthal, K. M. (2007). Conservation genetics of California abalone species [PhD, University of California, San Diego Conservation]. En *Marine Ecology Progress Series*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2648.2008.04878.x/abstract>
- Gruenthal, K. M., & Burton, R. S. (2005). Genetic diversity and species identification in the endangered white abalone (*Haliotis sorenseni*). *Conservation Genetics*, 6(6), 929–939. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9079-4>
- Gruenthal, K. M., & Burton, R. S. (2008). Genetic structure of natural populations of the California black abalone (*Haliotis cracherodii* Leach, 1814), a candidate for endangered species status. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 355(1), 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2007.11.013>
- Gruenthal, K. M., Witting, D. A., Ford, T., Neuman, M. J., Williams, J. P., Pondella, D. J., Bird, A., Caruso, N., Hyde, J. R., Seeb, L. W., & Larson, W. A. (2014). Development and application of genomic tools to the restoration of green abalone in southern California. *Conservation Genetics*, 15(1), 109–121. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0524-5>
- Ha, W. Y., Reid, D. G., Kam, W. L., Lau, Y. Y., Sham, W. C., Tam, S. Y. K., Sin, D. W. M., & Mok, C. S. (2011). Genetic differentiation between fake abalone and genuine *Haliotis* species using the forensically informative nucleotide sequencing (FINS) method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5195–5203. <https://doi.org/10.1021/jf104892n>
- Hamm, D. E., & Burton, R. S. (2000). Population genetics of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the central California coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 254(2), 235–247. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(00\)00283-5](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(00)00283-5)
- Hawk, H. L., & Geller, J. B. (2019). DNA entombed in archival seashells reveals low historical mitochondrial genetic diversity of endangered white abalone *Haliotis sorenseni*. *Marine and Freshwater Research*, 70(3), 359–370. <https://doi.org/10.1071/MF17342>
- Helyar, S. J., Hemmer-Hansen, J., Bekkevold, D., Taylor, M. I., Ogden, R., Limborg, M. T., Cariani, A., Maes, G. E., Diopere, E., Carvalho, G. R., & Nielsen, E. E. (2011). Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: New opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources*, 11(SUPPL. 1), 123–136. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02943.x>
- Ibarra-Macias, B., Montaña-Moctezuma, G., Raimondi, P.T., F., N., Beas-Luna, R., Abadia-Cardoso, A., Lorda-Solorzano, J., & Lafarga-de la Cruz, F. (2019). Black abalone status in Baja California, Mexico. Identifying critical sites to promote its recovery. En *Western Society of Naturalists 100th Annual Meeting*. 31 de octubre al 3 de noviembre.

- INAPESCA. (2018). Carta Nacional Pesquera Tercera Sección. En *DOF* (Vol. 23, Número 3, p. 6). <https://doi.org/10.5281/zenodo.1477753>
- IUCN. (2023). *The IUCN Red List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org/search/list?query=abalone&searchType=species>
- Jilberto, F., Araneda, C., & Larraín, M. A. (2017). High resolution melting analysis for identification of commercially-important *Mytilus* species. *Food Chemistry*, 229, 716–720. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.109>
- Jombart, T., & Ahmed, I. (2011). *adegenet 1.3-1*: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, 11(1), 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>
- Jullien, Nicolas. (2019). *AmplifX 2.0.7* (2.0.7). <https://inp.univ-amu.fr/en/amplifx-manage-test-and-design-your-primers-for-pcr%22>
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., & Grünwald, N. J. (2014). *Poppr*: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2(1), e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T. F., Crozier, W. W., & Prodöhl, P. A. (2013). DiveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(8), 782–788. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>
- Kirk, H., & Freeland, J. R. (2011). Applications and Implications of Neutral versus Non-neutral Markers in Molecular Ecology. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(6), 3966–3988. <https://doi.org/10.3390/ijms12063966>
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). `Clumpak`: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across *K*. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
- Larraín, M. A., Díaz, N. F., Lamas, C., Uribe, C., & Araneda, C. (2014). Traceability of mussel (*Mytilus chilensis*) in southern Chile using microsatellite molecular markers and assignment algorithms. Exploratory survey. *Food Research International*, 62, 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.016>
- Larraín, M. A., González, P., Pérez, C., & Araneda, C. (2019). Comparison between single and multi-locus approaches for specimen identification in *Mytilus* mussels. *Scientific Reports*, 9(1), 19714. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55855-8>
- Larraín, M. A., Zbawicka, M., Araneda, C., Gardner, J. P. A., & Wenne, R. (2018). Native and invasive taxa on the Pacific coast of South America: Impacts on aquaculture, traceability and biodiversity of blue mussels (*Mytilus* spp.). *Evolutionary Applications*, 11(3), 298–311. <https://doi.org/10.1111/eva.12553>

- Li, H., & Durbin, R. (2010). Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26(5), 589–595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, Q., Park, C., Endo, T., & Kijima, A. (2004). Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hannai*). *Aquaculture*, 235(1–4), 207–222. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2003.12.018>
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., & Wittwer, C. (2004). Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons. *Clinical Chemistry*, 50(7), 1156–1164. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.032136>
- Lischer, H. E. L., & Excoffier, L. (2012). PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28(2), 298–299. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr642>
- Luu, K., Bazin, E., & Blum, M. G. B. (2017). *pcadapt*: an `R` package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. *Molecular Ecology Resources*, 17(1), 67–77. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12592>
- Manichaikul, A., Mychaleckyj, J. C., Rich, S. S., Daly, K., Sale, M., & Chen, W.-M. (2010). Robust relationship inference in genome-wide association studies. *Bioinformatics*, 26(22), 2867–2873. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq559>
- Mares-Mayagoitia, J. A., De-Anda-Montañez, J. A., Perez-Enriquez, R., Mejía-Ruíz, P., Gutiérrez-González, J. L., & Valenzuela-Quíñonez, F. (2021). Neutral and adaptive population structure of pink abalone (*Haliotis corrugata*): fishery management implications. *ICES Journal of Marine Science*, 78(5), 1909–1919. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsab098>
- Marini, S. J., Vanzetti, L. S., & Borelli, V. S. (2012). RYR1 gene variability and effect on meat pH in Argentinean hybrids swines. *InVet*, 14(1), 19–23. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982012000100002
- Marsjan, P., & Oldenbroek, J. (2006). Molecular markers – a tool for genetic diversity.pdf. En FAO research report (Ed.), *The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture* (pp. 359–379). FAO.
- Masonbrink, R. E., Purcell, C. M., Boles, S. E., Whitehead, A., Hyde, J. R., Seetharam, A. S., & Severin, A. J. (2019). An annotated genome for *Haliotis rufescens* (Red Abalone) and resequenced Green, Pink, Pinto, Black, and White Abalone Species. *Genome Biology and Evolution*, 11(2), 431–438. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz006>
- Meirmans, P. G. (2020). `genodive` version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 1126–1131. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13145>

- Mejía-Ruiz, P., Perez-Enriquez, R., Mares-Mayagoitia, J. A., & Valenzuela-Quiñonez, F. (2020). Population genomics reveals a mismatch between management and biological units in green abalone (*Haliotis fulgens*). *PeerJ*, 8(190965), e9722. <https://doi.org/10.7717/peerj.9722>
- Metz, E. C., Robles-Sikisaka, R., & Vacquier, V. D. (1998). Nonsynonymous substitution in abalone sperm fertilization genes exceeds substitution in introns and mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(18), 10676–10681. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10676>
- Moltschaniwskyj, N. A., Hall, K., Lipinski, M. R., Marian, J. E. A. R., Nishiguchi, M., Sakai, M., Shulman, D. J., Sinclair, B., Sinn, D. L., Staudinger, M., Van Gelderen, R., Villanueva, R., & Warnke, K. (2007). Ethical and welfare considerations when using cephalopods as experimental animals. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 17(2–3), 455–476. <https://doi.org/10.1007/s11160-007-9056-8>
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 32(2), 261–285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>
- Negrini, R., Nicoloso, L., Crepaldi, P., Milanesi, E., Marino, R., Perini, D., Pariset, L., Dunner, S., Leveziel, H., Williams, J. L., & Ajmone Marsan, P. (2008). Traceability of four European Protected Geographic Indication (PGI) beef products using Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and Bayesian statistics. *Meat Science*, 80(4), 1212–1217. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.021>
- Neuman, M., Tissot, B., & Vanblaricom, G. (2010). Overall Status and Threats Assessment of Black Abalone (*Haliotis Cracherodii* Leach, 1814) Populations in California. *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 577–586. <https://doi.org/10.2983/035.029.0305>
- NMFS. (2021). NOAA Fisheries, ESA Threatened & Endangered. Abalone. <https://www.fisheries.noaa.gov/species-directory/threatened-endangered>
- NOAA. (2023). Southwest Fisheries Science Center. Abalone. <https://www.fisheries.noaa.gov/about/fisheries-resources-division-southwest-fisheries-science-center>
- Oceana. (2019). *Fraude y sustitución en la comida del mar*. www.gatoxliebre.org
- Ogden, R. (2008). Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries*, 9(4), 462–472. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2008.00305.x>
- Ogden, R., & Linacre, A. (2015). Wildlife forensic science: A review of genetic geographic origin assignment. *Forensic Science International: Genetics*, 18(September 2009), 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.02.008>
- Olsen, P., & Borit, M. (2013). How to define traceability. *Trends in Food Science & Technology*, 29(2), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.10.003>
- Olsen, P., & Borit, M. (2018). The components of a food traceability system. *Trends in Food Science and Technology*, 77, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.004>

- Orland, C., Escalona, M., Sahasrabudhe, R., Marimuthu, M. P. A., Nguyen, O., Beraut, E., Marshman, B., Moore, J., Raimondi, P., & Shapiro, B. (2022). A Draft Reference Genome Assembly of the Critically Endangered Black Abalone, *Haliotis cracherodii*. *Journal of Heredity*, 113(6), 665–672. <https://doi.org/10.1093/jhered/esac024>
- Owen, B., & Raffety, A. (2017). *Haliotis kamtschatkana* Jonas, 1845 – a Single Species, not a Pair of Subspecies. *The Festivus*, 49(1), 18–32.
- Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26(3), 419–420. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp696>
- Parimoo, S., & Parimoo, B. (2003). Sample Preparation in DNA Analysis. En M. Somenath (Ed.), *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry* (J. D. Wine, pp. 271–300). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471457817.ch6>
- Park, C.-J., & Kijima, A. (2006). RFLP Analysis of the mtDNA COI Region in Four Abalone Species. *Fisheries and aquatic sciences*, 9(3), 101–106. <https://doi.org/10.5657/fas.2006.9.3.101>
- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., & Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L., & Estoup, A. (2004). GENECLASS2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, 95(6), 536–539. <https://doi.org/10.1093/jhered/esh074>
- Ponce-Díaz, G., Arreguín-Sánchez, F., Hernández-Llamas, A., del Monte-Luna, P., & Ramade-Villanueva, M. (2013). Estimación de la captura ilegal de abulón y langosta en la costa de la península de Baja California. *Ciencias Marinas*, 39(3), 323–329. <https://doi.org/10.7773/cm.v39i3.2197>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2), 945–959. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Privé, F., Luu, K., Vilhjálmsson, B. J., Blum, M. G. B., & Rosenberg, M. (2020). Performing Highly Efficient Genome Scans for Local Adaptation with R Package pcadapt Version 4. *Molecular Biology and Evolution*, 37(7), 2153–2154. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa053>
- Purcell, C., Severin, A., Sylvia, P., Wegner, N., Hyde, J., Purcell, C., Severin, A., Sylvia, P., Wegner, N., & Hyde, J. (2017). *Improving Aquaculture Production in Haliotis Species through the Development of a Genomic Toolkit*. 45, 21–27. <https://www.fra.affrc.go.jp/bulletin/bull/bull45/45-0503.pdf>
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
- Quintrel, M., Jilberto, F., Sepúlveda, M., Marín, M. E., Véliz, D., Araneda, C., & Larraín, M. A. (2021). Development and Validation of a Multi-Locus PCR-HRM Method for Species Identification in *Mytilus* Genus with Food Authenticity Purposes. *Foods*, 10(8), 1684. <https://doi.org/10.3390/foods10081684>

- Reitzel, A. M., Herrera, S., Layden, M. J., Martindale, M. Q., & Shank, T. M. (2013). Going where traditional markers have not gone before: Utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 2953–2970. <https://doi.org/10.1111/mec.12228>
- Rentería-Alcántara, M. (2000). Marcadores moleculares una herramienta para explorar la diversidad genética. En *Estado de la cuestión en la gestión de los recursos zoo genéticos* (Vol. 18, pp. 541–566). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2008.01080.x>
- Ríos Jara, E., Esqueda González, M. del C., & Galván Villa, C. M. (2007). *Estudios sobre Malacología y Conquiliología en México* (Eduardo Rí). Primera edición, 2007.
- Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., & Wittwer, C. T. (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 245(2), 154–160. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.9916>
- Rochette, N. C., And, & Catchen, J. M. (2017). Deriving genotypes from RAD-seq short-read data using Stacks. *Nature Protocols*, 12(12), 2640–2659.
- Rogers-Bennett, L., Allen, B. L., & Rothaus, D. P. (2011). Status and habitat associations of the threatened northern abalone: importance of kelp and coralline algae. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 21(6), 573–581. <https://doi.org/10.1002/aqc.1218>
- Searcy-Bernal, R., Ramade-Villanueva, M., & Benito, A. (2010). Current Status of Abalone Fisheries and Culture in Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 29(3), 573–576. <https://doi.org/10.2983/035.029.0304>
- Secretaría de Pesca. (1987). *ACUERDO que establece medidas de regulación para la extracción de abulón*. DOF- Diario Oficial de la Federación. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4663148&fecha=29/06/1987
- SEPESCA. (2018). *Carta Estatal Pesquera de Baja California 2018*. <https://docplayer.es/20458666-Carta-estatal-pesquera-de-baja-california.html>
- Sierra-Rodríguez, P., Muciño-Díaz, M., Gutiérrez-González, J. L., & Turrubiates-Morales, J. R. (2006). *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México Evaluación y Manejo* (J. Cuellar P. & C. o Cadena, Eds.). Instituto Nacional de la Pesca. https://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/pelagicos/libro_Rojo.pdf
- Slabbert, R., & Roodt-Wilding, R. (2006). Non-destructive sampling of juvenile abalone using epipodial tentacles and mucus: Method and application. *African Journal of Marine Science*, 28(3–4), 719–721. <https://doi.org/10.2989/18142320609504221>
- Stierhoff, K. L., Neuman, M., & Butler, J. L. (2012). On the road to extinction? Population declines of the endangered white abalone, *Haliotis sorenseni*. *Biological Conservation*, 152, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2012.03.013>
- Storer, C. G., Pascal, C. E., Roberts, S. B., Templin, W. D., Seeb, L. W., & Seeb, J. E. (2012). Rank and Order: Evaluating the Performance of SNPs for Individual Assignment in a Non-Model Organism. *PLoS ONE*, 7(11), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049018>

- Streit, K., Geiger, D. L., & Lieb, B. (2006). Molecular phylogeny and the geographic origin of haliotidae traced by haemocyanin sequences. *Journal of Molluscan Studies*, 72(1), 105–110. <https://doi.org/10.1093/mollus/evi048>
- Sundqvist, L., Keenan, K., Zackrisson, M., Prodöhl, P., & Kleinhans, D. (2016). Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecology and Evolution*, 6(11), 3461–3475. <https://doi.org/10.1002/ece3.2096>
- Supernault, K. J., Demsky, A., Campbell, A., Ming, T. J., Miller, K. M., & Withler, R. E. (2010). Forensic genetic identification of abalone (*Haliotis* spp.) of the northeastern Pacific Ocean. *Conservation Genetics*, 11(3), 855–865. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-9925-x>
- Sweijid, N. A., Bowie, R. C. K., Lopata, A. L., Marinaki, A. M., Harley, E. H., & Cook, P. A. (1998). A PCR technique for forensic, species-level identification of abalone tissue. *Journal of Shellfish Research*, 17(3), 889–895. https://www.researchgate.net/publication/279902874_A_PCR_technique_for_forensic_species-level_identification_of_abalone_tissue
- Szpiech, Z. A., & Rosenberg, N. A. (2011). On the size distribution of private microsatellite alleles. *Theoretical Population Biology*, 80(2), 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2011.03.006>
- Takezaki, N., Nei, M., & Tamura, K. (2010). POPTREE2: Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows interface. *Molecular biology and evolution*, 27(4), 747–752. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSP312>
- Tegner, M. J., Basch, L. V., & Dayton, P. K. (1996). Near extinction of an exploited marine invertebrate. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(7), 278–280. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)30029-3](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)30029-3)
- Vadopalas, B., Bouma, J. V., Jackels, C. R., & Friedman, C. S. (2006). Application of real-time PCR for simultaneous identification and quantification of larval abalone. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 334(2), 219–228. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.02.005>
- Valenzuela-Muñoz, V., Araya-Garay, J. M., & Gallardo-Escárate, C. (2013). SNP discovery and High Resolution Melting Analysis from massive transcriptome sequencing in the California red abalone *Haliotis rufescens*. *Marine Genomics*, 10, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2012.12.003>
- Valenzuela-Quiñonez, F. (2016). How fisheries management can benefit from genomics? *Briefings in Functional Genomics*, 15(5), 352–357. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elw006>
- Vanblaricom, G., Neuman, M., Butler, J., Devogelaere, A., Mobley, C., Richards, D., Rumsey, S., & Taylor, B. (2009). *Status Review Report for Black Abalone (Haliotis cracherodii Leach, 1814)* (Número January). <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.172.3971&rep=rep1&type=pdf>
- Vandenhoute, M., & Jérôme, L. (2016). *La trazabilidad: una herramienta de gestión para las empresas y los gobiernos*.
- Vázquez, A., Yurén, L., & Morales García, A. E. (2011). Microsatélites. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* (Número Hancock 1999, pp. 75–100). <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/microsatelites.pdf>

- Verrez-Bagnis, V., Sotelo, C. G., Mendes, R., Silva, H., Kappel, K., & Schröder, U. (2018). *Methods for Seafood Authenticity Testing in Europe*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_69
- Wenne, R. (2018). Single nucleotide polymorphism markers with applications in aquaculture and assessment of its impact on natural populations. *Aquatic Living Resources*, 31, 2. <https://doi.org/10.1051/alr/2017043>
- Whitlock, M. C., & Lotterhos, K. E. (2015). Reliable Detection of Loci Responsible for Local Adaptation: Inference of a Null Model through Trimming the Distribution of F_{ST} . *The American Naturalist*, 186(S1), S24–S36. <https://doi.org/10.1086/682949>
- Wilson, J., Matejusova, I., McIntosh, R. E., Carboni, S., & Bekaert, M. (2018). New diagnostic SNP molecular markers for the *Mytilus* species complex. *PLoS ONE*, 13(7), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200654>
- Zamora-Garcia, N. I. (2016). *La pesca ilegal de abulón en la Península de Baja California: cuantificación y normatividad* [Tesis de maestría]. Instituto Politécnico Nacional. La Paz, B. C. S.

Anexos

Anexo A.

Tabla 10. Parámetros seleccionados para el análisis DAPC y número de grupos extraídos (k) para los tres paneles Total, Atípicos y Alelos Privados.

Panel	N.º variables (alelos)	N.º PCA*	NPC PCA in DA**	Termino de varianza	N.º de grupos (k)
Total	2254	500	50	0.9201	5
Atípicos	48	35	20	0.9928	4
Alelos Privados	132	65	25	0.9871	5

* Numero de PCA extraído en el análisis de componentes principales.

** Numero de PCA (variables) usadas en el análisis linear discriminante.

Tabla 11. Número de individuos de las cinco especies de *Haliotis* asignadas en grupos DAPC, empleando las dos primeras funciones lineales discriminantes para los tres paneles de SNP.

	Panel Total/ Panel Alelos Privados					Panel Atípicos				
	Rojo	Amarillo	Azul	Negro	Pinto/ rayado	Rojo	Amarillo	Azul	Negro	Pinto/ rayado
Grupo 1	110					110				
Grupo 2	24					24				
Grupo 3	35					35				
Grupo 4	42					42				
Grupo 5	12									

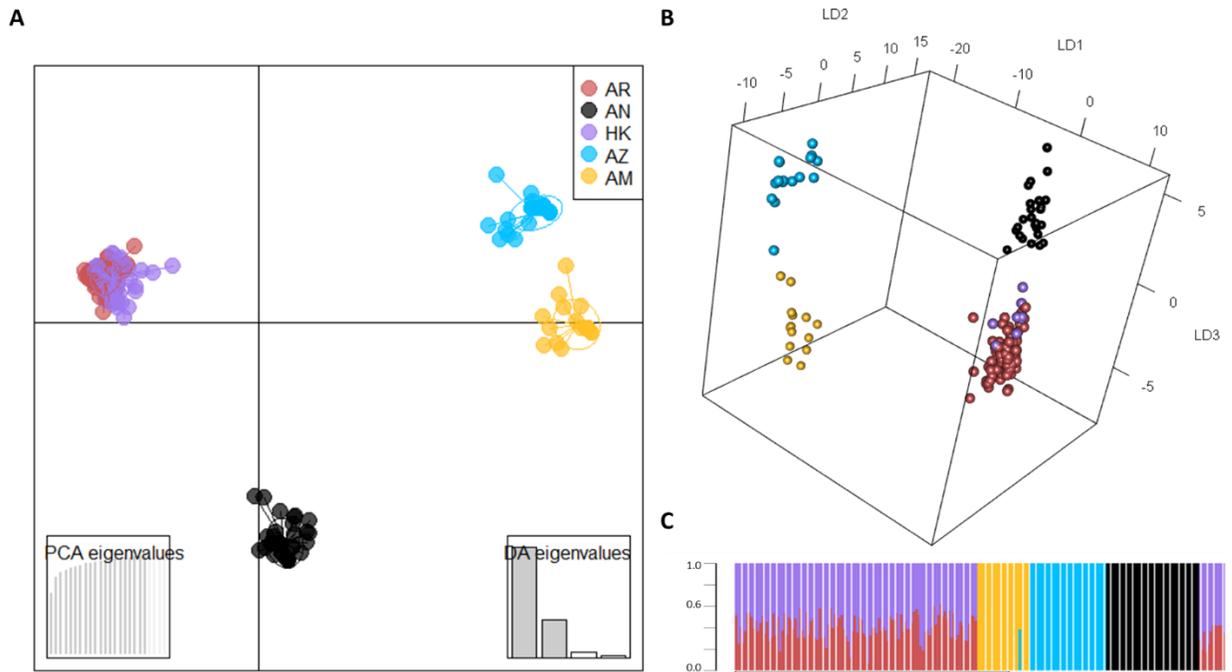


Figura 18. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para el panel Atípicos (24SNP). A: Representación 2D (LD1 y LD2) con agrupaciones señales con hélices; B: Representación 3D (LD1, LD2 y LD3); C: Probabilidad de pertenencia de cada individuo a cada especie. Los puntos representan cada individuo con diferente color por especie: rojo (*H. rufescens*), amarillo (*H. corrugata*), azul (*H. fulgens*), negro (*H. cracherodii*) y rayado/pinto (*H. kamtschatkana*).

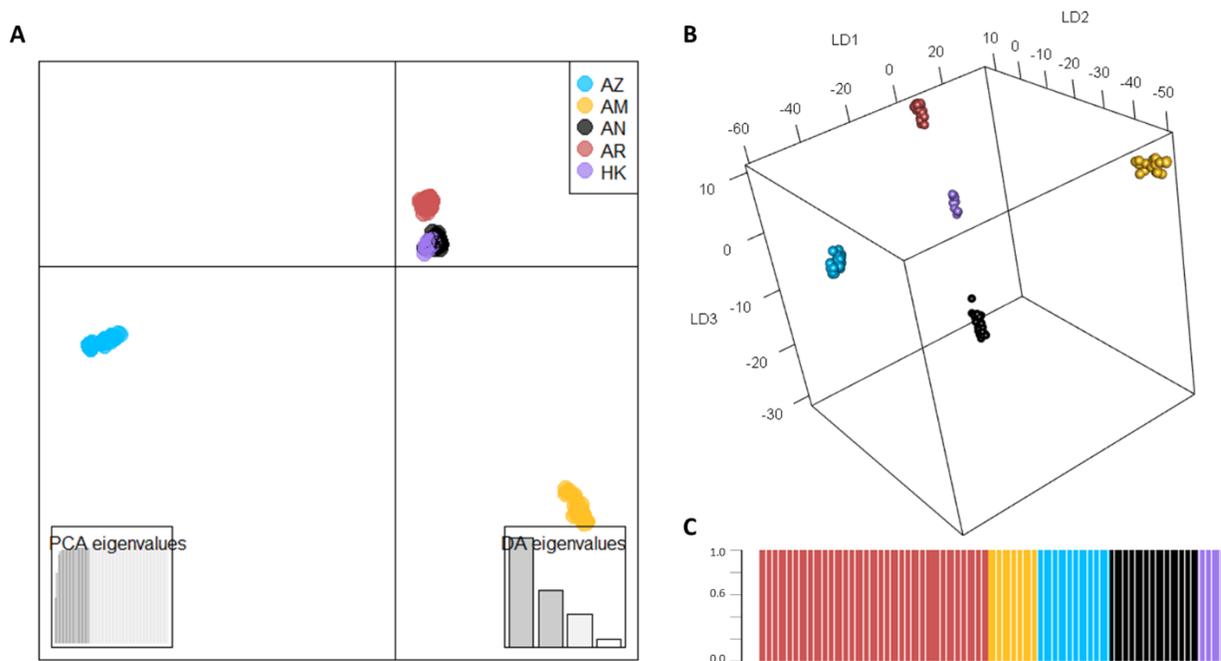


Figura 19. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para el panel de Alelos Privados (66SNP). A: Representación 2D (LD1 y LD2); B: Representación 3D (LD1, LD2 y LD3); C: Probabilidad de pertenencia de cada individuo a cada especie. Los puntos representan cada individuo con diferente color por especie: rojo (*H. rufescens*), amarillo (*H. corrugata*), azul (*H. fulgens*), negro (*H. cracherodii*) y rayado/pinto (*H. kamtschatkana*).

Anexo B.

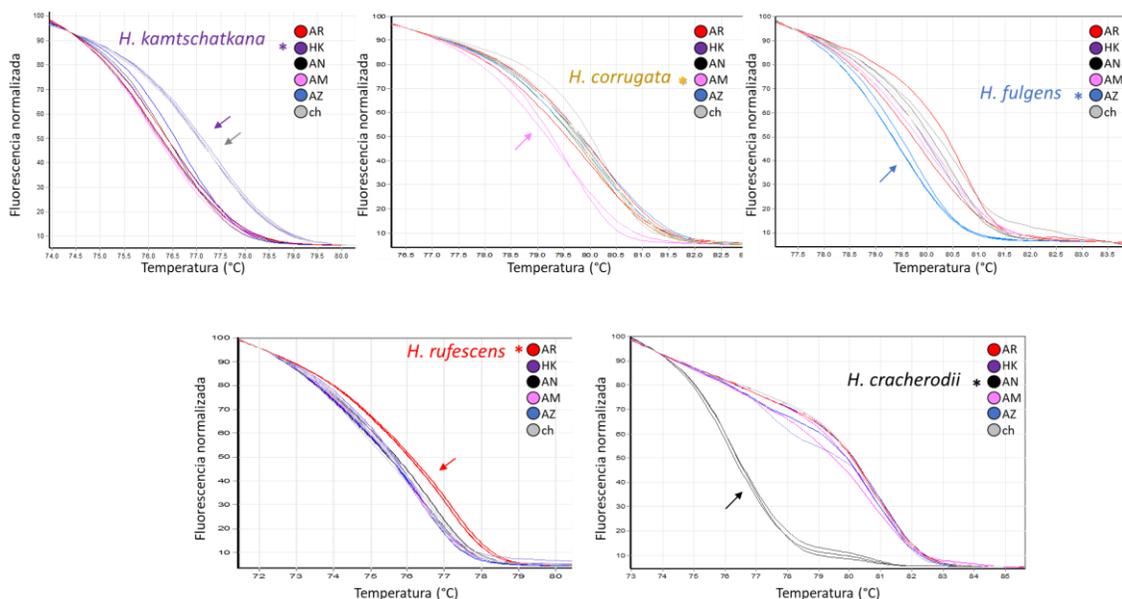


Figura 20. Curvas de disociación de alta resolución (HRM) para la identificación de seis especies de abulón del PNO. Curvas individuales en las muestras control del panel 10 SNP para HRM. Abulón rojo AR (*H. rufescens*), amarillo AM (*H. corrugata*), azul AZ (*H. fulgens*), negro AN (*H. cracherodii*), pinto/rayado HK (*H. kamtschataka*) y chino ch (*H. sorenseni*).

Tipo de Muestra	Control negativo		Muestras a ciegas	
ID	CN1	CN2	M1	M2
Nombre comercial (marca)	Fortuna	Fortuna	Mar C&A	El Rosario
presentación	Enlatado	Enlatado	Enlatado	Enlatado
Especie en etiqueta	Lapa sin sp.	Lapa sin sp.	Abulón sin sp.	Abulón sin sp.
No de organismos	Trozos	2 y medio	*	*
Observaciones	Marca característica de Lapa (<i>Megathura</i> sp.)	Marca característica de Lapa (<i>Megathura</i> sp.)	ENS, BC	BCS



Figura 21. Fotos y descripción completa de muestras enlatadas para su identificación con HRM. La muestra control de abulón azul enlatado CP1 no presentó amplificación, al igual que las otras muestras control CP2, CP3, CP4, pero se agregó para visualizar el callo.

Anexo C

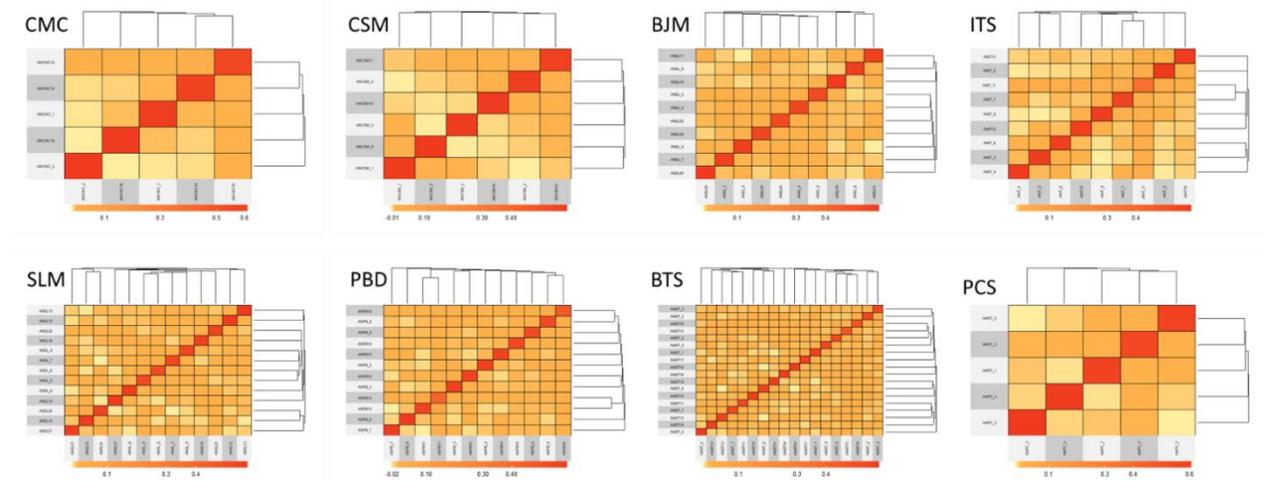


Figura 22. Estimación del coeficiente de parentesco “kinship” en GenoDive con 11,152 SNP. Mapa de calor de la matriz de parentesco entre los 91 individuos para el resto de las localidades. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC. y PCS: Puerto Canoas en San Quintín BC.

Anexo D

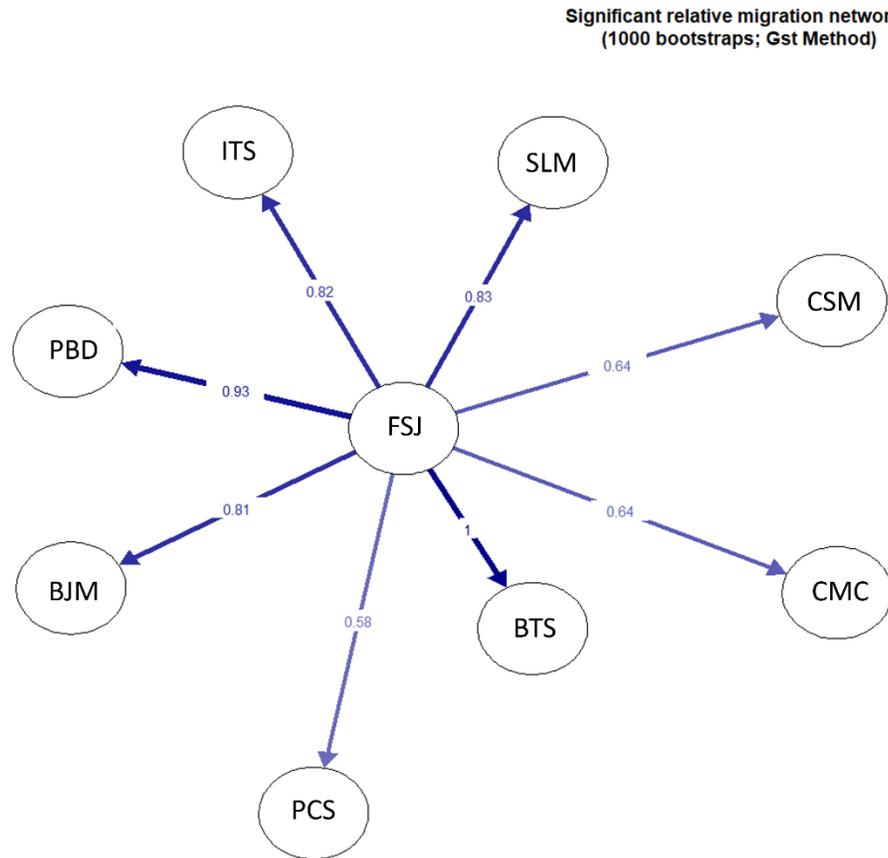


Figura 23. Significancia de la red de migración relativa entre las localidades de abulón negro analizadas con 11,152 SNP. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC.; PCS: Puerto Canoas y FSJ: Faro San José en San Quintín BC.

Anexo E

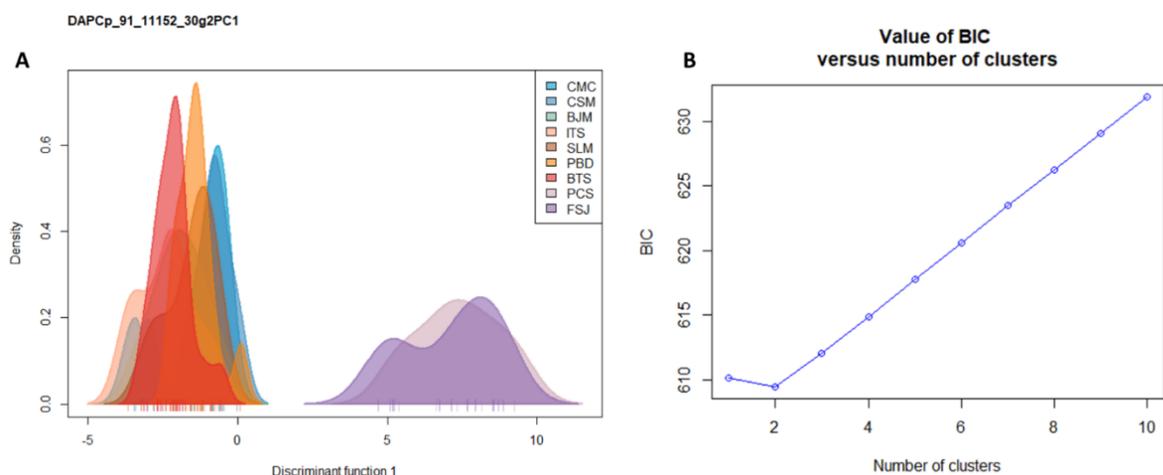


Figura 24. Gráfica de la distribución poblacional basada en la primera función discriminante del DAPC (A) y el Valor del criterio de información bayesiano (BIC) por el número de grupos (B), en el análisis poblacional del abulón negro con 11,152 SNP, 91 individuos y nueve localidades.

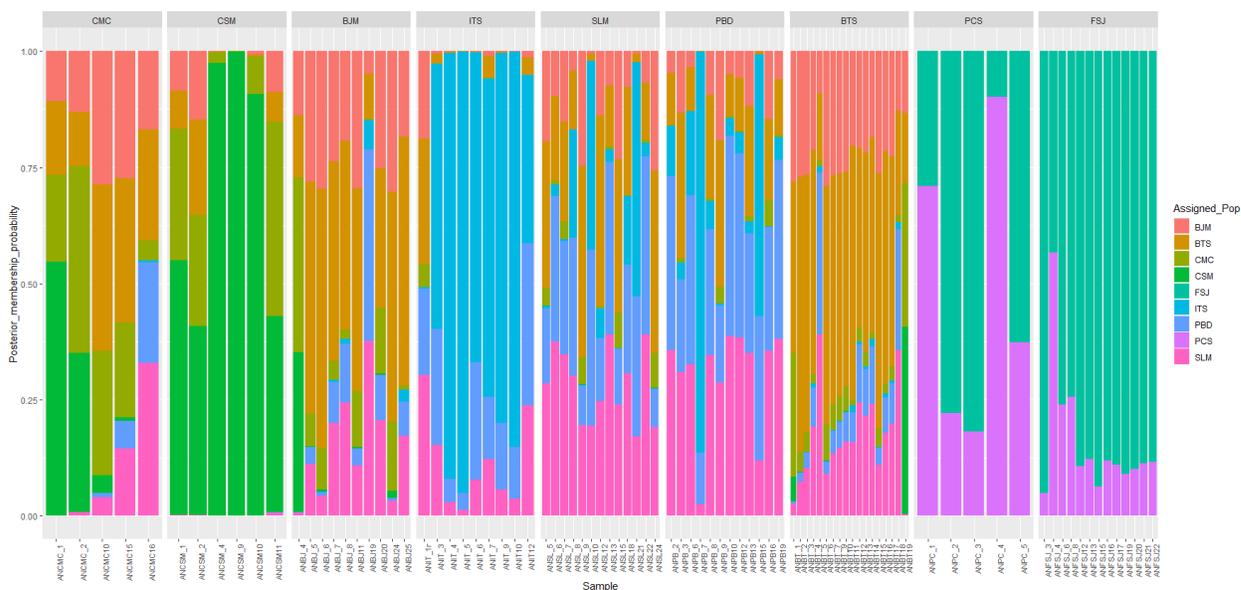


Figura 25. Probabilidad posterior de pertenecer de cada individuo a la población predeterminada a partir del resultado de DAPC (Figura 15 y Figura 24) en 91 individuos con 11,152 SNP. Se retuvieron 30 componentes principales y dos funciones discriminantes. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC.; PCS: Puerto Canoas y FSJ: Faro San José en San Quintín BC.

Anexo F

Tabla 12. Valores de F_{ST} en pares para siete localidades de abulón negro con 11,152 SNP en 73 individuos (arriba de la diagonal) y sus valores p de significancia (debajo de la diagonal).

Sitio	CMC	CSM	BJM	ITS	SLM	PBD	BTS
CMC		0.002	0.000	0.000	0.003	0.003	0.001
CSM	0.047		0.001	0.001*	0.004*	0.002	0.002
BJM	0.594	0.302		-0.001	0.001	0.001	-0.001
ITS	0.365	0.128	0.925		0.000	0.000	0.000
SLM	0.007	0.000*	0.049	0.358		0.002*	0.001
PBD	0.003	0.000*	0.154	0.519	0.001*		0.001
BTS	0.245	0.02	0.957	0.783	0.025	0.007	

Negrita y *: valores con significancia estadística con corrección Bonferroni.

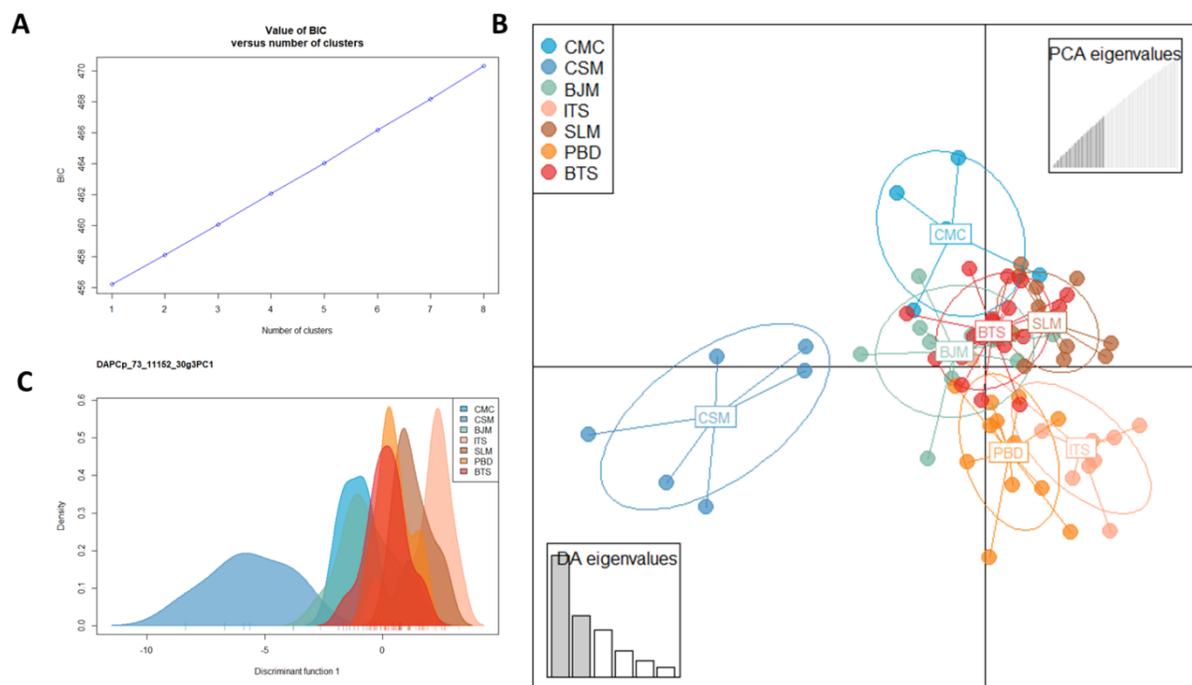


Figura 26. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para siete localidades estudiadas de abulón negro con 11,152 SNP en 73 individuos, con 30 componentes retenidos y dos funciones discriminantes. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC.

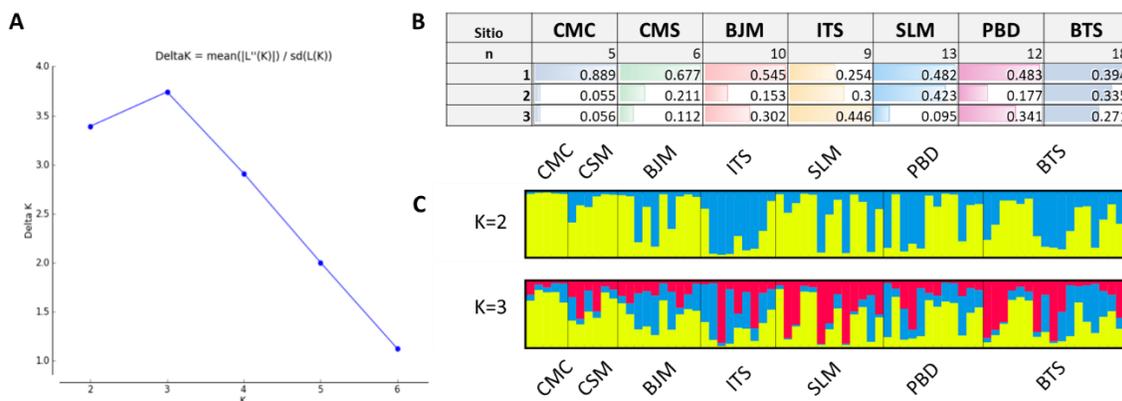


Figura 27. Análisis de estructura genética sin las localidades sureñas en 73 individuos de abulón negro de siete localidades con 11,152 SNP. A: Número más probable de k sugerida por Δk de acuerdo con la prueba de Evanno et al., (2005). B: Probabilidad de pertenencia de cada individuo para tres grupos. C: Estructura genética con k2 y k3. CMC: Mud Creek, CA.; CSM: Isla San Miguel, CA.; BJM: Bajamar; ITS: Isla Todos Santos; SLM: Saldamando; PBD: Punta Banda; BTS: Bahía Todos Santos; en Ensenada BC.

Anexo G

Tabla 13. Lista de abreviaturas.

AP	Alelos privados
CN	Control negativo
<i>COI</i>	<i>Subunidad I de la citocromo oxidasa</i>
CP	Control positivo
<i>CXc</i>	<i>Rickettsia Candidatus Xenohaliotis californienses</i>
DAPC	Análisis discriminante de componentes principales
ddRAD-seq	Secuenciación de doble digestión de DNA asociada a sitios de restricción
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EHW	Equilibrio de Hardy Weinberg
ESA	Acta de especies en peligro de extinción
F_{IS}	Coeficiente de endogamia
F_{ST}	Índice de fijación
HRM	Disociación de alta resolución
IC	Intervalo de confianza
IUCN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
LOO	Leave-One-Out
Mml	Marcadores monolocus
N_e	Tamaño efectivo de la población
NJ	El vecino más cercano
PBC	Península de Baja California
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PNO	Pacífico Nororiental
RAD-seq	Secuenciación de DNA asociada a sitios de restricción
RAm	Abulones híbridos <i>Rojo x Amarillo</i>
RAz	Abulones híbridos <i>Rojo x Azul</i>
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimórfica
SNP	Nucleótido de un sólo polimorfismo
SSR	Secuencias cortas de repetición, marcadores microsatélites
<i>Verl</i>	<i>Receptor de envoltura vitelina para lisina</i>