

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 SECIHTI (Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación).

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 Acuicultura

Genómica poblacional de la lapa gigante (*Megathura crenulata*) en las costas de la península de Baja California

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

Presenta:

Brenda Guadalupe Bonett Calzada

Ensenada, Baja California, México
2025

Tesis defendida por
Brenda Guadalupe Bonett Calzada

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Codirectora de tesis

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez
Codirector de tesis

Dra. Carmen Guadalupe Paniagua Chávez

Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez

Dra. Alicia Abadía Cardoso



Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Coordinador del Posgrado en Acuicultura

Dra. Ana Denise Re-Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Brenda Guadalupe Bonett Calzada** como requisito parcial para la obtención del grado de Doctor en Ciencias en Acuicultura

Genómica poblacional de la lapa gigante (*Megathura crenulata*) en las costas de la península de Baja California

Resumen aprobado por:

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Codirectora de tesis

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez
Codirector de tesis

La lapa gigante, *Megathura crenulata*, es un molusco gasterópodo marino endémico del Pacífico, cuya distribución se extiende desde California, EE.UU., hasta Baja California Sur, México. Esta lapa produce la proteína *KLH* (*Keyhole Limpet Hemocyanin*), que es utilizada en diversas aplicaciones biomédicas. Este recurso tiene gran importancia biotecnológica y gran potencial acuícola. En México, la pesquería de esta especie carece de regulación y de estudios genómicos poblacionales. En este contexto, el objetivo de este estudio es caracterizar la morfología de *M. crenulata* a lo largo de su distribución, describir su mitogenoma y analizar su genómica poblacional. El análisis biométrico se realizó con 166 ejemplares recolectados de California (EE.UU), Ensenada, San Quintín, Isla San Jerónimo, Puerto Canoas, Punta Eugenia, Bahía Asunción e Isla Guadalupe (México). La descripción del mitogenoma, se utilizaron muestras de California, Puerto Canoas y Punta Eugenia. La diversidad genética, la estructura poblacional y los patrones de conectividad se evaluaron mediante marcadores mitocondriales y polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs). Los resultados indicaron la presencia de tres fenotipos de manto (negro, tigre y café) y cuatro colores de concha (verde, blanco, rojo y rayado). El crecimiento de *M. crenulata* es alométrico positivo, sin influencia de los fenotipos de coloración del manto ni de concha. Se observaron variaciones geográficas en los fenotipos del manto: el café fue el más frecuente, el negro aumentó en abundancia hacia el norte y el fenotipo tigre mostró la tendencia opuesta. Isla Guadalupe registró solo fenotipo negro y conchas blancas. Por otra parte, el mitogenoma de esta especie presentó un tamaño de 16,788 pb con los 13 *PCGs*, 22 tRNAs, dos RNAs ribosomales y una región control de 454 pb. A nivel poblacional, empleando un fragmento concatenado de los genes 16S *ARNr* y citocromo oxidasa I (*COI*), se identificaron 46 haplotipos y una alta diversidad nucleotídica, se detectó homogeneidad genética y los análisis de demografía histórica sugieren una expansión y estabilización poblacional hace aproximadamente 10,000 años. Por otro lado, se identificaron 1,112 SNPs, sin embargo, no se detectaron loci *outliers*. La diversidad genómica global fue de $H_o = 0.28 \pm 0.27$ y $H_e = 0.24 \pm 0.18$ y el coeficiente de endogamia global fue negativo ($F_{IS} = -0.08 \pm 0.36$) al igual que para todas las localidades. La estructura poblacional de *M. crenulata* reveló tres agrupamientos: a) las localidades del norte y Bahía Asunción; b) Puerto Canoas y Punta Eugenia en un grupo intermedio y c) Isla Guadalupe. Los patrones de diversidad y diferenciación genética de lapa gigante son consistentes con los observados en otros gasterópodos marinos de la región (i.e. haliótidos). No obstante, la falta de regulación sobre la extracción de *M. crenulata* subraya la necesidad de establecer estrategias de manejo sostenible. Por lo cual es recomendable implementar monitoreos genéticos y ecológicos continuos para detectar cambios en la estructura poblacional, así como establecer vedas y cuotas de captura. Este estudio proporciona información clave para la conservación y manejo de *M. crenulata* como recurso pesquero y acuícola en la península de Baja California, contribuyendo a su explotación sostenible y a la seguridad alimentaria.

Palabras clave: Filogeografía, marcadores SNPs, diversidad mitocondrial, conservación, acuicultura

Abstract of the thesis presented by **Brenda Guadalupe Bonett Calzada** as a partial requirement to obtain the Doctor of science degree in Aquaculture

Population genomics of the keyhole limpet (*Megathura crenulata*) on the coasts of the Baja California Peninsula

Abstract approved by:

Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz
Thesis Codirector

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez
Thesis Codirector

The giant keyhole limpet (*Megathura crenulata*) is a marine gastropod endemic to the Eastern Pacific, distributed from Northern California (USA) to Baja California Sur (Mexico). This species produces the keyhole limpet hemocyanin (KLH), a protein widely used in biomedical applications, making it a valuable biotechnological and aquaculture resource. Despite its importance, the fishery in Mexico remains unregulated, and genomic population studies are scarce. In this context, this study aimed to characterize the morphological variation of *M. crenulata*, describe its mitochondrial genome, and analyze its population genomics, across its geographical distribution in Mexico. A total of 166 individuals were collected from eight locations: California (USA), and Ensenada, San Quintín, Isla San Jerónimo, Puerto Canoas, Punta Eugenia, Bahía Asunción, and Isla Guadalupe (Mexico). Mitogenome analyses were performed using three samples from California, Puerto Canoas, and Punta Eugenia. La diversidad genética, la estructura poblacional y los patrones de conectividad se evaluaron mediante marcadores mitocondriales y polimorfismo de un solo nucleótido (SNPs). Three mantles (black, tiger, and brown) and four shell colorations phenotypes (white, green, red, and striped) were identified. The species showed positive allometric growth, which was not associated with mantle or shell coloration. Mantle phenotype geographic variation was observed: being the brown phenotype the most frequent overall; the black phenotype increased in the northern range; whereas the tiger phenotype was more prevalent in southern sites. The combination of black phenotype with white shell was found in all specimens from Guadalupe Island. The mitochondrial genome was 16,788 bp long and included the 13 standard protein-coding genes (*PCGs*), 22 transfer RNAs (*tRNAs*), two ribosomal RNAs (*rRNAs*), and a control region of 454 bp. Concatenated mitochondrial markers, *16S rRNA* and cytochrome oxidase I (*COI*), revealed 46 haplotypes and high nucleotide diversity. The population appeared genetically homogeneous, and demographic analysis suggested a population expansion followed by stabilization around 10,000 years ago. Nuclear data yielded 1,112 high-quality SNPs. No candidate outlier loci under selection were detected. Overall genomic diversity was moderate ($H_o = 0.28 \pm 0.27$; $H_e = 0.24 \pm 0.18$), with a negative inbreeding coefficient ($F_{IS} = -0.08 \pm 0.36$), indicating an excess of heterozygotes across all localities. Population structure analysis revealed three main clusters: (a) northern localities and Bahía Asunción; (b) an intermediate group with Puerto Canoas and Punta Eugenia; and (c) Isla Guadalupe as a distinct cluster. The genetic diversity and structure observed in *M. crenulata* are consistent with patterns seen in other marine gastropods in the region. However, the absence of regulatory measures for its harvest underscores the need for sustainable management. Continuous genetic and ecological monitoring, along with the implementation of fishing quotas and seasonal closures, is strongly recommended. This research provides essential first baseline data for the conservation and sustainable exploitation of *M. crenulata* as a fishery and aquaculture resource in the Baja California peninsula.

Keywords: Phenotype, Mitogenome, Diversity, Structure

Dedicatoria

A mis sobrinos (Ángel, Jared y Sofía)

Agradecimientos

Agradezco sinceramente al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), al respaldo de los proyectos internos O0F092 y O0F125, y al Departamento de Acuicultura, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en un entorno académico de excelencia.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por el apoyo económico proporcionado durante este proyecto. a través de la beca de estudios de posgrado con el número de folio 28516. Asimismo, al financiamiento otorgado por los proyectos internos de CICESE No. O0F092 y O0F125 para realizar esta investigación.

A mis codirectores de tesis, Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz y Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez, gracias por su guía, paciencia y confianza. Su acompañamiento constante, sus valiosas observaciones y su apoyo académico fueron esenciales a lo largo de este camino.

A los miembros de mi comité de tesis, Dra. Carmen G. Paniagua Chávez, Dra. Alicia Abadía Cardoso, Dra. Clara E. Galindo Sánchez y al Dr. Miguel Á. del Río Portilla, agradezco profundamente sus comentarios, sugerencias y disposición, los cuales contribuyeron al enriquecimiento de este trabajo.

A la Dra. Carmen E. Vargas Peralta, técnico de laboratorio, gracias por su apoyo incondicional, su disposición para ayudar en todo momento y por su amistad a lo largo de este proceso. Su experiencia y colaboración fueron clave para el desarrollo del trabajo. Así como a la M. en C. Jazmine Gutiérrez Castañeda por su apoyo en el mantenimiento de organismos.

Quiero expresar un agradecimiento muy especial a la Dra. Fabiola Lafarga, al Dr. Fausto Valenzuela y a la Dra. Carmen Vargas, por enseñarme con su ejemplo, el tipo de investigadora que quiero ser. Gracias por mostrarme siempre su empatía y paciencia en el trabajo, por su cercanía y por confiar en mí no solo como estudiante, sino también como persona y como futura investigadora. Su acompañamiento y calidad humana han sido una inspiración constante a lo largo de esta etapa formativa.

A mi familia, gracias por su amor, paciencia y comprensión. Su apoyo emocional ha sido el pilar que me sostuvo en los momentos más difíciles. En especial, agradezco a mis papás, hermanos, mi cuñada y mis sobrinos por estar siempre a mi lado y creer en mí incondicionalmente.

Agradecemos sinceramente la colaboración y el apoyo brindado por las siguientes organizaciones pesqueras: S.C.P.P. La Purísima S.C. de R.L., S.C.P.P. Progreso S.C. de R.L., S.P.R. Punta Canoas S. de R.L. de C.V., Buzos y Pescadores de la Baja California, S.C.L.; y a la S.C.P.P. Abuloneros y Langosteros de Isla Guadalupe. Así como al M. en C. Luis Andrés González Agraz por su generosa donación de muestras de *Megathura crenulata*, la cual fue fundamental para la realización de este trabajo, y su disposición para colaborar con esta investigación científica.

Tabla de contenido

Página

Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas	xiii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Importancia de <i>Megathura crenulata</i>	2
1.1.1.1 Producción pesquera.....	2
1.1.1.2 Hemocianina de lapa gigante (<i>Megathura crenulata</i>)	3
1.1.2 Distribución y descripción morfológica de <i>Megathura crenulata</i>	5
1.1.3 Entorno oceanográfico de <i>Megathura crenulata</i>	6
1.1.4 Variación fenotípica en moluscos marinos	7
1.1.5 Variación genética	8
1.1.6 Genomas mitocondriales en moluscos gasterópodos	9
1.1.7 Genómica poblacional mediante SNPs	10
1.2 Justificación	11
1.3 Hipótesis.....	12
1.4 Objetivo general.....	12
1.5 Objetivos particulares	13
Capítulo 2. Metodología	14
2.1 Análisis de diversidad morfológica.....	14
2.1.1 Recolección y análisis biométricos.....	14
2.1.2 Análisis de datos.....	15

2.2	Secuenciación y análisis del genoma mitocondrial.....	16
2.2.1	Muestreo y preparación de librerías para secuenciación del mitogenoma.....	16
2.2.2	Análisis bioinformático de secuencias mitocondriales	17
2.2.3	Diseño de cebadores para completar el mitogenoma	17
2.2.4	Anotación del mitogenoma.....	18
2.2.5	Análisis filogenético con marcadores mitocondriales.....	18
2.2.6	Muestreo, análisis de diversidad y estructura genética con marcadores mitocondriales	19
2.2.7	Análisis de diversidad y estructura genética con marcadores mitocondriales	20
2.2.8	Historia demográfica	20
2.3	Genómica poblacional asociada a marcadores SNPs.....	21
2.3.1	Recolección y extracción de material genómico.....	21
2.3.2	Preparación de librerías genómicas (ddRAD-Seq).....	22
2.3.3	Ensamblaje <i>de novo</i> de lecturas.....	22
2.3.4	Detección de marcadores con potencial adaptativo (<i>outliers</i>)	23
2.3.5	Diversidad genética	23
2.3.6	Diferenciación genómica y estructura poblacional.....	24
2.3.7	Conectividad genética entre localidades	25
Capítulo 3.	Resultados.....	26
3.1	Análisis de diversidad morfológica.....	26
3.1.1	Análisis biométricos	26
3.1.2	Distribución del fenotipo de manto y color de conchas de <i>M. crenulata</i> a lo largo de su distribución geográfica.....	27
3.1.3	Análisis entre las variables biométricas y fenotipos de color de manto y conchas	29
3.1.4	Análisis biométrico de la coloración en conchas	30
3.1.5	Correlación entre la coloración del manto y de la concha de <i>Megathura crenulata</i>	31
3.1.6	Análisis alométrico de <i>Megathura crenulata</i>	32
3.2	Secuenciación y análisis del genoma mitocondrial.....	34

3.2.1	Mitogenoma de <i>Megathura crenulata</i>	34
3.2.2	Análisis filogenético con marcadores mitocondriales.....	36
3.2.3	Diversidad y estructura genética a partir de los genes <i>16S ARNr</i> y <i>COI</i>	38
3.2.4	Historia demográfica	40
3.3	Genómica poblacional asociada a marcadores SNPs	43
3.3.1	Análisis bioinformático de secuenciación de librerías ddRadSeq	43
3.3.2	Detección de marcadores con potencial adaptativo (<i>outliers</i>)	43
3.3.3	Diversidad genómica asociada a marcadores SNPs	44
3.3.4	Diferenciación genómica y estructura poblacional asociada a marcadores SNPs	45
3.3.5	Conectividad genética entre localidades	47
Capítulo 4.	Discusión	49
4.1	Diversidad de fenotipos de manto y coloración de concha de <i>Megathura crenulata</i>	49
4.2	Genoma mitocondrial de <i>Megathura crenulata</i>	50
4.3	Análisis genómico poblacional de <i>Megathura crenulata</i>	51
4.3.1	Diversidad genética asociada a marcadores mitocondriales y SNPs	52
4.3.2	Diferenciación y estructura genética asociada a marcadores mitocondriales y SNPs, dentro de la distribución geográfica de <i>Megathura crenulata</i>	53
4.3.3	Demografía histórica de <i>Megathura crenulata</i> asociada a marcadores mitocondriales..	54
4.4	Implicaciones para el manejo y medidas de conservación de <i>Megathura crenulata</i>	55
Capítulo 5.	Conclusiones.....	58
Literatura citada	59	
Anexos	71	

Lista de figuras

- Figura 1.** Distribución geográfica de lapa gigante, *Megathura crenulata*. La línea azul se indica la distribución y los círculos en rojos indican los límites de distribución norte (Punta Concepción, California, EE.UU) y sur (Isla Asunción, Baja California, México) (Torres-Moye, 2012). **5**
- Figura 2.** Producción por pesca de *Megathura crenulata*, en un periodo de 15 años (CONAPESCA, 2015). **3**
- Figura 3.** Fenotipos de color de manto (a) y concha (b) encontrados en ejemplares de *Megathura crenulata* a lo largo de su distribución geográfica. **15**
- Figura 4.** Parámetros biométricos de ejemplares de lapa gigante, *Megathura crenulata*, provenientes de ocho localidades dentro de su distribución geográfica. a) Peso húmedo total (g), b) Largo de concha (cm) y c) Ancho de concha (cm). Los datos se representan mediante gráficos de cajas y bigotes, donde la línea central indica la mediana (para a y b) y el promedio (para c). Los bordes de la caja corresponden al rango intercuartílico (Q1–Q3) y los bigotes muestran la dispersión de los datos. KS = Kruskal-Wallis; AN = ANOVA de una vía. Las letras indican diferencias significativas entre grupos según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (a y b) y Tukey (c). **27**
- Figura 5.** Distribución de fenotipos de manto en ocho localidades evaluadas dentro de la distribución geográfica de *Megathura crenulata*. **28**
- Figura 6.** Distribución de fenotipos de color de concha en ocho localidades evaluadas dentro de la distribución geográfica de *Megathura crenulata*. **29**
- Figura 7.** Variables biométricas de ejemplares de lapa gigante, *Megathura crenulata*, agrupados por fenotipo de color del manto: tigre, café y negro. a) Peso húmedo total (g), b) Largo de concha (cm) y c) Ancho de concha (cm). Los datos se representan mediante gráficos de cajas y bigotes, donde la línea central indica la mediana (para a y b) y el promedio (para c). Los bordes de la caja corresponden al rango intercuartílico (Q1–Q3) y los bigotes muestran la dispersión de los datos. KS = Kruskal-Wallis; AN = ANOVA de una vía. Las letras indican diferencias significativas entre grupos según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (a y b) y Tukey (c). **30**
- Figura 8.** Variables biométricas de ejemplares de lapa gigante, *Megathura crenulata*, agrupados por fenotipo de color de concha: verde, blanco, rojo y rayado. a) Peso húmedo total (g), b) Largo de concha (cm) y c) Ancho de concha (cm). Los datos se representan mediante gráficos de cajas y bigotes, donde la línea central indica la mediana (para a y b) y el promedio (para c). Los bordes de la caja corresponden al rango intercuartílico (Q1–Q3) y los bigotes muestran la dispersión de los datos. KS = Kruskal-Wallis; AN = ANOVA de una vía. Las letras indican diferencias significativas entre grupos según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (A y B) y Tukey (c). **31**
- Figura 9.** Distribución de frecuencias en los fenotipos de color de manto y de concha en el total de ejemplares de *Megathura crenulata*, colectada en ocho localidades de su distribución geográfica. Prueba de χ^2 , $p > 0.25$, indica falta de asociación estadísticamente significativa entre los fenotipos de color de manto y concha encontrados. **32**
- Figura 10.** Relaciones alométricas de ejemplares de *M. crenulata* entre el peso húmedo total y el largo de concha. a) global, b) agrupación por fenotipo de manto, c) agrupación por coloración de concha. **33**

- Figura 11.** Mapa del mitogenoma de *Megathura crenulata*. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Las PCGs están en púrpura, el ARN ribosomal en rojo, los ARN de transferencia en amarillo y la fuente en azul. 34
- Figura 12.** Estructuras secundarias de cuatro tARNs: A) Prolina, B) Serina, C) Arginina y D) Asparagina. 36
- Figura 13.** Árbol de relaciones filogenéticas entre ocho especies de gasterópodos. A) Análisis del mitogenoma completo. B) Análisis con tres genes *ATP6*, *COIII* y *ND1*, C) Análisis con 13 PCGs de las ocho especies de gasterópodos. 37
- Figura 14.** Comparación de la disposición de genes en el genoma mitocondrial de *Fissurella volcano*, *Megathura crenulata* y *Diodora graeca* en base a las secuencias publicadas, Tabla 2, indica los códigos de acceso a GenBank. Los genes en diferentes disposiciones se resaltan en color. 38
- Figura 15.** Lugares de muestreo de *Megathura crenulata*. California (CAL), Ensenada (ENS), San Quintín (SQT), Isla San Jerónimo (ISJ), Puerto Canoas (PCA), Punta Eugenia (PUE), Bahía Asunción (BAS) e Isla Guadalupe. Los diagramas circulares indican la diversidad de haplotipos. 39
- Figura 16.** Distribución de desajustes (*mitmatch*) para los genes mitocondriales concatenados *r16s-COI* de *Megathura crenulata*. Las barras representan los valores observados y la línea representa los valores esperados. 40
- Figura 17.** Red de expansión mínima, ilustra haplotipos de ocho localidades de *Megathura crenulata*. Los tamaños de los círculos representan las frecuencias de haplotipos, mientras que los colores indican la localidad: California (CAL-rojo), Ensenada (ENS-rosa), San Quintín (SQT-naranja), Isla San Jerónimo (ISJ-blanco), Puerto Canoas (PCA-azul), Punta Eugenia (PEU-verde), Bahía Asunción (BAS-marrón) e Isla Guadalupe (IGP-morado). 41
- Figura 18.** Diagrama de Skyline basado en la matriz colapsada de fragmentos concatenados de los genes *r16s-COI* de *Megathura crenulata*. En el eje x, indica el tiempo en años y comienza en cero, con respecto a la actualidad. La línea azul intenso representan el intervalo de confianza al 95 %. 42
- Figura 19.** Análisis de regresión lineal de los tiempos de crecimiento poblacional de *Megathura crenulata*. a) Análisis de cero a 18,000 años, b) Análisis de 18,000 a 25,000 años, c) Análisis de 25,000 a 50,000 años. 42
- Figura 20.** Coeficiente de endogamia (F_{IS}) promedio para cada localidad evaluada dentro de la distribución geográfica de *Megathura crenulata*. Los datos se representan mediante gráficos de cajas y bigotes, donde la línea central indica la mediana, los bordes de la caja corresponden al rango intercuartílico (Q1–Q3) y los bigotes muestran la dispersión de los datos. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (KS) para evaluar diferencias entre localidades. Letras distintas indican diferencias significativas entre grupos según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. 45
- Figura 21.** Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) de la matriz neutral de 1,112 SNPs de *Megathura crenulata*. a) DACP de ocho localidades; b) Función Discriminante 1: Separación de Grupos del DACP de ocho localidades; c) Criterio de Información Bayesiano (BIC) indicativo del número óptimo de agrupaciones. 46

- Figura 22.** Determinación del número óptimo de clusters (K) a partir del análisis de STRUCTURE. a) Colores indican proporción de pertenencia por localidad a cada uno de los tres componentes genómicos detectados. b) Evaluación de ΔK de acuerdo con el método de Evanno et al. (2005), con el valor óptimo de K identificado en el pico máximo de ΔK . c) Variación de L(K) en función de K, donde L (K) representa la probabilidad del modelo..... **47**
- Figura 23.** Evaluación del aislamiento por distancia (IBD) en *Megathura crenulata*: correlación entre distancias genéticas y geográficas a partir de la matriz de 1,112 SNPs neutrales obtenidos en ocho localidades dentro de la distribución geográfica de la especie..... **48**
- Figura 24.** Red de migración bidireccional relativa de *Megathura crenulata* entre ocho localidades dentro de su distribución geográfica, obtenidas a partir de la matriz de 1,112 SNPs neutrales. Línea continua indica dirección de norte a sur y línea punteada indica dirección de sur a norte. **48**
- Figura 25.** Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) de la matriz neutral de 1,112 SNPs de *Megathura crenulata* para el análisis de agrupaciones de siete localidades. a) DACP de siete localidades; b) Función Discriminante 1: Separación de Grupos del DACP de siete localidades; c) Criterio de Información Bayesiano (BIC) indicativo del número óptimo de agrupaciones. **72**

Lista de tablas

Tabla 1. Coordenadas geográficas (latitud y longitud) de ocho localidades de muestreo de <i>Megathura crenulata</i> , así como el número de muestras obtenidas por localidad (<i>n</i>).....	14
Tabla 2. Lista de taxones del orden Lepetellida utilizados para los análisis filogenéticos del mitogenoma y código de acceso a GenBank.	19
Tabla 3. Posición, longitud y dirección de la hebra (+/-) del mitogenoma de <i>Megathura crenulata</i> , con codones de iniciación y terminación.	35
Tabla 4. Diversidad genética de los genes concatenados <i>r16S-COI</i> de <i>Megathura crenulata</i> en ocho localidades a lo largo de su distribución geográfica.	38
Tabla 5. Matriz de comparación entre los valores de φ_{ST} de entre ocho localidades de <i>Megathura crenulata</i> φ_{ST} global: 0.0478*.....	39
Tabla 6. Prueba de neutralidad; <i>Tajima D (DT)</i> y <i>Fs de Fu</i> . Los valores estadísticos fueron calculados para secuencias de los genes mitocondriales concatenados <i>r16s-COI</i> de <i>Megathura crenulata</i>	40
Tabla 7. Número de individuos secuenciados en librerías ddRAD-Seq y número individuos después del proceso de filtración (datos faltantes y <i>relatedness phi</i>) para el análisis genómico poblacional de <i>Megathura crenulata</i>	43
Tabla 8. Diversidad genómica de lapa gigante, <i>Megathura crenulata</i> , evaluada en ocho localidades. Número de muestras por localidad (<i>n</i>), riqueza alélica (<i>Ar</i>), heterocigocidad observada (<i>Ho</i>) y esperada (<i>He</i>) y coeficiente de endogamia (<i>F_{IS}</i>). Asterisco (*) indica significancia estadística a partir de la prueba <i>t-Student</i>	44
Tabla 9. Coeficiente de fijación (<i>F_{ST}</i>) de la matriz de 1,112 SNPs neutrales evaluados en ocho localidades dentro de la distribución geográfica de <i>Megathura crenulata</i> . Debajo de la línea diagonal se encuentran los valores de <i>F_{ST}</i> para cada comparación y sobre la línea diagonal se indican los valores de probabilidad. Valores resaltados son estadísticamente significativos con respecto a la corrección de Bonferroni: 0.0017.....	46
Tabla 10. Secuencias de adaptadores (<i>index</i>) utilizados en la preparación de librerías genómicas de ddRAD-Seq, de acuerdo con el protocolo descrito por Peterson y colaboradores, 2012.....	71

Capítulo 1. Introducción

En los últimos años, la acuicultura se ha consolidado como una gran industria con un crecimiento anual promedio del 5% (FAO, 2024). En 2022, se reportó una producción acuícola global de 130.9 millones de toneladas de peces, crustáceos, moluscos, entre otros. Particularmente, la producción de moluscos alcanza 20.4 millones de toneladas en 2016 (FAO, 2024). Aunque diversas especies de moluscos son cultivadas a nivel mundial, como diferentes tipos de abulones, existen otras con un importante potencial acuícola, como la lapa gigante *Megathura crenulata*.

Específicamente, la acuicultura de abulones y lapas se destacan como dos industrias clave, con similitudes significativas y una gran relevancia en el contexto de la producción de alimentos y la seguridad alimentaria (Mau & Jha, 2018). Además, estas especies desempeñan un papel importante en la nutrición humana, ya que poseen un mayor contenido proteico y son una mejor fuente de calcio, fósforo, hierro, vitamina A y vitamina D en comparación con otros moluscos bivalvos, como ostiones, almejas y mejillones (Miller & Robbins, 1940). Considerando que algunos recursos acuáticos de importancia comercial y cultural podrían no estar disponibles para las generaciones futuras debido al declive de los bancos pesqueros, la acuicultura de estas especies se presenta como una estrategia crucial para garantizar la seguridad alimentaria a largo plazo.

Por otra parte, uno de los principales objetivos de la acuicultura moderna es la selección de organismos con cualidades comerciales deseables, tales como un rápido crecimiento, tolerancia a cambios ambientales y características morfológicas específicas (FAO, 2023). Una adecuada selección de reproductores, basada en el conocimiento profundo de la diversidad genética presente en las poblaciones silvestres es fundamental para alcanzar estos objetivos de manera efectiva. Estas poblaciones representan una fuente invaluable de variabilidad genética, ya que han sido moldeadas por procesos evolutivos naturales que les han conferido adaptaciones únicas a sus entornos locales. Identificar individuos con alta diversidad genética y bajos niveles de parentesco es clave para conformar líneas base o pie de cría con potencial de mejora, lo cual es crucial en las etapas iniciales de domesticación de muchas especies acuícolas (Zenger et al., 2019).

El estudio de esta diversidad no solo permite detectar características de interés, sino que también contribuye a prevenir problemas asociados con la endogamia y la pérdida de variabilidad genética a largo plazo. Además, la integración de herramientas modernas como la selección genómica ha revolucionado el

campo del mejoramiento acuícola, permitiendo predecir el valor genético de los individuos de forma más precisa y acelerar los ciclos de selección. Esta tecnología es especialmente útil para mejorar rasgos de herencia compleja, como la resistencia a enfermedades multifactoriales o el rendimiento bajo distintas condiciones ambientales (FAO, 2023; Houston et al., 2020). En conjunto, la caracterización genética de poblaciones silvestres y su aplicación en programas de reproducción planificada sientan las bases para el diseño de estrategias de mejoramiento genético sostenibles, eficientes y adaptadas a las demandas actuales y futuras del sector acuícola.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Importancia de *Megathura crenulata*

1.1.1.1 Producción pesquera

La captura comercial de la lapa gigante *M. crenulata* comenzó en Baja California hace aproximadamente 20 años. Durante este tiempo, los volúmenes de captura de esta especie han fluctuado considerablemente. El promedio de captura entre 1992 y 1999 fue de 85 t, alcanzando un máximo histórico en 1994 con un total de 180 t. Posteriormente, las capturas disminuyeron a un promedio de 50 t durante los años 2001-2002 y no se registró ninguna captura de este recurso para el año 2003 (Figura 2; CONAPESCA, 2009).

A partir de entonces, los reportes indican menos de 10 t anuales de captura y no se dispone de datos oficiales después del 2015 (CONAPESCA, 2015). Cabe destacar que el aprovechamiento de la lapa gigante se realiza mediante permisos de pesca comercial; sin embargo, de acuerdo con la Carta Estatal Pesquera de Baja California de 2000-2018, para esta pesquería no hay regulación específica. Por esta razón, su explotación está sujeta a una evaluación previa por parte de las autoridades competentes, con el objetivo de asignar cuotas máximas anuales de captura por banco, de acuerdo con la disponibilidad del recurso en las zonas evaluadas. Además, la captura realizada por las cooperativas depende del precio de mercado del producto. Cuando el precio es muy bajo, las cooperativas optan por no pescar, ya que los costos asociados a la captura superan las posibles ganancias (com. pers. Lafarga-De la Cruz, 2020).

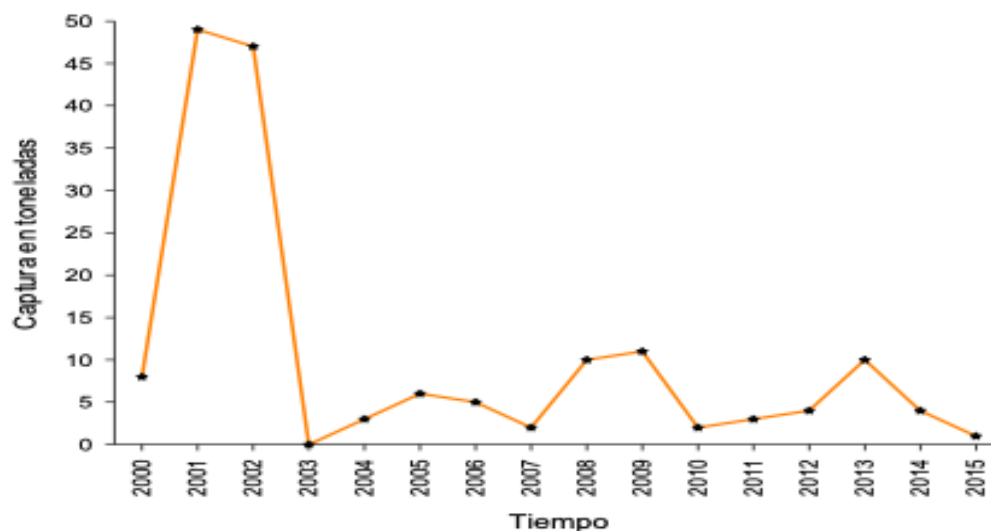


Figura 1. Producción por pesca de *Megathura crenulata*, en un periodo de 15 años (CONAPESCA, 2015).

Durante la década de los noventa, esta especie de lapa fue abundante en las costas de Baja California. Hoy en día, su biomasa se ha visto mermada por la presión pesquera, a la cual es sometida y por la presencia de mortalidades masivas relacionas con periodos de temperatura alta del mar (com. pers. José Mercado, Coop. Punta Canoas, 2018) lo que ha limitado la disponibilidad del recurso en los últimos años. Por otra parte, es importante señalar que en particular la acuicultura de lapas y de abulón, por su similitud biológica, constituyen industrias clave con gran relevancia para la producción de alimentos y la seguridad alimentaria en la región de Baja California (Mau & Jha, 2018).

1.1.1.2 Hemocianina de lapa gigante (*Megathura crenulata*)

La acuicultura de la lapa gigante (*Megathura crenulata*) ha ganado relevancia en los últimos años debido a la producción de una proteína de alto valor biomédico: la hemocianina *KLH* (Keyhole limpet hemocyanin). Esta proteína tiene aplicaciones significativas en biomedicina, especialmente en inmunología, debido a su potente capacidad antigénica. La inyección de *KLH* induce una fuerte respuesta de anticuerpos en casi el 100% de los vertebrados, incluidos los humanos (Becker, 2014; Miller & Robbins, 1940; Swerdlow et al., 1996).

La proteína *KLH* no puede ser sintetizada de novo, por lo cual es necesario extraerla de organismos vivos y sanos. En años recientes se ha utilizado la *KLH* como proteína transportadora (*carrier*) para producir

anticuerpos haptenos y péptidos, que tienen una aplicación creciente en la formulación de vacunas experimentales contra patógenos como hongos (*Cryptococcus neoformans*), bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*) y virus (papiloma humano, influenza y VIH). Además, es utilizada en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, principalmente cáncer de próstata, mama, ovario, pulmón y como profiláctico para prevenir el abuso de cocaína (del Campo et al., 2011; Harris & Markl, 1999; Oakes et al., 2004; Swerdlow et al., 1996).

La proteína *KLH* presenta dos isoformas (*KLH1* y *KLH2*), cuyas principales características incluyen una masa molecular de 400 kDa para la subunidad *KLH1* y 345 kDa para la subunidad *KLH2* (Söhnngen et al., 1997). Además, se ha demostrado que las dos subunidades *KLH1* y *KLH2* difieren en estructura primaria, en características de polimerización reasociación, así como en la unión de la proteína con O₂. Por lo que, de acuerdo con estas características tanto físicas como funcionales se consideran las dos isoformas de *KLH* como diferentes productos génicos (Swerdlow et al., 1996, Markl et al., 1991).

La presencia de dos isoformas de la hemocianina se ha reportado en diferentes especies de moluscos y particularmente en gasterópodos, donde estas isoformas se presentan en diferentes estadios durante el desarrollo de la vida de los organismos. Por ejemplo, en el abulón *Haliotis asinina*; dos isoformas de hemocianina se expresan en diferentes estadios: la isoforma *HaH1* se expresa durante los estadios de larva trocófora y veliger, mientras que la *HaH2* se expresa en los tejidos de la masa visceral durante la etapa adulta (Streit et al., 2005). Sin embargo, las hemocianinas no solo desempeñan la función de transportar oxígeno a través del organismo, sino que también aumenta en su producción en respuesta a la presencia de patógenos. Además, las isoformas presentes en los organismos durante una infección pueden variar. Por ejemplo, en el abulón *H. diversicolor*, se identificaron tres genes asociados a hemocianinas, cuya expresión está relacionada con enfermedades y a los tejidos involucrados, así como a las distintas especies de patógenos (Yao et al., 2019).

Por otra parte, las hemocianinas son sensibles a factores ambientales como el aumento de la temperatura, la baja disponibilidad de oxígeno y los cambios en el pH del agua. Estos factores exógenos pueden influir en la presencia de isoformas y en la expresión de diferentes tipos de estas, modificando su equilibrio y funcionalidad (Raymond et al., 2022). Por ejemplo, en la sepia común *Sepia officinalis* se evaluó el efecto de tres temperaturas (11°C, 16°C y 21°C) sobre los niveles de expresión de las tres isoformas de hemocianina (Hc). Se comprobó que a menor temperatura la expresión de la Hc es menor, lo cual podría estar relacionado con una mayor estabilidad de la proteína y una eficiencia óptima en el transporte de oxígeno a bajas temperaturas y a su capacidad óptima de transporte de oxígeno a estas temperaturas. Sin

embargo, aunque la temperatura condujo a una disminución general de la transcripción de hemocianina en animales adultos, no se observaron cambios en la concentración de proteínas para esta especie, lo que pudiese estar asociados a cambios postraduccionales (Strobel et al., 2012).

1.1.2 Distribución y descripción morfológica de *Megathura crenulata*

La lapa gigante *M. crenulata* es un molusco gasterópodo perteneciente a la familia Fissurellidae, que habita en sustratos rocosos de la zona litoral. Su distribución geográfica abarca desde Punta Concepción, California, Estados Unidos, hasta Isla Asunción, Baja California Sur, México (Torres-Moye, 2012) (Figura 1). Su dieta está compuesta principalmente por tunicados y algas rojas, aunque incluye una variedad de otros organismos bentónicos incrustados (Gómez-Valdés, 2012; Mazariegos-Villarreal et al., 2013).

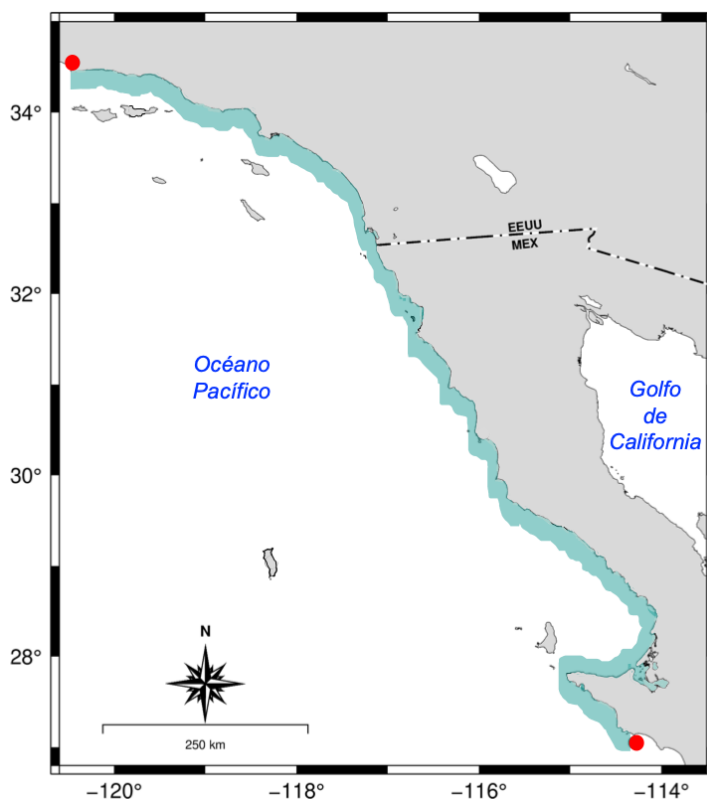


Figura 2. Distribución geográfica de lapa gigante, *Megathura crenulata*. La línea azul se indica la distribución y los círculos en rojos indican los límites de distribución norte (Punta Concepción, California, EE.UU) y sur (Isla Asunción, Baja California, México) (Torres-Moye, 2012).

En México, la distribución geográfica de *M. crenulata* (Figura 1) se extiende desde Tijuana, Baja California, hasta Isla Asunción, Baja California Sur. Dentro de esta zona, las condiciones oceanográficas pueden ser

altamente variables. Las características oceanográficas facilitan la dispersión de larvas, especialmente en organismos sésiles o semi-sésiles (Baco et al., 2016).

El Phylum Mollusca es uno de los más diversos en cuanto a especies. Dentro de este, se encuentra la clase Gastropoda, que incluye a las lapas clasificadas en la familia Fissurellidae. *Megathura crenulata* es una especie de lapa que destaca por ser única en su género. Las principales características del grupo de gasterópodos es la presencia de cefalización posterior y uno o dos pares de tentáculos, además de poseer una concha que cubre la región visceral y el pie. Las conchas del grupo Gastropoda presentan una notable variación entre especies. Sin embargo, de manera general, se caracterizan por tener una forma "aplanada" en familias como Patellogastropoda, Coccilinoidea, Lepetelloidea, Calyptraeoidea, Trimusculidae y Fissurelloidea (Uribe-Arboleda, 2016).

De manera específica, *Megathura crenulata* posee una concha de forma dorsal pateliforme con una abertura central que permite el flujo de agua exhalante. El manto, órgano encargado de conectar el músculo (pie) con la concha, cubre casi completamente la concha y tiene la capacidad de contraerse. Además, se ha reportado que el manto de *M. crenulata* presenta tres fenotipos diferenciados por su coloración: café, tigre y negro, cada uno con ligeras variaciones en sus tonalidades (Torres-Moye-2012).

1.1.3 Entorno oceanográfico de *Megathura crenulata*

La península de Baja California está influenciada por el sistema de la Corriente de California (SCC), el cual está compuesto por la Corriente de California (CC), la Contracorriente Costera (CcC) y la Contracorriente Subsuperficial (CcSs). La variabilidad estacional del SCC está determinada por los patrones de viento, la interacción océano-atmósfera (ciclos estacionales) y las fluctuaciones en la estructura de las corrientes superficiales y subsuperficiales en la costa. Además, la variabilidad interanual en este sistema, que afecta parámetros como la temperatura y la salinidad, está asociada a eventos como El Niño (EN), La Niña (LN) y la Oscilación Decadal del Pacífico (ODP) (Ramírez-Manguilar, 2005).

Otra característica del SCC es la presencia de giros estacionales a lo largo del sur de California y el norte de la península de Baja California durante todo el año, con patrones característicos en invierno-primavera y verano-otoño (Durazo, 2015; King et al., 2011). Asimismo, considerando las corrientes antes descritas, durante los meses de septiembre a octubre en la región central de la distribución de *M. crenulata*, entre

Puerto Canoas y Punta Eugenia, en la Bahía de Sebastián Vizcaíno se tiende a la formación de remolinos anticiclónicos (Buenrostro et al., 1995).

Por otra parte, las condiciones de temperatura y salinidad de la península de Baja California muestran una variación latitudinal, ya que mínimas y máximas de temperatura difieren la zona norte (30°N) y de la zona sur (28°N). Esto influenciado esto por la presencia de surgencias en el norte, las cuales traen consigo aguas con temperaturas bajas, niveles de oxigenación bajos y nivel de nutrientes alto. Asimismo, los promedios de temperatura registrados en el norte de la península son desde 8°C hasta 15°C, a diferencia de la zona sur con mínimas de 10°C y máximas de 20°C (Ramírez-Manguilar, 2005).

1.1.4 Variación fenotípica en moluscos marinos

La variación fenotípica de un organismo depende del genotipo y su interacción con el ambiente. Los moluscos presentan una notable variación fenotípica y se destacan como uno de los grupos taxonómicos con mayor plasticidad (Holloway, 2002). La plasticidad fenotípica está definida como la capacidad de un organismo para modificar su fenotipo en respuesta a las condiciones ambientales y es una estrategia evolutiva clave para adaptarse a ambientes heterogéneos (Nuñez-Farfán et al., 2003). *Megathura crenulata* habita en la región intermareal y hasta los 10-15 metros de profundidad (Torres-Moye, 2012). Estos hábitats pueden ser catalogados como altamente estresantes, ya que las variaciones ambientales de temperatura, oleaje y radiación son amplias y alteran el entorno (Alonso-Domínguez, 2013). Esto genera gran variación en los fenotipos que puede presentar una especie, incluidos los aspectos morfológicos, como la estructura y coloración de las conchas en bivalvos y gasterópodos (Trussell, 2000). En lapas del género *Fissurella*, como *F. pulchra* (Bretos y Chihuailaf, 1990), *F. latimartiganata* (Olivares-Paz et al., 2011) y *F. virescens* (Alonso-Domínguez, 2013) los atributos morfométricos de sus conchas (largo, ancho y altura), han permitido caracterizar de poblaciones en relación con cambios en variables ambientales a lo largo de su distribución geográfica. En otros moluscos bivalvos, como la almeja mano de león (*Nodipecten subnodosus*), se ha determinado que la variación de la coloración de concha esta influenciada por la temperatura del mar. En condiciones de temperaturas cálidas, observándose una mayor plasticidad en ambientes cálidos y una variación limitada a temperaturas frías (Rojas-Sánchez, 2024).

1.1.5 Variación genética

La diversidad o variación genética en individuos se refiere a la cuantificación de la variación en el material genético de una población determinada, lo que permite que en la población existan diferentes variantes de un gen en la población como resultado de mutaciones, migraciones o deriva génica (Povh et al., 2008). Para evaluar genéticamente poblaciones de una misma especie o diferenciar entre especies se han utilizado diferentes tipos de marcadores, como isoenzimas, RAPD (por sus siglas en inglés, *Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (por sus siglas en inglés, *Restriction Fragment Length Polymorphism*), AFLP (por sus siglas en inglés, *Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (por sus siglas en inglés, *Simple Sequence Repeats*) y regiones mitocondriales (Allendorf & Luikart, 2007).

Sin embargo, debido a la naturaleza de los marcadores mitocondriales, que son heredados por la línea materna y presentan una tasa de mutación más alta que los marcadores nucleares, complica su uso para evaluar diversidad genética. Su herencia uniparental impide la reconstrucción de historias poblacionales con herencia biparental, lo que limita su capacidad para reflejar la variabilidad genética total de una población. A pesar de esto, los marcadores mitocondriales son útiles en análisis poblacionales, ya que permiten detectar cuellos de botella, estudiar la estructura genética a nivel de subpoblaciones y realizar estudios de historia demográfica, como la estimación de la expansión o contracción de poblaciones a lo largo del tiempo (Cárdenas et al., 2009; Vázquez-Domínguez et al., 2009).

A partir del desarrollo de nuevas tecnologías como la secuenciación masiva, es posible el descubrimiento y genotipificación de miles de marcadores genéticos como los marcadores de polimorfismo de nucleótido único (SNPs, por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) (Allendorf & Luikart, 2007). Los SNPs son variaciones en un solo nucleótido y representan la forma más común de polimorfismos genéticos (Edwards et al., 2005). Generalmente, son bialélicos, es decir, presentan solo dos alelos (Gorbach et al., 2009; Liu & Cordes, 2004). Se clasifican en transiciones (cambio entre bases purinas o pirimidinas) y transversiones (cambio entre bases purinas y pirimidinas), siendo las transiciones más comunes, especialmente el cambio de citosina (C) a timina (T). También se pueden presentar inserciones o deleciones debido a errores en la síntesis o reparación del ADN (Edwards et al., 2005; Yu et al., 2014).

Se estima que hay un SNPs por cada 500 nucleótidos en el genoma (Allendorf & Luikart, 2007). Además, se encuentran con mayor frecuencia en regiones codificantes, aunque no de manera exclusiva (Yu et al., 2014). En algunos casos, los SNPs en regiones codificantes pueden estar relacionados con enfermedades o adaptaciones locales, ya que este tipo de mutaciones puede alterar la secuencia de aminoácidos de la

proteína sintetizada. No obstante, el impacto de estas mutaciones depende del tipo de cambio y de la región en la que se localicen (Edwards et al., 2005). Las mutaciones presentes en los marcadores SNPs pueden clasificarse como sinónimas o no sinónimas. Las mutaciones sinónimas no provocan un cambio en el codón traducido, mientras que las no sinónimas sí generan una alteración en el codón, lo que puede modificar la secuencia de aminoácidos de la proteína resultante (Ramírez-Bello et al., 2013).

Los marcadores SNP pueden dividirse en dos grupos: neutrales y *outliers*. Los SNPs neutrales presentan variabilidad atribuible a procesos evolutivos no selectivos, como la deriva génica y flujo génico (Esguiarte et al., 2013). En cambio, los SNPs *outliers*, también conocidos como marcadores con potencial adaptativo pueden estar asociados a procesos de selección natural. En particular, los SNPs *outlier* pueden estar sujetos a presión selectiva y estar asociados a características ambientales (Lotterhos & Whitlock, 2014).

1.1.6 Genomas mitocondriales en moluscos gasterópodos

El filo de moluscos es un grupo megadiverso de especies, en el que la clase Gastropoda es el más diverso (Bieler, 1992). Este grupo se divide en seis subclases, Caengastropoda, Cocculiniformia, Heterobranchia, Neomphalina, Patellogastropoda y Vetigastropoda. Dentro de esta última, se encuentra la Superfamilia Lepetellida a la cual pertenece *Megathura crenulata*, donde es la única especie dentro de esta familia.

La clasificación de especies tradicionalmente se ha basado en semejanzas morfológicas. Sin embargo, en años recientes, la incorporación de información genética ha permitido una mayor precisión en estos agrupamientos. A pesar de esto, las reclasificaciones modernas consideran ambos tipos de información: morfológica y genética. En particular, la clase Gasterópoda ha pasado por un proceso de reclasificación, gracias a estudios filogenéticos que han facilitado el reacomodo de los distintos grupos que conforman esta clase (Uribe, 2016).

El genoma mitocondrial tiene un tamaño aproximado a las 16 kb, este genoma abarca un total de 37 genes, de los cuales 13 son genes codificantes para proteínas (por sus siglas en inglés, *PCGs*), dos ARN ribosomales y 22 *tARNs* (Boore, 1999). Fragmentos de *PCGs*, son generalmente utilizados como marcadores moleculares para la reconstrucción de filogenias; alguno de estos han sido los genes *28S ARNr*, *18S ARNr*, *H3* (histona), *COI*, *16S ARNr* (Aktipis & Giribet, 2010; Colgan et al., 2000; McARTHUR & Harasewych, 2003). Así como mitogenomas completos depositados en el Banco de Genes (GenBank); aproximadamente 450 mitogenomas completos de gasterópodos han sido reportados a la fecha (Ghiselli et al., 2021). Dentro de

este gran grupo, se han reportado dos especies filogenéticamente cercanas a *M. crenulata*: *Fissurella volcano* y *Diodora graeca* (Uribe-Arboleda, 2016).

Los marcadores del tipo mitocondrial además se han utilizado para definir relaciones filogenéticas, también se han empleado para identificar demografía poblacional, diferenciación poblacional y parámetros de diversidad genética. En este sentido, algunos de los marcadores más utilizados han sido el *16s ARNr* y *COI* en diferentes especies de haliótidos como *H. iris*, *H. rubra*, *H. rufescens*, *H. discus hannai* y *H. ovina* (Aguilera-Muñoz et al., 2009; Fang et al., 2023; Klinbunga et al., 2003; Maynard et al., 2005; Uribe et al., 2022). En lapas, se han determinado tiempos de divergencia y expansión poblacional en especies como *Concholepas concholepas*, *Lepetodrilus schrolli*, *Siphonaria lessoni*, *D. graeca* y *F. volcano* (Cárdenas et al., 2009; Nuñez et al., 2015; Simision, 2012; Uribe et al., 2022).

1.1.7 Genómica poblacional mediante SNPs

El uso de técnicas moleculares de secuenciación masiva y tecnologías de segunda generación han tenido un impacto positivo en el análisis de poblaciones silvestres sobre todo en organismos no modelo o que cuentan con escasa información genética. Este tipo de técnicas, como la de doble digestión de ADN (ddRAD-Seq, por sus siglas en inglés), se han utilizado en múltiples especies. Por ejemplo, en un estudio sobre el abulón labios verdes (*H. laevigata*). Se analizaron 8,786 loci neutrales y 323 loci con potencial adaptativo (*outlier*). Los resultados mostraron evidencia de una divergencia adaptativa local debida a una fuerte selección asociada a la heterogeneidad espacial ambiental, aun con conectividad oceanográfica fuerte. En particular, los loci neutrales no mostraron divergencia poblacional, tratándose de una metapoblación con poca diferenciación (F_{ST} global = 0.0081), con un aislamiento por distancia muy débil. Mientras que, los resultados de los loci *outlier* indicaron cinco grupos divergentes, y esta variación adaptativa estuvo correlacionada con la temperatura mínima del mar y la concentración de oxígeno. Más aún, estos autores pudieron anotar al menos 80 de los loci con potencial adaptativo con funciones relacionadas con tolerancia a alta temperatura y/o bajos niveles de oxígeno. En conclusión, se apoyó la hipótesis de divergencia adaptativa debida a la heterogeneidad costera ambiental en una meta población conectada de un organismo desovador masivo, como lo es el abulón (Sandoval-Castillo et al., 2018).

Por otra parte, en un trabajo sobre abulón amarillo (*H. corrugata*) en el Sistema de Corrientes de California, donde se utilizó la técnica de ddRAD-Seq, se identificaron un total de 2,242 SNPs, de los cuales 2,231 fueron loci neutrales y 9 loci con potencial adaptativo. Los resultados mostraron una estructura genómico-

poblacional neutral de dos poblaciones, una compuesta por localidades al sur de California y la otra abarcando el resto de la distribución de la especie en la península de Baja California. Estos resultados podrían estar relacionados con las características oceanográficas particulares de la región estudiada y la temperatura superficial del mar (Mares-Mayagoitia et al., 2024). En otro trabajo, sobre el abulón azul (*H. fulgens*) empleando la misma técnica de secuenciación masiva, se obtuvieron 9,100 loci neutrales y 17 *outliers*. En este estudio, se detectaron tres grupos genéticos, uno hacia la zona norte de la distribución de esta especie (de California, EE. UU. a Ensenada, Baja California, México), otro en el resto de la península de Baja California y un tercero en la Isla Guadalupe (Mares-Mayagoitia et al., 2025).

Estudios de genomas completos en otros organismos bentónicos en la región han mostrado patrones diferentes. Por ejemplo, se evaluó la estructura poblacional desde Kruse Ranch, California, EE.UU hasta Bahía Asunción, Baja California Sur, México en el molusco gasterópodo *Lottia gigantea* utilizando 908,948 SNPs. En este estudio, se encontró una estructura de norte a sur, asociada a la combinación de barreras oceanográficas, eventos climáticos históricos y procesos de selección (Nielsen et al., 2024). Otro ejemplo es el abulón negro (*H. cracherodii*) que presenta un patrón de diferenciación genética similar, ya que la población se divide en tres grupos genéticos: norte de California, centro-sur de California y Baja California (Wooldridge et al., 2024). Finalmente, este patrón de homogeneidad también fue observado en el abulón rojo (*H. rufescens*), donde se detectó una estructura genética sutil entre el norte y sur de Punta Concepción, California, EE. UU. y alta conectividad entre el resto de las localidades dentro de la distribución geográfica de la especie (Griffith et al., 2025).

Los estudios genómicos en la región de interés muestran resultados contrastantes desde panmixia (abulón negro y rojo) a divergencia poblacional (abulón amarillo y azul). Esto también se ha observado en diversas especies en la región tanto con marcadores nucleares como con mitocondriales (Ferrera-Rodríguez et al., 2024). Sin embargo, en estos estudios se enfatiza la relevancia del ambiente y patrones oceanográficos como fuerzas que moldean los patrones de estructura genética.

1.2 Justificación

La lapa gigante, *Megathura crenulata*, es un recurso con alto potencial acuícola por su valor nutritivo y uso biotecnológico; que ha sustentado una pesca artesanal y comercial desde hace 50 años. Además, el uso biotecnológico de la proteína *KLH*, que solo puede ser extraída de organismos vivos y sanos, se ha expandido y sus aplicaciones biomédicas son prometedoras derivando en una alta demanda del recurso.

Sin embargo, existe un desconocimiento de los aspectos genético-poblacionales del recurso, así como de su variabilidad morfológica a lo largo de su distribución, lo cual limita su aprovechamiento sostenible y el desarrollo de estrategias de conservación efectivas.

El uso de nuevas tecnologías de secuenciación masiva permite, en especies no modelo, identificar un gran número de marcadores moleculares como los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), los cuales son marcadores confiables y reproducibles que dan información para evaluar la genómica poblacional (diversidad y estructura) de especies marinas desovadoras masivas y de amplia distribución geográfica como la lapa gigante. La técnica de ddRAD-Seq, permite identificar marcadores SNPs tanto neutrales como adaptativos, que dan información acerca de la genética poblacional (diversidad y estructura), la conectividad (flujo génico), la historia demográfica y la adaptación local de los organismos marinos.

Debido a su importancia comercial y valor biotecnológico, la lapa gigante *Megathura crenulata* se considera un recurso genético prioritario para evaluar con el fin de proponer medidas de manejo que promuevan su preservación, conservación y aprovechamiento sostenible (incluido su cultivo). En este contexto, la aplicación de enfoques de genómica poblacional mediante tecnologías novedosas es fundamental para generar conocimiento sólido sobre su estructura genética y los procesos evolutivos que moldean sus poblaciones, lo cual permitirá diseñar estrategias de manejo y conservación eficaces que aseguren su viabilidad a largo plazo.

1.3 Hipótesis

Dentro de la distribución geográfica actual de lapa gigante, *Megathura crenulata*, se identificarán patrones de diversidad morfológica, así como diferencias en su genómica poblacional (diversidad y estructura) asociadas, principalmente a las características oceanográficas, como se ha observado en otras especies de gasterópodos que cohabitan en la región de la península de Baja California.

1.4 Objetivo general

Generar información morfológica y genómica de lapa gigante *Megathura crenulata* a lo largo de su distribución geográfica en las costas del Pacífico de la península de Baja California, México, con el fin de

identificar procesos evolutivos que influyen en sus poblaciones, así como los patrones de diferenciación morfológica y genética.

1.5 Objetivos particulares

1. Analizar la diversidad morfológica de *Megathura crenulata*, incluyendo dimensiones de la concha y patrones de coloración del manto y concha, para identificar diferencias entre poblaciones y determinar su posible correlación.
2. Describir el genoma mitocondrial de *Megathura crenulata*, y evaluar la diversidad y estructura genética, y la demografía historia con marcadores mitocondriales *16s ARNr* y *COI* a lo largo de su distribución geográfica en México.
3. Evaluar la diversidad y estructura genómica de *Megathura crenulata* con marcadores neutrales tipo SNPs en la península de Baja California

Capítulo 2. Metodología

2.1 Análisis de diversidad morfológica

2.1.1 Recolección y análisis biométricos

Un total de 166 ejemplares fueron colectados de ocho localidades dentro de la distribución geográfica de *Megathura crenulata* de acuerdo con la disponibilidad del recurso (Tabla 1). Los ejemplares fueron donados por diferentes cooperativas pesqueras de la península de Baja California. Estos fueron transportados en frío o congelado al Laboratorio de Genética Acuícola del Departamento de Acuicultura de CICESE donde, posteriormente, se realizaron las biometrías y muestreos correspondientes.

Tabla 1. Coordenadas geográficas (latitud y longitud) de ocho localidades de muestreo de *Megathura crenulata*, así como el número de muestras obtenidas por localidad (*n*).

Localidad	Abreviación	Latitud	Longitud	<i>n</i>
California	CAL	34° 01' 23.22" N	119° 45' 56.51" O	25
Ensenada	ENS	31° 42' 38.75" N	116° 39' 28.09" O	29
San Quintín	SQT	30° 27' 41.67" N	115° 57' 27.77" O	30
Isla San Jerónimo	IJS	29° 47' 31.99" N	115° 48' 04.62" O	24
Puerto Canoas	PCA	29° 25' 01.69" N	115° 07' 41.32" O	20
Punta Eugenia	PEU	27° 50' 53.12" N	115° 04' 55.13" O	15
Bahía Asunción	BAS	27° 02' 59.47" N	114° 17' 47.29" O	11
Isla Guadalupe	IGP	29° 02' 20.40" N	118° 16' 40.80" O	12
Total				166

Las biometrías de todos los ejemplares recolectados incluyeron la toma del peso húmedo total individual y la identificación del fenotipo de color del manto (tigre, café o negro; Figura 3a). Una vez desconchados los ejemplares, se midió el largo y ancho de las conchas; asimismo, se registró su color según las características encontradas en las muestras (verde, blanca, roja y rayada) (Figura 3b).



Figura 3. Fenotipos de color de manto (a) y concha (b) encontrados en ejemplares de *Megathura crenulata* a lo largo de su distribución geográfica.

2.1.2 Análisis de datos

Para el análisis estadístico de los datos, primero, se evaluó la normalidad y homocedasticidad de varianzas de las variables de peso húmedo total, largo, ancho y peso de las conchas, utilizando las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Posteriormente, se aplicó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis a las variables de peso húmedo total y largo de concha, con el fin de evaluar las posibles diferencias entre localidades. En los casos donde se encontraron diferencias significativas entre las variables dentro de las localidades muestreadas se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Solo para la variable de ancho de concha, se llevó a cabo una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía y se utilizó una prueba de Tukey *a posteriori*.

A partir del registro de los fenotipos de color de manto y concha, se calcularon las proporciones correspondientes por localidad, las cuales se representaron mediante gráficos de pastel en porcentaje.

Por otra parte, para evaluar la correlación entre el fenotipo de color de manto y concha, se realizó una tabla de contingencia sustentada con una prueba de χ^2 cuadrada (Zar, 1999). Todas las pruebas estadísticas fueron realizadas con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ en el programa Statistica 7.1 (Stat Soft, Inc.).

La relación entre las variables de peso húmedo total, largo y el ancho de concha se analizó mediante un modelo de regresión alométrico, utilizando las variables transformadas logarítmicamente para ajustar a la ecuación. Este análisis se realizó de manera global y separando los datos por fenotipos de color de manto y por coloración de concha. Se aplicaron modelos de interacción para evaluar si la pendiente y la intersección de las relaciones alométricas diferían significativamente entre los fenotipos de manto (tigre, café y negro) y los fenotipos de color de concha (verde, blanco, rojo y rayado). Para facilitar la interpretación de los resultados, se graficaron los ajustes globales y específicos por fenotipo, asegurando que todos los gráficos compartieran la misma escala en los ejes, lo que permite una comparación directa entre los diferentes fenotipos. Los análisis y visualizaciones se realizaron con el programa R (v.4.3.1), utilizando las siguientes librerías ggplot2 v3.5.1 (Wickham 2016a), dplyr v2.5.0 (Wickham et al., 2024b) y tidyr v1.3.2 (Wickham et al., 2024c).

2.2 Secuenciación y análisis del genoma mitocondrial

2.2.1 Muestreo y preparación de librerías para secuenciación del mitogenoma

Se colectaron tres muestras de *Megathura crenulata*, procedentes de California (CAL), Puerto Canoas (PCA) y Punta Eugenia (PEU). Para la extracción de ADN se utilizaron 30 mg de branquia, que fue conservado en etanol al 96% y mantenido a -20°C . Todas las muestras fueron resguardadas en el Laboratorio de Genética Acuícola de CICESE a -20°C .

En la extracción de ADN de las muestras de CAL y PEU se utilizó el kit comercial de ADN para células y tejidos, KingFisherTM, siguiendo las especificaciones del proveedor. Por otra parte, para la muestra de PCA el protocolo utilizado fue el de fenol-cloroformo-alcohol Isoamílico (Sambrook et al., 1989). El ADN genómico de cada muestra se cortó mediante sonicación con un Bioruptor[®], utilizando dos rondas de cinco ciclos de 30 segundos de sonicación y 30 segundos sin sonicación en la configuración alta. Posterior a esto, se siguió el protocolo de preparación de bibliotecas utilizando el kit de preparación Hyper Prep de Kapa

Biosystems® (KR0961-v4.15), se ligaron adaptadores específicos y se realizó una amplificación de 12 ciclos de PCR con cebadores indexados con nucleótidos específicos (Glenn et al., 2016). Con estos productos de PCR, se realizó una selección fragmentos con perlas magnéticas (Rohland & Reich, 2012); los fragmentos de interés iban de 250 a 450 pb. Las bibliotecas resultantes se secuenciaron utilizando el Illumina HiSeq 4000, generando lecturas de 150 nucleótidos. La biblioteca que se construyó a partir de la muestra de PCA fue enviada a secuenciar al Centro de Genómica Clínica de la Fundación de Investigación Médica de Oklahoma. Mientras que las bibliotecas construidas a partir de las muestras de CAL y PEU fueron enviadas a Omega Biotechnologies (<https://omegabiotek.com>).

2.2.2 Análisis bioinformático de secuencias mitocondriales

El análisis de la calidad de la secuencia se llevó a cabo con los programas Geneious v10 (<https://www.geneious.com>) y QIAGEN CLC Genomics Workbench, v10 (<https://digitalinsights.qiagen.com>), en el que se eliminaron las secuencias de baja calidad (límite de calidad = 0.05). Posteriormente, se realizó un ensamblaje *de novo* con parámetros específicos: filtrado de *contigs* con cobertura de profundidad mayor a 1.5, que contuvieran más de diez lecturas y se realizó un ensamblaje *de novo* con ambos programas (Geneious y CLC Genomics Workbench). En total, dos *contigs* de tamaño similar se obtuvieron de los programas de ensamblaje. Sin embargo, Geneious (Mcre_Gen_3) produjo un *contig* de 16,788 pb, mientras que CLC Genomics Workbench (Mcre_CLC3) produjo un *contig* de 15,155 pb. El *contig* Mcre_CLC3 tenía dos fragmentos faltantes uno de 69 pb y el segundo de 1,566 pb, además de otras pequeñas diferencias de nucleótidos. Por lo tanto, se diseñaron dos pares de cebadores específicos para amplificar estos fragmentos.

2.2.3 Diseño de cebadores para completar el mitogenoma

Para dilucidar las diferencias de tamaño y nucleótidos entre los *contigs* (Gen vs CLC), se diseñaron dos conjuntos de cebadores específicos utilizando *contigs* de Mcre_Gen_3 y Mcre_CLC3. Los cuales resultaron en dos fragmentos de 1,446 pb y 1,681 pb, respectivamente. El diseño de los primers se realizó con el programa primer3plus (Untergasser et al., 2012).

La secuencia de cebadores utilizados para amplificar la región de 1,446 pb fue F: 5'-TGAGAGACCAGGATTAGATACCCT-3' y R :5' GGGGCATGTATTTGCCGAGT 3' y para la región de 1,681 pb de

bases las secuencias fueron F: 5'-TTTATGCGAATGAGCACGCC-3' y R: 5' TGAGAGCAGCCCCTTTCTTG 3'. Asimismo, el máster mix que se utilizó contenía 1X de buffer Kapa A, 1 mM de MgCl₂, 0.2 de dNTP's, 0.2 mM de cada cebador, 0.4 µL de Taq Polimerasa Kapa y un total de 75 ng de ADN como templado, todo esto en un volumen final de 25 µL. Las condiciones de amplificación consistieron en 25 ciclos, con 94°C como temperatura de desnaturalización del ADN por 50 s, seguidos de la temperatura de hibridación que duro 1 min a 57°C y 58°C (región de 1,446 pb y 1,681 pb, respectivamente). Por último, la elongación fue a 72°C durante 50 s, estas amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis utilizando gel de agarosa al 1%, y las hebras sentido y antisentido fueron secuenciadas por Sanger en Eton Bioscience Inc. A partir de los resultados obtenidos se construyó un *contig* de consenso.

2.2.4 Anotación del mitogenoma

El *contig* consenso, que representa el mitogenoma de *M. crenulata*, se sometió a una búsqueda la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica). Asimismo, este *contig* se utilizó para la anotación de genes a través del servidor web Mitos (Bernt et al., 2013) con la configuración predeterminada adaptada a mitogenomas de invertebrados. Además, la verificación de la traducción de proteínas se llevó a cabo utilizando la herramienta de traducción ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>). Por último, se utilizó el servidor web tRNAscan para encontrar y corroborar los *tARNs*. Sin embargo, este software no identificó los *tARNs* de arginina (Arg), prolina (Pro), asparagina (Ans) y serina-I (Ser-I), estos fueron anotados por similitud través de la comparación de estos *tARNs* con los genomas mitocondriales de *D. graeca* y *F. volcano* (número de acceso GenBank en la Tabla 2).

2.2.5 Análisis filogenético con marcadores mitocondriales

Este análisis se realizó con el mitogenoma completo de *M. crenulata*, el cual se alineó con secuencias del mitogenoma de siete especies de gasterópodos marinos del orden taxonómico Lepetellida (Tabla 2). El alineamiento y los análisis posteriores se llevaron a cabo en el programa QIAGEN CLC Genomics Workbench, v20 (<https://digitalinsights.qiagen.com>). Asimismo, para determinar el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajusta basado en el criterio de información de Akaike (AIC) y el criterio de información bayesiano (BIC). El modelo seleccionado fue la evolución general reversible en el tiempo (GTR)

combinada con un modelo de sistema de distribución gamma, incorporando una variación de velocidad distribuida gamma entre sitios (GTR+G+I), e implementado la simulación Monte Carlo de la cadena de Markov. Para llevar a cabo este análisis se emplearon configuraciones predeterminadas junto con el programa jModelTest2 (Santorum et al., 2014). El árbol filogenético, que involucra 20,000 generaciones, 100 frecuencias de muestreo y configuraciones predeterminadas, se obtuvo con el modelo GTR+G+I en el programa Mr. Bayes 3.2 (Ronquist et al., 2014).

Tabla 2. Lista de taxones del orden Lepetellida utilizados para los análisis filogenéticos del mitogenoma y código de acceso a GenBank.

Superfamily	Taxon	Acceso GenBank	Tamaño (pb)	CDS tamaño (pb)	3 CDS tamaño (pb)	Referencia
Fissurelloidea	<i>M. crenulata</i> -PCA	OR911353	16,788	11,294	1,488	Presente estudio
Fissurelloidea	<i>M. crenulata</i> -PEU	PQ152234	16,787	11,118	1,449	Presente estudio
Fissurelloidea	<i>M. crenulata</i> -CAL	PQ152231	-	-	1,488	Presente estudio
Fissurelloidea	<i>D. graeca</i>	KT207825	17,209	11,535	1,498	Uribe <i>et al.</i> , 2016
Fissurelloidea	<i>F. volcano</i>	NC_016953	17,575	11,412	1,434	Simison (unpubl.)
Haliotoidea	<i>H. iris</i>	NC_031361	17,131	11,262	1,458	Fang <i>et al.</i> , (unpubl.)
Haliotoidea	<i>H. rubra</i>	NC_005940	16,907	11,253	1,455	Maynard <i>et al.</i> , 2005
Haliotoidea	<i>H. rufescens</i>	NC_036928	16,646	11,253	1,452	del Río-Portilla <i>et al.</i> (unpubl.)
Haliotoidea	<i>H. discus hannah</i>	EU595789	15,784	11,055	1,287	Ren <i>et al.</i> (unpubl.)
Lepetodrilioidea	<i>L. schrolli</i>	KR297250	15,579	11,406	1,518	Uribe <i>et al.</i> 2016

2.2.6 Muestreo, análisis de diversidad y estructura genética con marcadores mitocondriales

El análisis de los fragmentos de *16S ARNr* y *COI* incluyó 125 muestras, las cuales fueron recolectadas en ocho localidades dentro del intervalo de distribución geográfica de la especie, estos fueron: California (CAL, n = 19), Ensenada (ENS, n = 25), San Quintín (STQ, n = 16), Isla San Jerónimo (ISJ, n = 14), Puerto Canoas (PCA, n = 15), Punta Eugenia (PUE, n = 21), Bahía Asunción (BAS, n = 8) e Isla Guadalupe (IGP, n = 7). Se utilizó el protocolo de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (Sambrook et al., 1989) para la extracción de ADN total. La amplificación de los fragmentos del gen *16S ARNr*, se realizó con cebadores diseñados por Palumbi et al. (2002). Por otra parte, los cebadores para amplificar el gen del citocromo C oxidasa I (*COI*) se diseñaron a partir de la secuencia mitocondrial de *M. crenulata*, que se reportó en el banco de genes (GenBank OR911353) como resultado presente trabajo. Las condiciones de amplificación por PCR fueron las siguientes: en un volumen final de 25 μ L; se utilizó 1X de buffer Kapa A, 1 mM de $MgCl_2$, 0.2 de dNTP's, 0.2 μ M de cada cebador, 0.4 μ L de Taq Polimerasa Kapa y un total de 50 ng de ADN como

templado. Las condiciones de amplificación consistieron en de 30 ciclos, con 94°C como temperatura de desnaturalización del ADN por 50s, seguidos de la temperatura de hibridación que duró 1 min a 56°C y 55°C (16s y *COI*, respectivamente), por último, la elongación fue a 72°C durante 50 s, estas amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis para ello se utilizó gel de agarosa al 2%, y las hebras sentido y antisentido fueron secuenciadas por *The Southwest Fisheries Science Center (SWFSC, NOAA)*.

2.2.7 Análisis de diversidad y estructura genética con marcadores mitocondriales

El análisis de calidad, corte y alineamiento de secuencias se realizaron individualmente para los genes *16S ARNr* y *COI*, y para el fragmento concatenado de estos genes, esto se realizó con el programa Mega6 v. 11 (Tamura et al., 2013). Los parámetros de diversidad, como el número de haplotipos, la riqueza de haplotipos y la diversidad de nucleótidos, se evaluaron con el programa ADNSP versión 6.12.03 (Rozas et al., 2017). Para evaluar los niveles de estructura genética, los valores pareados (ϕ_{ST}) entre localidades y sus correspondientes valores de probabilidad estadística se calcularon con el programa Arlequin versión 2.3 (Excoffier et al., 2005). Asimismo, los valores de p se corrigieron con la corrección de Bonferroni (Rice, 1989).

2.2.8 Historia demográfica

Para evaluar los parámetros demográficos, se realizaron pruebas de neutralidad de distribución de desajuste de *Tajima D*, *F de Fu*, y se probaron valores significativos con 10,000 réplicas en la versión 6.12 del programa DNASP. 03 (Rozas et al., 2017). Finalmente, los valores de distribución de discordancia se graficaron con el programa Sigmaplot v12 (Systat Software Inc., San José, CA, EE. UU.). Además, se emplearon los programas HapStar (Teacher & Griffiths, 2011) e InkScape para generar una red de expansión mínima para ilustrar la distribución y relación de los haplotipos.

Asimismo, se llevó a cabo un análisis de diagrama Bayesiano Skyline (*BSP*, por sus siglas en inglés) (Ho & Shapiro, 2011) para inferir cambios en el tamaño efectivo de la población a lo largo del tiempo (Drummond et al., 2005). Este análisis utilizó la matriz concatenada de los genes *16S ARNr-COI* y colapsada por haplotipos, utilizando el software BEAST v.2.7.6 (Bouckaert et al., 2019). Las simulaciones de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) se ejecutaron durante 25,000,000 de generaciones, con muestreo de parámetros y

árboles cada 2,500 generaciones. El primer 10% de las ejecuciones se descartaron. La convergencia de las corridas se verificó con el programa Tracer v.1.7.2, asegurando que los tamaños efectivos de muestra (ESS) superaran los 200. Se aplicó una tasa de sustitución nucleotídica de 0.0157 sustituciones/sitio/millón de años, considerando la tasa de sustitución reportada por Wilke y colaboradores (2009) para invertebrados. Para definir el tiempo de estabilización poblacional, se realizó un análisis de regresión lineal en el programa R. Se establecieron tres agrupamientos temporales de 0 a 18,000 años, de 18,000 a 25,000 años y de 25,000 a 50,000 años.

2.3 Genómica poblacional asociada a marcadores SNPs

2.3.1 Recolección y extracción de material genómico

Un total de 144 muestras de *Megathura crenulata* fueron utilizadas para la preparación de librerías genómicas. El protocolo de recolección se encuentra descrito en el capítulo II de este documento inciso 2.5.1; asimismo, las coordenadas de cada localidad se encuentran descritas en la tabla I. Considerando las ocho localidades muestreadas, para este análisis se utilizaron 20 muestras de California (CAL), 23 de Ensenada (ENS), 23 de San Quintín (SQT), 15 de Isla San Jerónimo (ISJ), 20 de Puerto Canoas (PCA), 23 de Punta Eugenia (PEU), 9 de Bahía Asunción (BAS) y 11 de Isla Guadalupe (IGP).

La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el protocolo de fenol-cloroformo-isoamílico (Sambrook, 1989). La calidad del ADN genómico extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% por 45 min a 90 volts con Super Buffer 1x, previamente teñido con GelRed™. La integridad (tamaño en pb) de los fragmentos obtenidos se comparó con un marcador de referencia de peso molecular de 1 kb (New England BioLabs). Los geles de agarosa se visualizaron utilizando un sistema digital de fotodocumentación Gel Doc™ XR+ (BIO-RAD) con luz UV y fue fotografiado utilizando el programa Quantity One®. La pureza, el contenido de ARN y de proteínas en el ADN extraído se determinó mediante lecturas en un espectrofotómetro ND1000 (NanoDrop Technologies®) y se cuantificó la concentración de este mismo se cuantificó con Qubit® (Thermo Scientific™). Todas las muestras de ADN fueron estandarizadas a 50ng/μL.

2.3.2 Preparación de librerías genómicas (ddRAD-Seq)

Las librerías genómicas se construyeron siguiendo el protocolo descrito por Petersen et al. (2012). Para ello, se realizó una doble digestión de 500 ng ADN genómico de cada muestra con enzimas de restricción, las cuales fueron MspI (5'-C|CGG-3') de corte frecuente y EcoRI-HF (5'-G|AATTC-3') de corte poco frecuente (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Posteriormente, se ligaron adaptadores específicos P1 (48 barcodes) y P2 (común) a los extremos cohesivos resultantes del proceso de doble digestión con la ADN T4 ligasa (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE. UU.), seguido de la preparación de una mezcla equimolar a partir de los 48 códigos de barras diferentes. Finalmente, se realizó una selección de fragmentos de 300 a 500 pb utilizando el equipo Pippin (Sage Science, Beverly, MA, Estados Unidos). Se prepararon tres librerías con 48 muestras cada una, para esto se utilizaron los índices 2-CGATGT, 3-TTAGGC, 5-ACAGTG descritos en la tabla A de la sección de anexos. Las librerías se enviaron para su secuenciación en Illumina Hi-Seq X con 150 pb con extremo pareado en Novogene (Sacramento, Estados Unidos).

2.3.3 Ensamblaje *de novo* de lecturas

Todas las secuencias se demultiplexaron utilizando el programa STACKS v2.64 (Catchen et al., 2013), con el módulo *process_radtags*, se retiraron los adaptadores y se realizó un análisis de calidad de las lecturas. A partir de esto, se cortaron las secuencias a 140 pb y se mantuvieron las que tuvieron un valor de calidad de q_{25} ($Phrep = q$). Teniendo en cuenta lo anterior, las muestras con menos de 750,000 lecturas fueron descartadas para posteriores análisis. Las lecturas retenidas se ensamblaron para el llamado de SNPs utilizando el módulo STACKS *de novo* (*denovo_map.pl*) y los parámetros utilizados para construir los SNPs fueron $-m = 5$ (profundidad mínima) y $-M = 4$ (número máximo de diferencias permitidas entre individuos). Finalmente, para construir el catálogo de SNPs se utilizó un máximo de seis desajustes entre loci muestrales entre individuos $-n = 6$. Para identificar los loci en el catálogo, se utilizó el módulo de *populations* en STACKS, incluyendo un porcentaje mínimo de individuos de todas las poblaciones necesarios para procesar un locus ($-r = 0.08$) y que estos estuvieran en al menos el 90% de las localidades ($-p = 7$). Además de una frecuencia alélica mínima (MAF) de 0.03 ($-min_maf$). Por último, en este mismo módulo se utilizó el parámetro $-write-single-snp$ para que escribiera solo un SNP por locus.

A partir del catálogo de SNPs obtenido en el módulo anterior (*populations*), se utilizó el programa vcfTools v.3.0 (Danecek et al., 2011) para filtrar individuos con un porcentaje mayor al 20% de datos faltantes y loci

(SNPs) con más del 10% de datos faltantes. Por otra parte, para realizar los siguientes análisis, se utilizó el programa PGDSPIDER v2.1.1.5 (Lischer & Excoffier, 2012) para convertir los formatos vcf a los necesarios para cada programa a utilizar. Con el programa Plink (Purcell et al., 2007) se detectaron loci con desequilibrio de ligamiento y de las comparaciones de marcadores con un r^2 mayor a 0.2, solo se eliminó un marcador de la base de datos. Por último, para evitar el efecto de posible contaminación cruzada, se realizó una prueba de relación entre individuos (*relatedness*) en el programa vcftools v.3.0 (Danecek et al., 2011) con la herramienta *relatedness2*. Todos los individuos con un valor de $\phi_i > 0.25$ fueron eliminados de la matriz de marcadores SNPs.

2.3.4 Detección de marcadores con potencial adaptativo (*outliers*)

La detección de este tipo de marcadores se llevó a cabo mediante tres programas, Bayescan v.2.1 (Foll & Gaggiotti, 2008), PCAdapt v.4.3.3 (Luu et al., 2017; Privé et al., 2020) y OutFlank v0.2 (Witlock & Lotterhos, 2015). Bayescan se ejecutó con un pr_odds de 100, un *burn-in* de 50,000 pasos y 100,000 iteraciones. Los resultados se corrigieron utilizando una tasa de falsos descubrimientos (FDR) de 0.05 con el logaritmo de los valores q . En el caso de PCAdapt, se realizó primero un análisis de componentes principales (PCA) para determinar el número más probable de poblaciones ($k = 2$) y los SNPs con potencial adaptativo se detectaron tras corregir la distribución de los valores p mediante un FDR con valores q de 0.05. Por último, el programa OutFLANK se ejecutó utilizando una distribución F_{ST} neutral. Se eliminaron loci con valores F_{ST} en los extremos de ambas colas (parámetros de LeftTrimFraction y RightTrimFraction de 0.05), una heterocigocidad mínima de 0.1, y los loci con potencial adaptativo se identificaron utilizando un intervalo de valores q de 0.05.

2.3.5 Diversidad genética

La detección de loci fuera de Equilibrio de Hardy-Weinberg se llevó a cabo con el programa GenoDive v3.06 (Meirmans, 2020), para esto se utilizaron 10,000 permutaciones y los marcadores fuera de equilibrio en al menos el 50% de las localidades fueron removidos de la matriz de loci neutrales. Asimismo, con el mismo programa se obtuvieron parámetros de diversidad genómica como heterocigocidad observada (H_o), heterocigocidad esperada (H_e), riqueza alélica (Ar) y coeficiente de endogamia (F_{IS}), a partir de la matriz de loci neutrales para cada una de las localidades. Los valores de probabilidad fueron corregidos por el método de Bonferroni (Sokal & Rohlf, 1969; Rice, 1989).

Con el objetivo de determinar diferencias estadísticas entre las localidades a partir de los parámetros de diversidad genómica, se evaluaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de varianzas para ser comparados con un análisis de varianzas. Además, se realizó una prueba *a posteriori* para determinar la significancia estadística. Por último, considerando solamente el coeficiente de endogamia (F_{IS}), se realizó una prueba *t* – *Student* para identificar por localidad si el promedio es igual o diferente de cero.

2.3.6 Diferenciación genómica y estructura poblacional

A partir de la base de datos de marcadores neutrales se estimó el coeficiente de fijación pareada (F_{ST}) para todas las localidades. Este análisis se llevó a cabo en el programa GenoDive v3.06 (Meirmans, 2020) y se utilizaron 10,000 permutaciones. El valor estadístico fue sometido a una corrección secuencial de Bonferroni (Sokal & Rohlf, 1969; Rice, 1989).

Con respecto a la estructura poblacional se llevó a cabo un Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC, por sus siglas en inglés) para agrupar a los individuos genéticamente relacionados en diferentes agrupamientos bayesianos. Este análisis, se realizó con el paquete de R Adegenet v2.1.10 (Jombart & Ahmed, 2011). Se utilizó la función *xvalDapc* para seleccionar el número adecuado de componentes principales y evitar el sobreajuste. El número de grupos fue evaluado con la función *find.clusters* usando el Criterio de Información Bayesiano (BIC) y el DAPC final se realizó con la función *dapc* basándose en los componentes seleccionados por *xvalDapc*.

Además, se utilizó el programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), con el cual se evaluó el número más probable de componentes genéticos ($K = 1-8$). Este análisis agrupa a los individuos de acuerdo con la probabilidad de que cada uno pertenezca a un grupo, esto basándose en sus frecuencias alélicas y nivel de coancestría. Para ejecutar este programa se realizaron corridas con 10,000 iteraciones (*burn in*) y 100,000 iteraciones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), y se evaluaron los niveles de K de 1 a 8 con 10 réplicas por cada K . La información de salida fue analizada para inferir el número más probable de L mediante el estadístico delta K (ΔK) (Evanno et al., 2005), esto realizó con Structure Harvester ER (Earl & VonHoldt, 2012).

2.3.7 Conectividad genética entre localidades

Una red de conectividad genética entre localidades se construyó con las tasas bidireccionales de migración relativa obtenidas a partir de la matriz de SNPs neutrales. Para ello, se estimó la tasa de conectividad entre las localidades mediante el estimador G_{ST} (Nei, 1972) como medida de distancia genética. El análisis se llevó a cabo con la función *divMigrate* en la paquetería R *diversity* v1.9.9 (Keenan et al., 2013), se implementaron 1,000 repeticiones de *bootstrap* y un filtro de 0.1. Los patrones de migración fueron graficados con la paquetería *igraph* v2.0.3 en R (Csardi & Nepusz, 2006) y solo fueron graficados patrones con un valor mayor a 0.4.

Un análisis de aislamiento por distancia (IBD, por sus siglas en inglés), se realizó comparando las distancias genéticas y las distancias geográficas entre las localidades. Para el cálculo de distancias genéticas se utilizó el método de Nei (1972) estimada con la función *dist.genpop* de la paquetería *Adegenet* v2.1.10 (Jombart & Ahmed, 2011) en R. El cálculo de las distancias geográficas se llevó a cabo con el paquete de R *geosphere* v1.5-10 (Hijmans, 2019). La prueba de Mantel se realizó con la función *mantel.randtest()* en la paquetería *Adegenet* v2.1.10 (Jombart & Ahmed, 2011) se utilizaron 999 permutaciones. Los resultados se visualizaron graficando las distancias geográficas (eje X) con las distancias genéticas (eje Y); por último, de la prueba de Mantel se extrajo el valor de correlación (r^2) entre ambas matrices.

Para la construcción del mapa, se utilizaron diversas paqueterías en R. La paquetería *rnaturalearth* v1.0.1 (South, 2017) proporcionó los datos geoespaciales de los países, los cuales fueron procesados con *sf* v1.0 (Pebesma, 2018) en formato *simple features*. La visualización se realizó con *ggplot2* v3.5.1 (Wickham, 2016a), lo que permitió la superposición de capas para representar el contorno de los países y las poblaciones de interés. Se añadieron elementos cartográficos mediante *ggspatial* v1.1.9 (Dunnington, 2021), incluyendo una escala gráfica, una flecha de norte y anotaciones con los nombres de localidades, cuerpos de agua y países. Finalmente, el sistema de coordenadas se ajustó con *coord_sf()*, delimitando la región de estudio.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Análisis de diversidad morfológica

3.1.1 Análisis biométricos

A lo largo de su distribución geográfica, *Megathura crenulata* presentó diferencias en su tamaño, evaluado a partir del peso húmedo total (Figura 4a). La localidad que presentó ejemplares con menor peso húmedo total fue CAL (111.8 ± 45.8 g, $n=30$), mientras que, la localidad de BAS presentó organismos más grandes y con mayor variación en su peso húmedo total (381.5 ± 138.8 g, $n=11$). El resto de las localidades mantuvieron un intervalo de peso desde 145 g hasta 305 g (ENS, SQT, ISJ, PCA, PEU e IGP). Estadísticamente, BAS fue significativamente diferente de todas las localidades ($p= 0.0007$) y CAL solo de PCA, PUE, BAS e IGP ($p = 0.000001$) (Figura 4a).

Por otro lado, tanto el largo como el ancho de la concha fueron similares entre las localidades. Sin embargo, al analizar exclusivamente el largo de la concha, ISJ presentó un tamaño significativamente menor (7.73 ± 0.69 cm) en comparación con las demás localidades (Figura 4b).

En cuanto al ancho de la concha, se observó una mayor variabilidad entre localidades (5.8 ± 2.2 cm). No obstante, ISJ presentó el menor valor (4.7 ± 0.46 cm), siendo significativamente diferente ($p = 0.0007$) en comparación con las otras localidades, excepto con SQT (5.06 ± 0.5 cm). Cabe destacar que SQT no mostró diferencias significativas con respecto a CAL, ENS, PCA, PEU, BAS e IGP. En general, el ancho de la concha varió entre 5.28 cm y 9.9 cm en todas las localidades (Figura 4c).

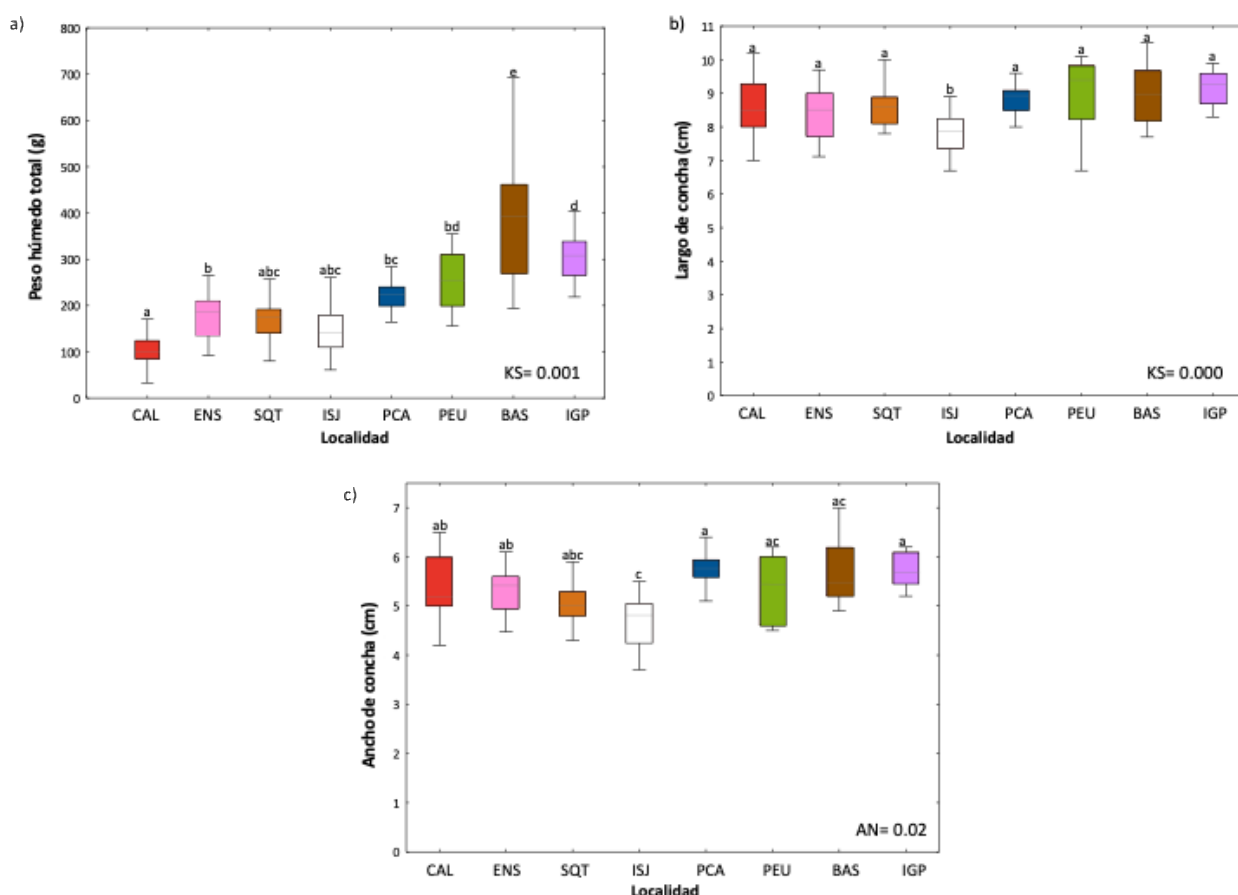


Figura 4. Parámetros biométricos de ejemplares de lapa gigante, *Megathura crenulata*, provenientes de ocho localidades dentro de su distribución geográfica. a) Peso húmedo total (g), b) Largo de concha (cm) y c) Ancho de concha (cm). Los datos se representan mediante gráficos de cajas y bigotes, donde la línea central indica la mediana (para a y b) y el promedio (para c). Los bordes de la caja corresponden al rango intercuartílico (Q1–Q3) y los bigotes muestran la dispersión de los datos. KS = Kruskal-Wallis; AN = ANOVA de una vía. Las letras indican diferencias significativas entre grupos según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (a y b) y Tukey (c).

3.1.2 Distribución del fenotipo de manto y color de conchas de *M. crenulata* a lo largo de su distribución geográfica

A lo largo de la distribución geográfica de *M. crenulata* evaluada en este estudio, se observó una variación en la proporción de fenotipos entre localidades. En CAL, se registraron únicamente dos fenotipos de color de manto: negro (88%) y café (12%). En ENS, los tres fenotipos estuvieron presentes, con el tigre como predominante (38%), seguido del café (34%) y el negro (24%). La localidad de SQT también presentó los tres fenotipos, aunque en diferentes proporciones: tigre (47%), negro (37%) y café (17%). De manera similar, en ISJ se registraron los fenotipos de color de manto tigre (46%), negro (42%) y café (12%).

En las localidades más al sur, los fenotipos tigre y café fueron más comunes en las localidades de más al sur. Por ejemplo, en PEU, ambos fenotipos representaron un 45% cada uno, mientras que el negro solo el 5%. Este patrón se repitió en PCA, donde el tigre predominó (60%), seguido del café (27%) y el negro (12%). En BAS, en el extremo sur de la distribución, el fenotipo negro estuvo ausente, registrándose únicamente los fenotipos tigre (64%) y café (36%). Por último, en IGP, el único fenotipo presente fue el negro, con un 100% de los ejemplares evaluados (Figura 5).

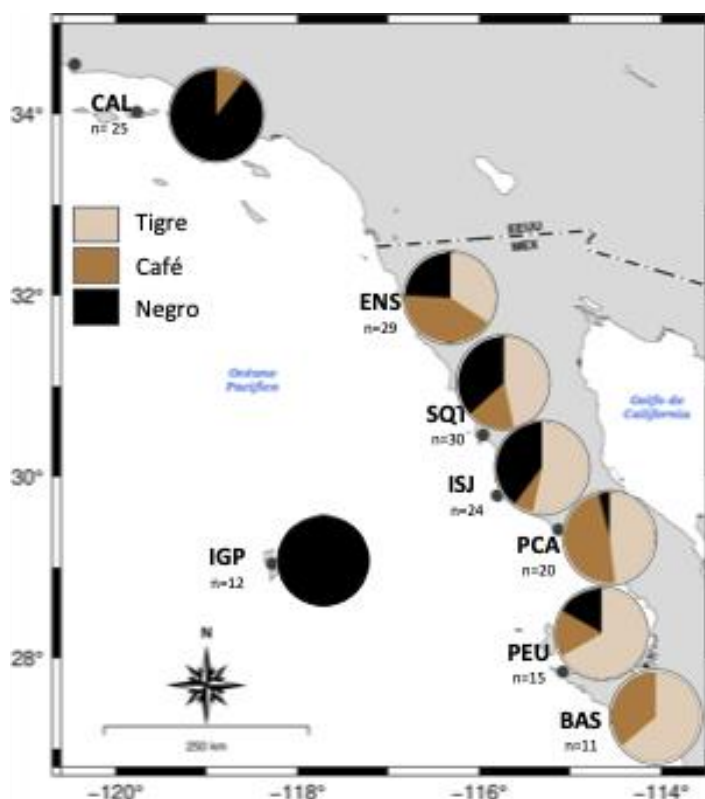


Figura 5. Distribución de fenotipos de manto en ocho localidades evaluadas dentro de la distribución geográfica de *Megathura crenulata*.

La distribución de los diferentes colores de las conchas varió considerablemente entre las localidades evaluadas. El fenotipo de color de concha verde fue predominante en la región, ya que estuvo presente en todas las localidades. Seguido del fenotipo de color de concha rayado, que, aunque menos común en algunas áreas, también se encontró en todas ellas. Sin embargo, las conchas roja y blanca fueron exclusivas de algunas localidades (Figura 6).

Por localidad, en CAL se observaron los fenotipos de color de concha rojo (56%), rayado (20%) y verde (24%). En ENS, SQT y PCA, solo se registraron los fenotipos rayado y verde. En ENS y PCA, el fenotipo rayado predominó con un 76% y 80%, respectivamente, mientras que en SQT destacó el fenotipo verde con un

73% (Figura 6). En contraste, en ISJ, PEU y BAS predominó el fenotipo rojo, con porcentajes del 54%, 53% y 36%, respectivamente. Finalmente, IGP fue la única localidad donde estuvieron presentes los cuatro fenotipos de color de concha, con predominancia del fenotipo rayado (33%) y la única localidad donde se registró el fenotipo de color de concha blanco, con un 25% de presencia (Figura 6).

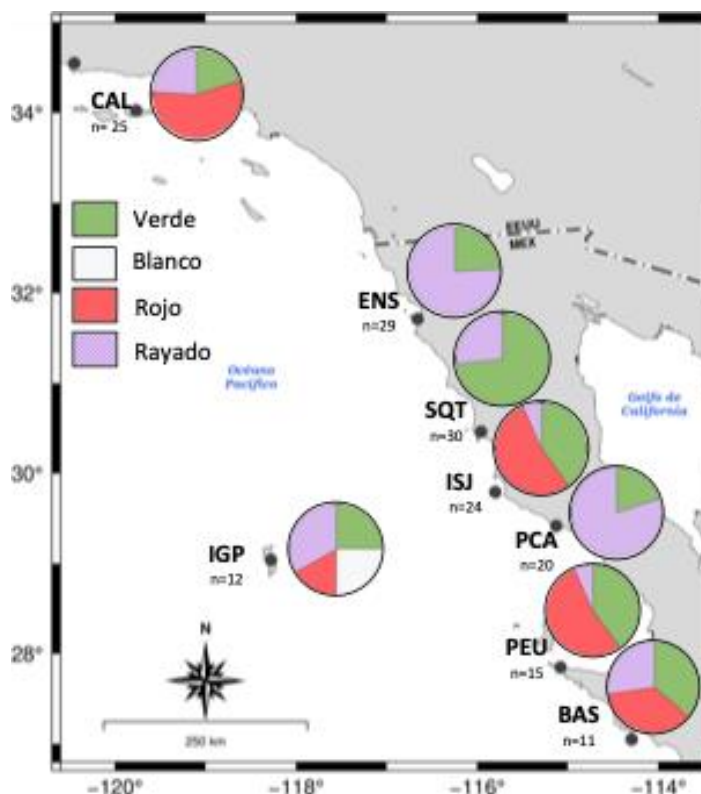


Figura 6. Distribución de fenotipos de color de concha en ocho localidades evaluadas dentro de la distribución geográfica de *Megathura crenulata*.

3.1.3 Análisis entre las variables biométricas y fenotipos de color de manto y conchas

En general, se identificaron tres fenotipos de color de manto: tigre, café y negro. Al agrupar las variables biométricas, se observaron variaciones significativas en el peso húmedo total ($p < 0.023$). Los ejemplares con manto negro presentaron el menor peso húmedo total y no se encontraron diferencias significativas del peso húmedo total entre los diferentes fenotipos de color tigre y café (Figura 7a). Por otro lado, la variables de largo y ancho de concha no mostraron diferencias significativas entre los distintos fenotipos de manto (Figura 7b y 7c).

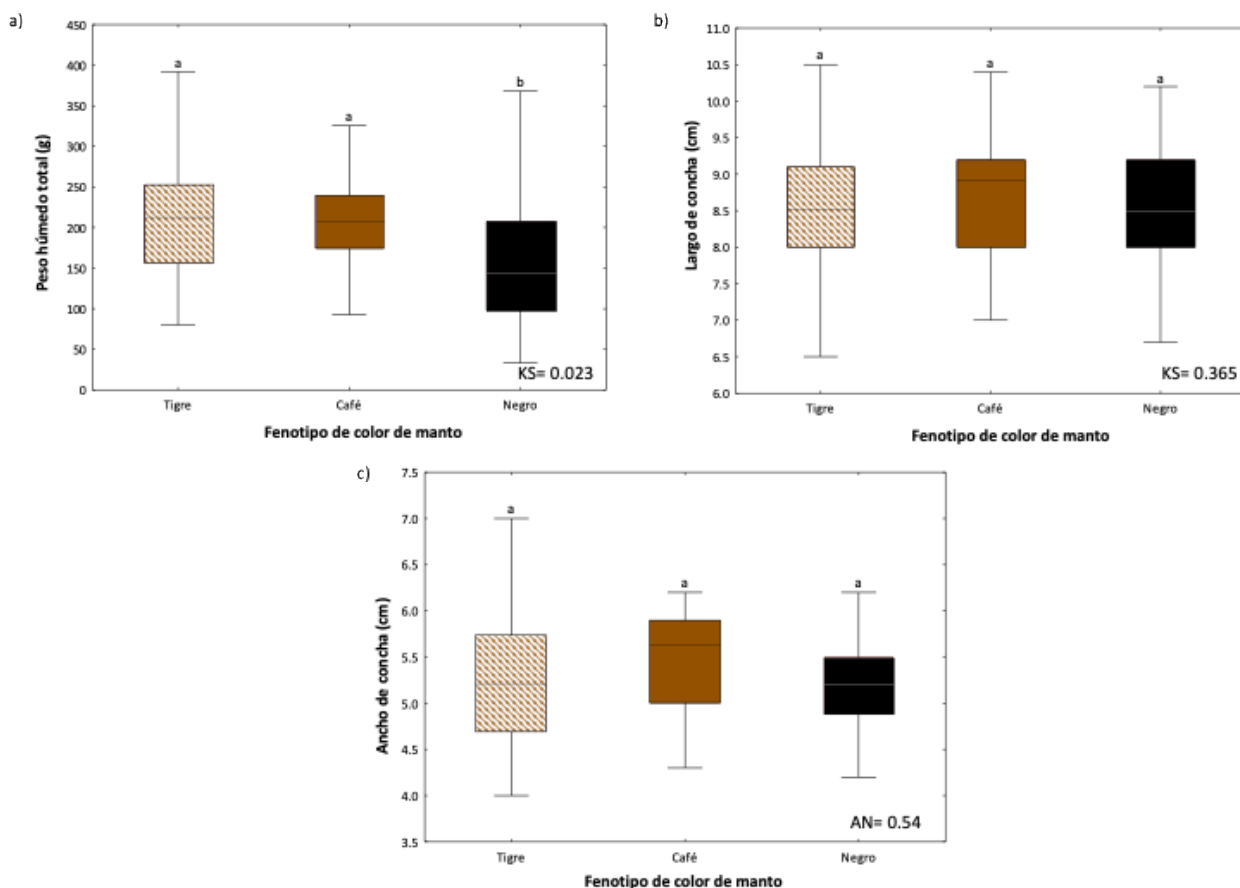


Figura 7. Variables biométricas de ejemplares de lapa gigante, *Megathura crenulata*, agrupados por fenotipo de color del manto: tigre, café y negro. a) Peso húmedo total (g), b) Largo de concha (cm) y c) Ancho de concha (cm). Los datos se representan mediante gráficos de cajas y bigotes, donde la línea central indica la mediana (para a y b) y el promedio (para c). Los bordes de la caja corresponden al rango intercuartílico (Q1–Q3) y los bigotes muestran la dispersión de los datos. KS = Kruskal-Wallis; AN = ANOVA de una vía. Las letras indican diferencias significativas entre grupos según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (a y b) y Tukey (c).

3.1.4 Análisis biométrico de la coloración en conchas

Los ejemplares de *M. crenulata* evaluados en el presente trabajo, además de las variaciones en el fenotipo del color de manto, se identificaron diferencias en la coloración de conchas de estos organismos, encontrándose cuatro fenotipos de color de concha: verde, blanco, rojo y rayado.

Al agrupar los ejemplares de *M. crenulata* según la coloración de la concha, se identificó que aquellos con concha roja presentaron el mayor promedio de peso húmedo total. Sin embargo, las diferencias en el peso húmedo total entre los cuatro colores de concha no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.271$; Figura 8a). En cuanto a la longitud de la concha, los colores verde, blanco y rayado mostraron promedios similares, mientras que las conchas rojas fueron significativamente más pequeñas en comparación con las

verdes y blancas ($p=0.020$; Figura 8b). El análisis del ancho de la concha reflejó un patrón similar al de la longitud, con las conchas rojas presentando el menor promedio. Estadísticamente, solo las conchas blancas mostraron un tamaño similar al de las rojas (Figura 8c).

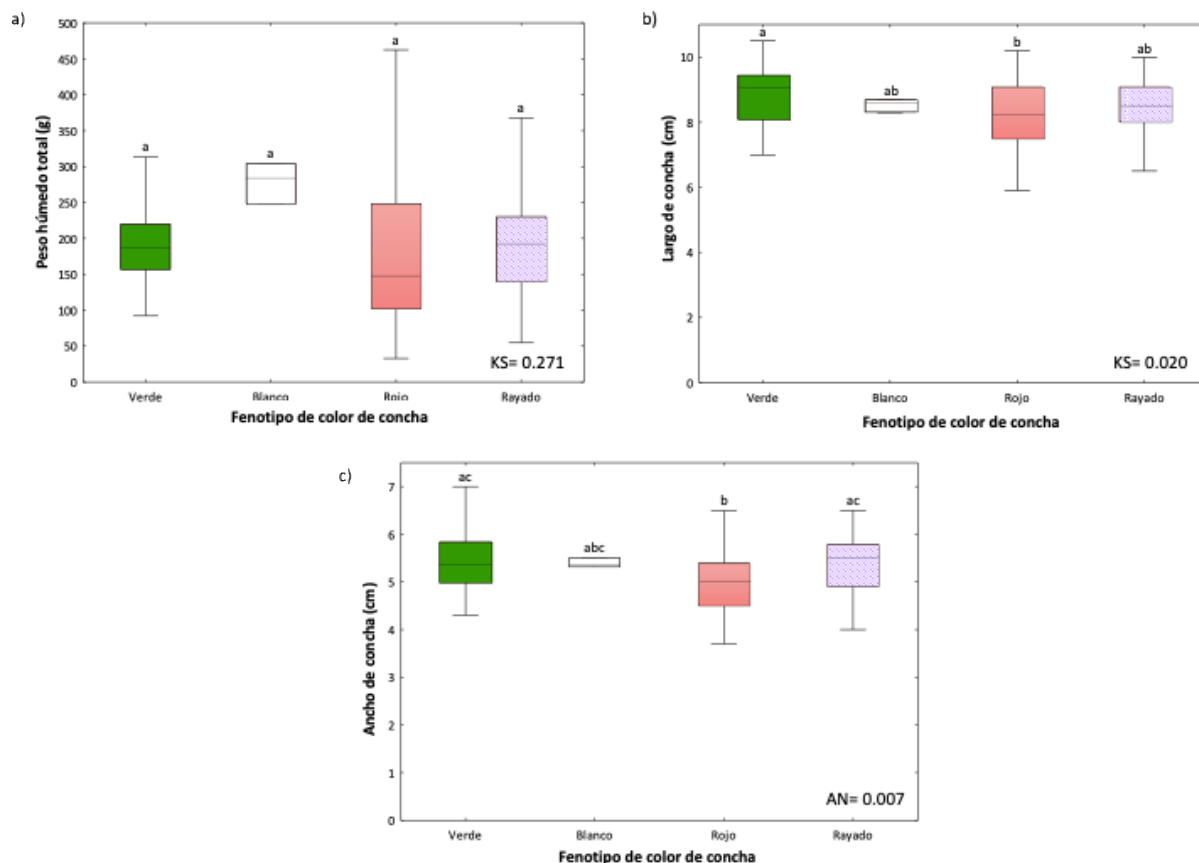


Figura 8. Variables biométricas de ejemplares de lapa gigante, *Megathura crenulata*, agrupados por fenotipo de color de concha: verde, blanco, rojo y rayado. a) Peso húmedo total (g), b) Largo de concha (cm) y c) Ancho de concha (cm). Los datos se representan mediante gráficos de cajas y bigotes, donde la línea central indica la mediana (para a y b) y el promedio (para c). Los bordes de la caja corresponden al rango intercuartílico (Q1–Q3) y los bigotes muestran la dispersión de los datos. KS = Kruskal-Wallis; AN = ANOVA de una vía. Las letras indican diferencias significativas entre grupos según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (A y B) y Tukey (c).

3.1.5 Correlación entre la coloración del manto y de la concha de *Megathura crenulata*

De manera general, las combinaciones de los fenotipos de color de manto y de la concha que presentaron la mayor proporción fueron el fenotipo de manto tigre y en concha rayada (frecuencia = 27), seguido del fenotipo negro con concha roja (frecuencia = 22) y una única combinación de manto albino con concha verde se presentó en un ejemplar de PEU (Figura 9).

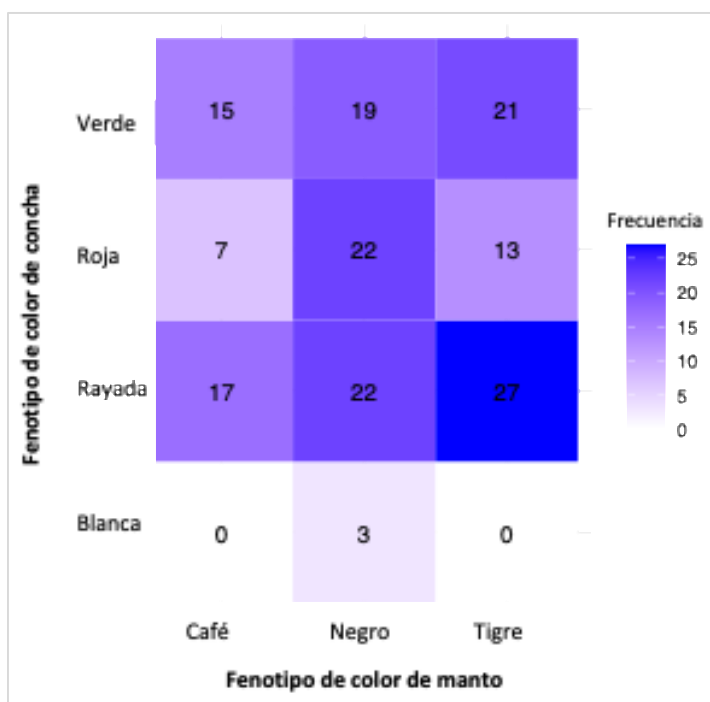


Figura 9. Distribución de frecuencias en los fenotipos de color de manto y de concha en el total de ejemplares de *Megathura crenulata*, colectada en ocho localidades de su distribución geográfica. Prueba de χ^2 , $p > 0.25$, indica falta de asociación estadísticamente significativa entre los fenotipos de color de manto y concha encontrados.

El análisis de la tabla de contingencia fue soportado por una prueba de χ^2 e indicó que no hay una relación positiva entre las frecuencias de los diferentes fenotipos de color de manto con respecto a los fenotipos y de color de las conchas ($p = 0.25$) encontrados en la región donde se distribuye *M. crenulata*.

3.1.6 Análisis alométrico de *Megathura crenulata*

En el análisis de regresión lineal entre largo de concha y peso húmedo total, se observó que el crecimiento es alométrico positivo. El modelo lineal obtuvo un intercepto de -1.236 y una pendiente de 2.987 ($p < 0.001$) (Figura 10a), lo que sugiere que el peso húmedo total aumenta de forma desproporcionada en relación con el largo de concha. Esto implica que, por cada unidad de aumento en el largo de concha, el peso húmedo total incrementa aproximadamente 2.99 unidades. Este crecimiento alométrico positivo refleja un aumento más rápido del peso en comparación con el largo, lo cual podría estar relacionado con una mayor acumulación de masa muscular a medida que los individuos crecen.

Sin embargo, al analizar esta misma relación alométrica (largo de concha y peso húmedo total) pero agrupando los datos por fenotipos de color de manto y concha, no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas entre los fenotipos de color de manto (Intercepto 0.5902, $p= 0.705$; Figura 10b) ni entre el color de conchas (intercepto 1.03, $p= 0.735$, Figura 10c); en términos de la pendiente o el intercepto de esta relación. Esto sugiere que la relación alométrica entre el peso húmedo y el largo de concha es consistente y que las variaciones en el fenotipo de manto y coloración de concha no están relacionadas significativamente con las características morfológicas.

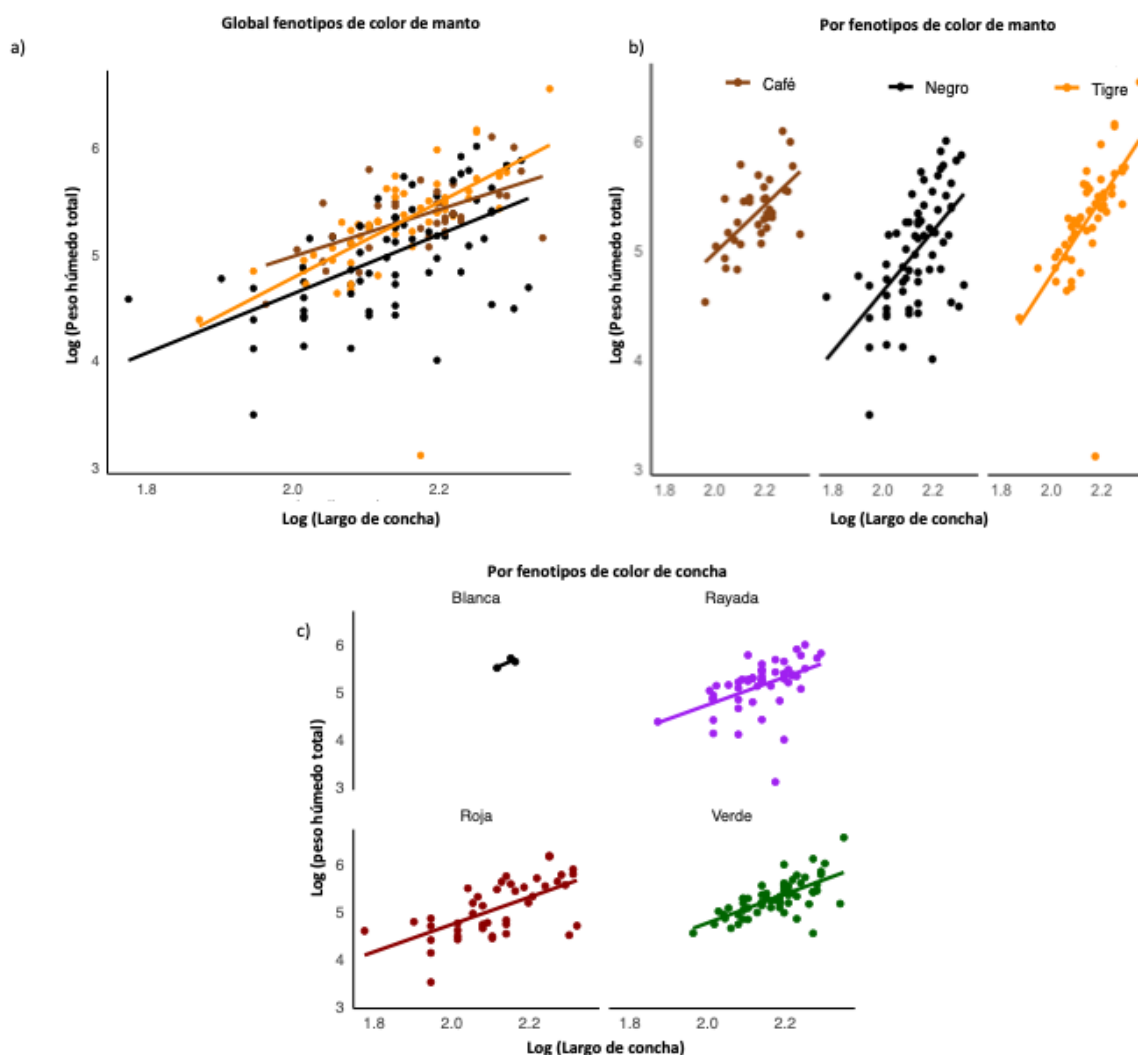


Figura 10. Relaciones alométricas de ejemplares de *M. crenulata* entre el peso húmedo total y el largo de concha. a) global, b) agrupación por fenotipo de manto, c) agrupación por coloración de concha.

3.2 Secuenciación y análisis del genoma mitocondrial

3.2.1 Mitogenoma de *Megathura crenulata*

Se obtuvieron dos mitogenomas de *Megathura crenulata*, los cuales tuvieron una diferencia nucleotídica de un par de bases. El mitogenoma obtenido a partir de la muestra de PCA tuvo una longitud de 16,788 pb y el obtenido a partir de la muestra de PEU, una longitud de 16,787 pb. Ambos mitogenomas presentaron una molécula circular de doble cadena (Figura 11). El mitogenoma de *M. crenulata* tiene un contenido de 54,4% de AT y 45,5% de GC. Contiene los habituales 13 genes codificadores de proteínas (PCGs, por sus siglas en inglés), dos genes de ARN ribosomal (ARNr) y 22 genes de transferencia de ARN (tARNs) (Tabla 3). Sin embargo, cuatro de estos tARNs (*tARN-Pro*, *tARN-SerI*, *tARN-Arg* y *tARN-Asn*) solo coincidieron con el servidor MITOS, pero no en el servidor web de tRNAScan, por lo tanto, estas secuencias fueron anotadas en la secuencia por similitud con los tARNs de las secuencias mitocondriales de *D. graeca* y *F. volcano*, generando sus posibles estructuras secundarias (Figura 12). Del total de genes, 31 estaban en la hebra positiva (+) y cinco genes *ND5*, *ND4*, *ND4-L* y dos ARN de transferencia (*tARN-His* y *tARN-SerII*), estaban codificados en la hebra negativa (-) (Tabla 3).

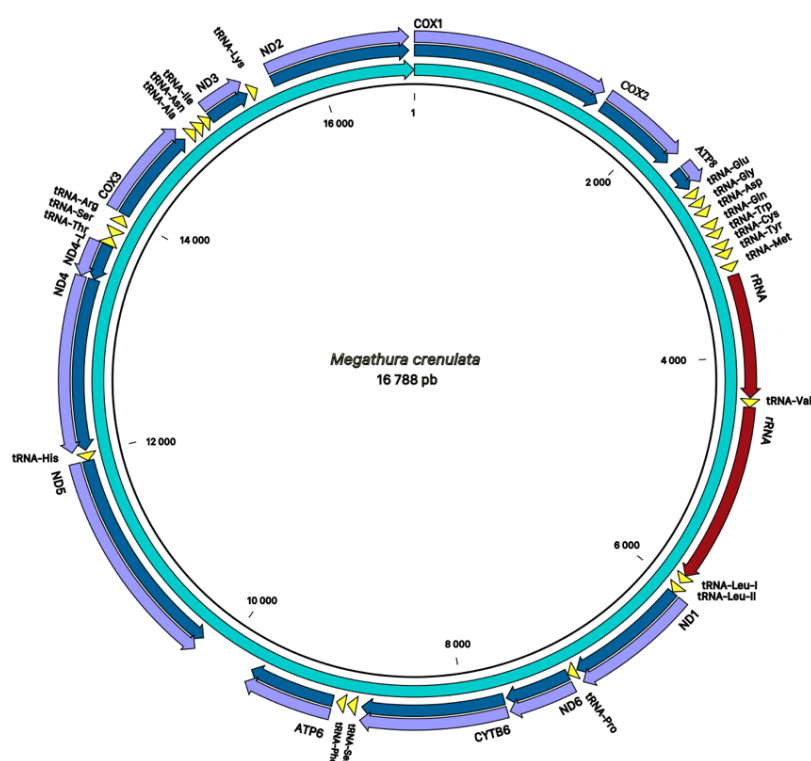


Figura 11. Mapa del mitogenoma de *Megathura crenulata*. Las flechas indican la dirección de la transcripción. Las PCGs están en púrpura, el ARN ribosomal en rojo, los ARN de transferencia en amarillo y la fuente en azul.

Tabla 3. Posición, longitud y dirección de la hebra (+/-) del mitogenoma de *Megathura crenulata*, con codones de iniciación y terminación.

Gen	Inicio	Termino	Tamaño (pb)	Cadena	Codón de inicio	Codón de termino/Anticodón	itg
<i>COI</i>	1	1533	1533	+	ATG	TAA	46
<i>COII</i>	1580	2273	694	+	ATG	TAA	93
<i>ATP8</i>	2367	2549	183	+	ATG	TAA	27
<i>tARN-Glu</i>	2577	2643	67	+		TTC	17
<i>tARN-Gly</i>	2661	2729	69	+		TCC	16
<i>tARN-Asp</i>	2746	2814	69	+		GTC	45
<i>tARN-Gln</i>	2860	2932	73	+		TTG	13
<i>tARN-Trp</i>	2946	3013	68	+		TCA	35
<i>tARN-Cys</i>	3049	3117	69	+		GCA	5
<i>tARN-Tyr</i>	3123	3192	70	+		GTA	41
<i>tARN-Met</i>	3234	3300	67	+		CAT	30
<i>rARN</i>	3331	4339	1009	+			7
<i>tARN-Val</i>	4347	4415	69	+		TAC	0
<i>rARN</i>	4416	5890	1475	+			0
<i>tARN-LeuI</i>	5891	5960	70	+		TAG	24
<i>tARN-LeuII</i>	5985	6053	69	+		TAA	3
<i>ND1</i>	6057	7049	993	+	ATG	TAA	11
<i>tARN-Pro</i>	7061	7128	68	+			2
<i>ND6</i>	7131	7655	525	+	ATG	TAG	20
<i>CYTB</i>	7676	8815	1140	+	ATG	TAG	42
<i>tARN-SerI</i>	8858	8863	6	+			86
<i>tARN-Phe</i>	8950	9018	69	+		GAA	31
<i>ATP6</i>	9050	9745	696	+	ATG	TAA	46
<i>ND5</i>	10207	11937	1731	-	ATG	TAA	0
<i>tARN-His</i>	11938	12004	67	-		GTG	19
<i>ND4</i>	12024	13421	1398	-	ATA	TAA	1
<i>ND4-L</i>	13423	13719	297	-	ATG	TAA	6
<i>tARN-Thr</i>	13726	13794	69	+		TGT	5
<i>tARNSer-II</i>	13800	13867	68	-		TGA	50
<i>tARN-Arg</i>	13918	13988	71	+			14
<i>COIII</i>	14003	14782	780	+	ATG	TAA	45
<i>tARN-Ala</i>	14828	14895	68	+		TGC	6
<i>tARN-Asn</i>	14902	14975	74	+			2
<i>tARN-Ile</i>	14978	15045	68	+		GAT	1
<i>ND3</i>	15047	15400	354	+	ATG	TAG	23
<i>tARN-Lys</i>	15424	15491	68	+		TTT	13
<i>ND2</i>	15622	16746	1125	+	ATG	TAA	0

*Se utilizan abreviaturas estándar de PCG. Se enumeran abreviaturas de tres letras para los genes de *tARN*. Se muestra el número de nucleótidos intergénicos (itg). Codón de terminación para PCGs y anticodón para *tARN*s.

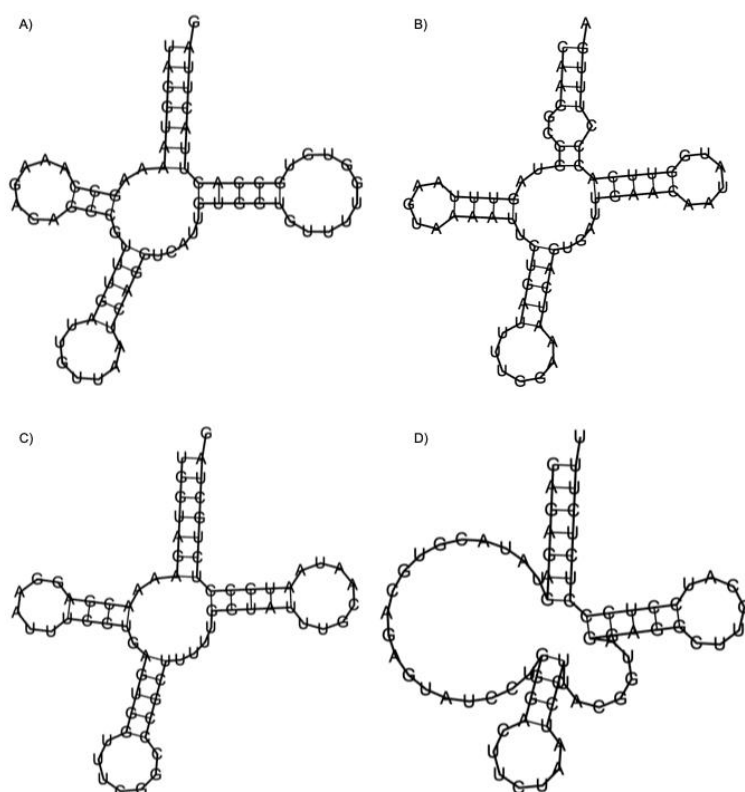


Figura 12. Estructuras secundarias de cuatro *tARNs*: A) Prolina, B) Serina, C) Arginina y D) Asparagina.

En general, las *PCGs* constituyen el 63.7%, los *tARNs* comprenden el 14.7% y los genes ribosómicos representan solo el 9.5% del mitogenoma de *M. crenulata*. El codón de inicio predominante en las *PCGs* fue ATG, excepto en el gen *ND5*, que utiliza ATA. Por el contrario, el codón de terminación predominantemente fue TAA, a excepción de los genes *ND6*, *CYTB* y *ND3* que son TAG. Además, el mitogenoma abarca 33 regiones intergénicas, cubriendo en total 1,357 pb (Tabla 3).

3.2.2 Análisis filogenético con marcadores mitocondriales

El análisis filogenético utilizó el mitogenoma completo de *M. crenulata* junto con otras siete especies de gasterópodos marinos, incluyendo dos de la familia Fissurellidae, cuatro de la familia Haliotidae y uno de la familia Lepetodrilidae (Tabla 2). Este análisis reveló que *M. crenulata* se agrupa en el mismo clado que las especies de la familia Fissurellidae *F. volcano* y *D. Graeca* (Figura 13A). Del mismo modo, *L. schrolli* y cuatro haliótidos (*H. rubra*, *H. rufescens*, *H. iris* y *H. discus hannai*) forman un grupo distinto. Además, la topología del árbol filogenético se mantiene consistente cuando se consideran solo las 13 *PCGs* de las especies evaluadas, que exhiben longitudes similares en todas las especies (Figura 13C).

Además, se secuenció otra muestra de *M. crenulata* para comparar el mitogenoma completo entre diferentes sitios de la misma especie, CAL y PCA, sin embargo, no se logró obtener el mitogenoma completo de la muestra de CAL, solo partes de este. A partir de este genoma parcial se identificaron tres genes completos: *COIII*, *ND1* y *ATP6*. Por lo tanto, las secuencias de estos tres genes se extrajeron y así como los correspondientes los mitogenomas reportados en este estudio para las muestras de PCA y PEU. Además de incluir estos mismos genes de otras siete especies de gasterópodos para analizar sus relaciones filogenéticas. Asimismo, los dos especímenes de *M. crenulata* (CAL y PCA) se agruparon al mismo nivel de Fissurellidae (Figura 13B). Sin embargo, la longitud de la rama resultante fue ligeramente diferente entre el genoma completo, las 13 *PCGs* y para los tres genes concatenados. Sin embargo, considerando el reordenamiento de los genes, *M. crenulata* y *D. graeca* se identificó que comparten los mismos genes en el mismo orden, a diferencia de *F. volcano*, donde este genoma reporta un menor número de ARNt y diferentes reordenamientos (Figura 14).

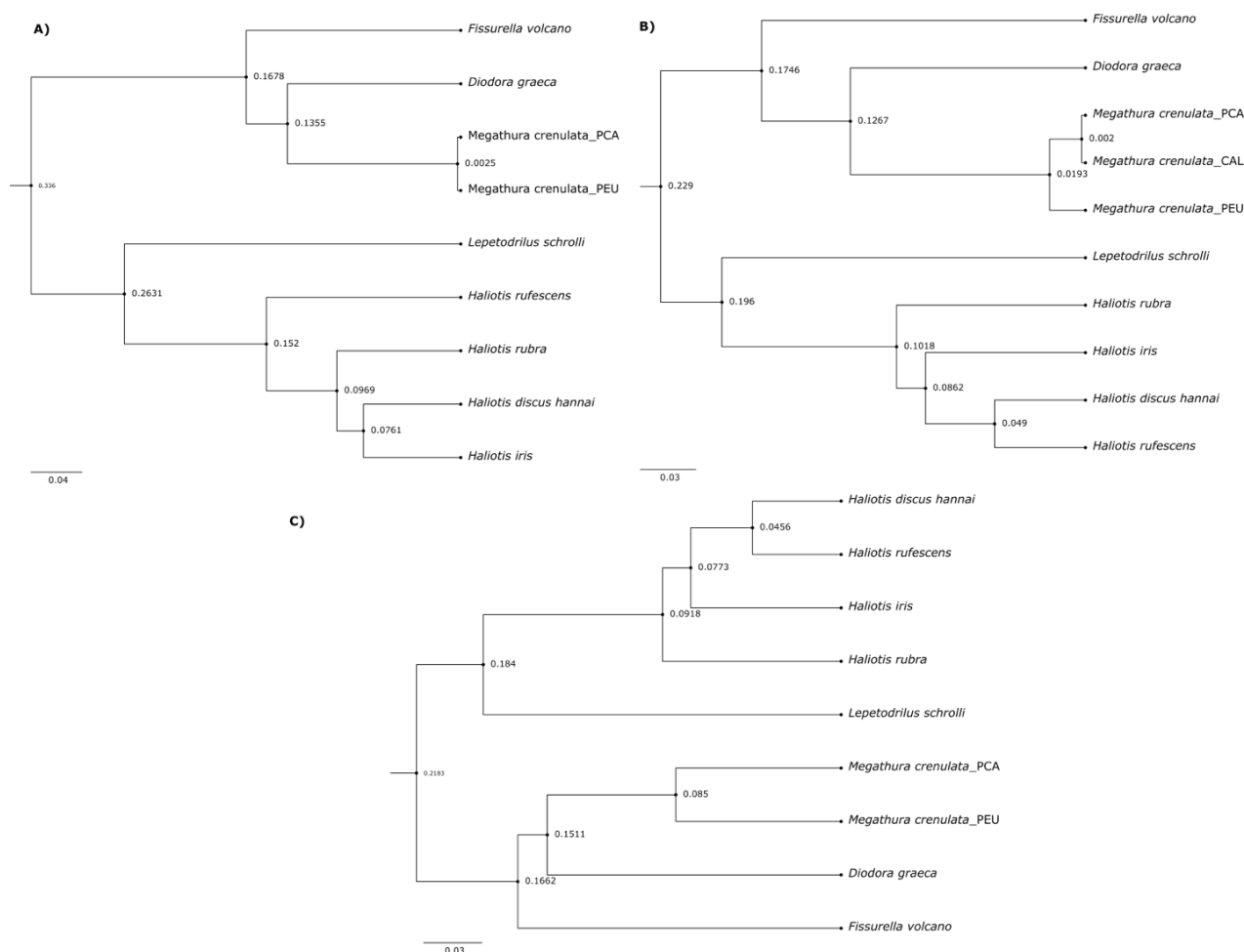


Figura 13. Árbol de relaciones filogenéticas entre ocho especies de gasterópodos. A) Análisis del mitogenoma completo. B) Análisis con tres genes *ATP6*, *COIII* y *ND1*, C) Análisis con 13 *PCGs* de las ocho especies de gasterópodos.

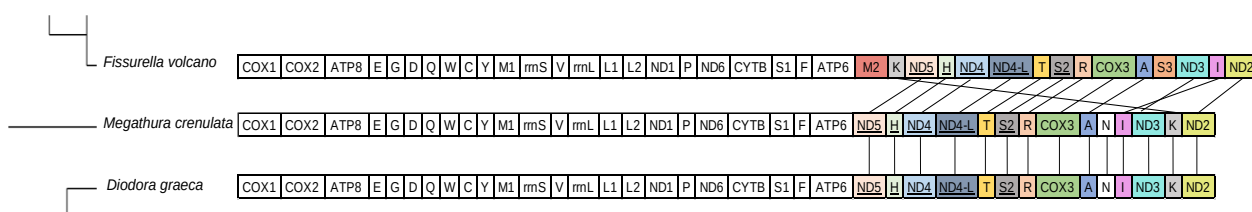


Figura 14. Comparación de la disposición de genes en el genoma mitocondrial de *Fissurella volcano*, *Megathura crenulata* y *Diodora graeca* en base a las secuencias publicadas, Tabla 2, indica los códigos de acceso a GenBank. Los genes en diferentes disposiciones se resaltan en color.

3.2.3 Diversidad y estructura genética a partir de los genes *16S ARNr* y *COI*

Se realizó el análisis genético utilizando el fragmento concatenado de *r16S-COI*, que tenía una longitud de 1,153 pb. Las medias globales de diversidad haplotípica y nucleotídica fueron altas ($h = 0.915$ y $\pi = 0.00288$; Tabla 4). Todas las localidades presentaron una alta diversidad haplotípica ($h > 0.5$). Sin embargo, las localidades de BAS ($h = 0.893$) e IGP ($h = 0.524$) presentaron valores menos al resto. Además, la diversidad de nucleótidos por localidad fue similar entre sí, los valores oscilaron entre 0.002 y 0.003, excepto para IGP, que presentó valores bajos de diversidad nucleotídica (0.0005, Tabla 4).

La mayoría de las localidades presentaron más de diez haplotipos, solo BAS e IGP presentaron el menor número de haplotipos, seis y tres, respectivamente (Tabla 4). El haplotipo 7 (H7) fue el haplotipo más común entre las localidades, seguido por el haplotipo 1 (H1) que se encontró en seis de las ocho localidades evaluadas (CAL, ENS, SQT, ISJ, PCA y PEU); el resto de los haplotipos se distribuyeron entre todas las localidades (Figura 17). Por su parte, Isla Guadalupe (IGP) presentó la menor diversidad genética en cuanto a diversidad haplotípica y nucleotídica, y número de haplotipos.

Tabla 4. Diversidad genética de los genes concatenados *r16S-COI* de *Megathura crenulata* en ocho localidades a lo largo de su distribución geográfica.

Localidad	<i>n</i>	<i>H</i>	<i>S</i>	<i>h</i> ± <i>SD</i>	<i>π</i> ± <i>SD</i>
CAL	19	10	13	0.906 ± 0.045	0.0027 ± 0.0002
ENS	25	13	24	0.903 ± 0.038	0.0028 ± 0.0005
SQT	16	11	12	0.925 ± 0.050	0.0028 ± 0.0004
ISJ	14	11	14	0.956 ± 0.045	0.0030 ± 0.0004
PCA	15	10	18	0.924 ± 0.053	0.0033 ± 0.0005
PEU	21	13	16	0.914 ± 0.049	0.0027 ± 0.0003
BAS	8	6	10	0.893 ± 0.111	0.0027 ± 0.0006
IGP	7	3	2	0.524 ± 0.209	0.0005 ± 0.0002
Global	125	46	48	0.915 ± 0.015	0.0028 ± 0.0001

n = número de muestras, H = número de haplotipos por localidad, S = número de sitios de segregación, h = diversidad haplotípica, π = diversidad de nucleótidos y SD = desviación estándar.

Los valores de φ_{ST} por pares fueron de -0.001 a 0.356, y la mayoría de las comparaciones obtuvieron valores cercanos a cero. Sin embargo, las comparaciones entre BAS con respecto a SQT, PCA e IGP indican diferencias significativas (Tabla 5). Por otro lado, el análisis global de varianza indica una variación entre poblaciones de 4.09% y un valor de coeficiente de fijación global de ($\varphi_{ST} = -0.0478 \pm 0.011$).

Tabla 5. Matriz de comparación entre los valores de φ_{ST} de entre ocho localidades de *Megathura crenulata* φ_{ST} global: 0.0478*.

	CAL	ENS	SQT	ISJ	PCA	PEU	BAS	IGP
CAL		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ENS	0.0099		ns	ns	ns	ns	ns	ns
SQT	-0.0015	0.1133		ns	ns	ns	*	ns
ISJ	-0.0350	0.0244	-0.0094		ns	ns	ns	ns
PCA	-0.0242	0.0004	0.0364	-0.0077		ns	*	ns
PEU	-0.0151	-0.0158	0.0738	-0.0043	0.0041		ns	ns
BAS	0.1345	0.0403	0.2351	0.1017	0.1346	0.0456		*
IGP	0.1136	0.0790	0.2051	0.1246	0.0238	0.1428	0.3562	

*Los valores por debajo de la diagonal indicativa (valores θ_{ST}) y por encima de la diagonal indican significación estadística. Valor de $\sigma = 0.006$ con corrección de Bonferroni. ns = no significativo y * significativo.

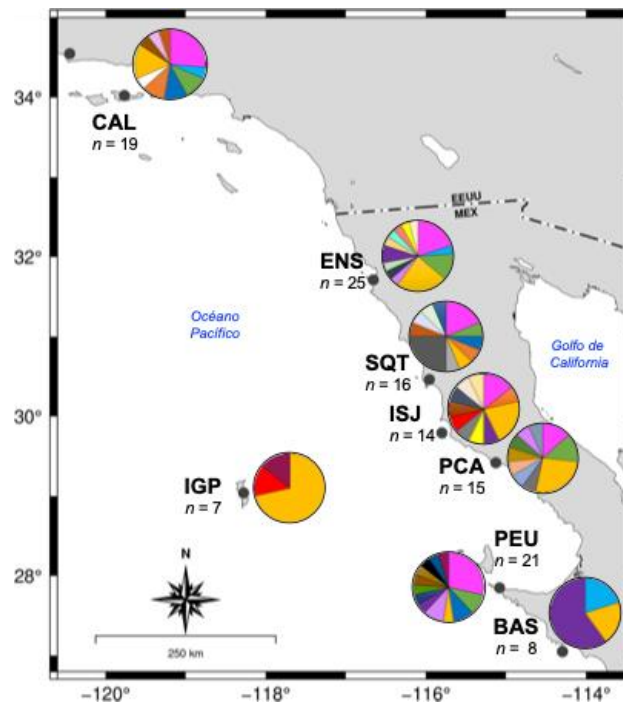


Figura 15. Lugares de muestreo de *Megathura crenulata*. California (CAL), Ensenada (ENS), San Quintín (SQT), Isla San Jerónimo (ISJ), Puerto Canoas (PCA), Punta Eugenia (PUE), Bahía Asunción (BAS) e Isla Guadalupe. Los diagramas circulares indican la diversidad de haplotipos.

3.2.4 Historia demográfica

Los análisis globales de neutralidad de *Tajima D* (-1.943) y *Fs de Fu's* (-33.240) fueron negativos, solo los valores de ENS e IGP fueron estadísticamente significativos para *Tajima D*; así como SQT, ISJ y PUE para los valores de *Fs de Fu's* indicaron diferencias significativas (Tabla 6). En cuanto al análisis de R_2 , el valor medio obtenido fue de 0.033 (Tabla 6). Teniendo en cuenta los genes mitocondriales concatenados *r16s-COI* entre las ocho localizaciones, la distribución del desajuste fue unimodal (Figura 16). En cuanto al análisis R_2 , el valor medio obtenido fue de 0.033 (Tabla 6).

Tabla 6. Prueba de neutralidad; *Tajima D* (D_T) y *Fs de Fu*. Los valores estadísticos fueron calculados para secuencias de los genes mitocondriales concatenados *r16s-COI* de *Megathura crenulata*.

Localidad	D_T	F_s	R_2
CAL	-0.589 ns	-2.792 ns	0.105 ns
ENS	-1.778 *	-4.662 ns	0.078 ns
SQT	-0.343 ns	-4.763 *	0.121 ns
ISJ	-0.774 ns	-5.444 *	0.092 *
PCA	-1.252 ns	-3.114 ns	0.081 *
PEU	-1.053 ns	-6.002 *	0.081 *
BAS	-0.916 ns	-1.500 ns	0.126 ns
IGP	-1.237 *	-0.922 ns	0.225 ns
Global	-1.943 *	-33.240 *	0.033 *

ns = no significativo ($p > 0,05$), * = Significativo ($p < 0.05$).

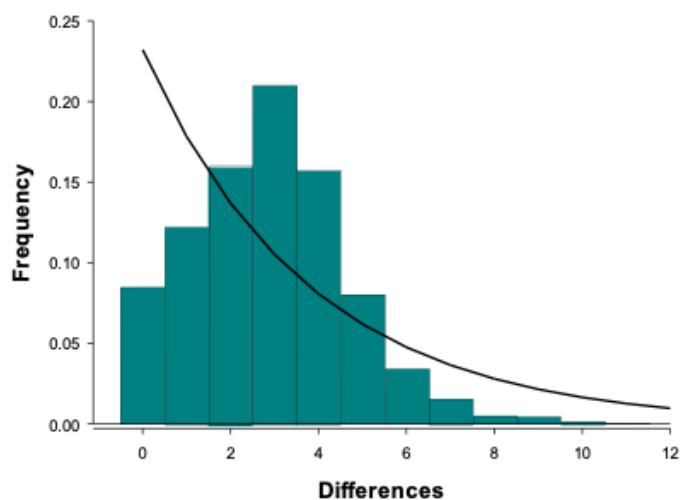


Figura 16. Distribución de desajustes (*mitmatch*) para los genes mitocondriales concatenados *r16s-COI* de *Megathura crenulata*. Las barras representan los valores observados y la línea representa los valores esperados.

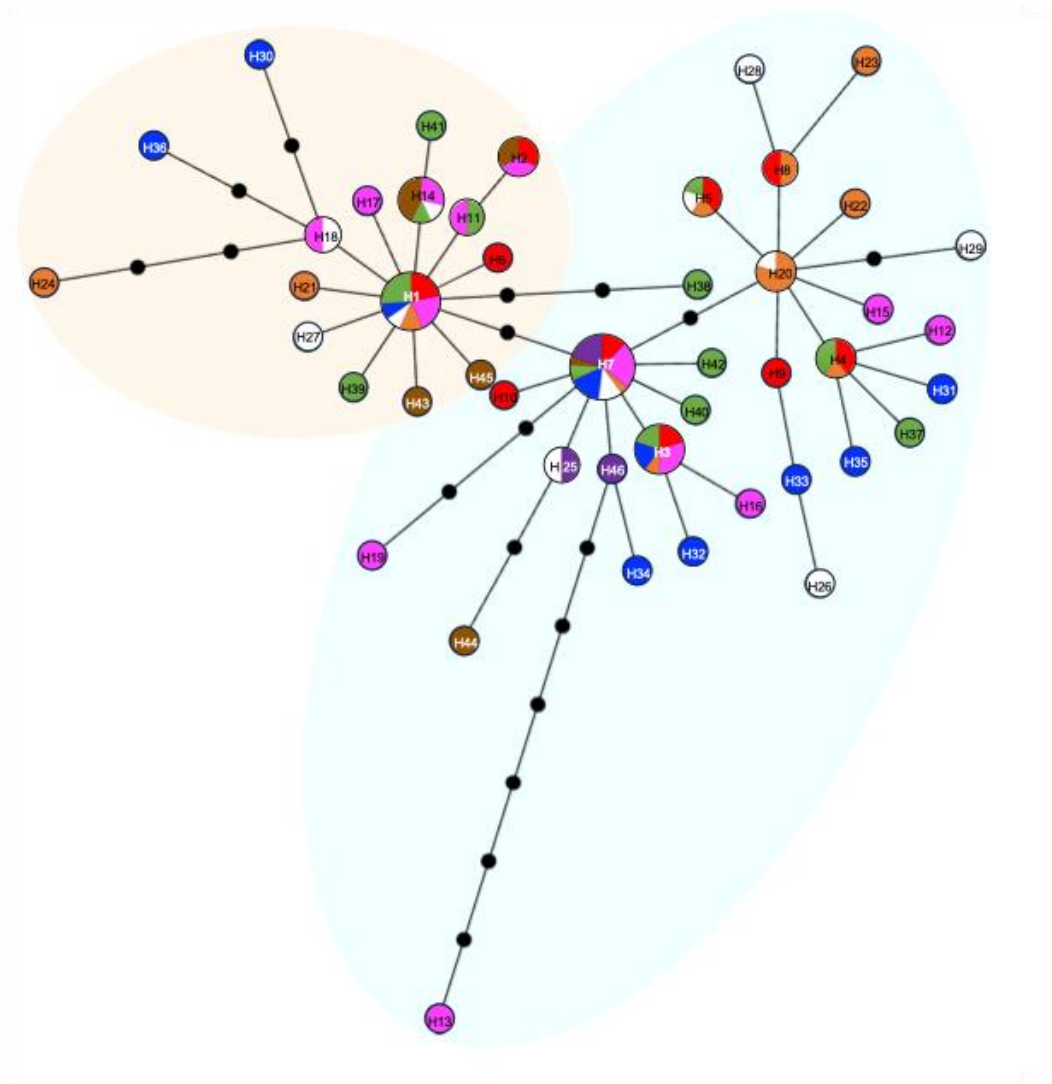


Figura 17. Red de expansión mínima, ilustra haplotipos de ocho localidades de *Megathura crenulata*. Los tamaños de los círculos representan las frecuencias de haplotipos, mientras que los colores indican la localidad: California (CAL-rojo), Ensenada (ENS-rosa), San Quintín (SQT-naranja), Isla San Jerónimo (ISJ-blanco), Puerto Canoas (PCA-azul), Punta Eugenia (PEU-verde), Bahía Asunción (BAS-marrón) e Isla Guadalupe (IGP-morado).

La red de expansión mínima de haplotipos, realizada para las ocho localidades, mostró dos haplogrupos distintos, uno con 16 haplotipos y el otro con 30 haplotipos, respectivamente (Figura 19). Sin embargo, se observó una distribución heterogénea y no se determinó un patrón espacial. Un haplotipo general (H7) estuvo presente en mayor abundancia en todas las localidades y varios haplotipos de baja frecuencia en forma de estrella, lo que caracterizan a una expansión poblacional. Debido a la alta frecuencia del haplotipo 7, es probable que este sea el haplotipo ancestral. Sin embargo, solo diez haplotipos aparte del H7 son compartidos entre localidades, como los haplotipos H1 (con mayor abundancia) y H3, que son compartidos entre casi todas las localidades excepto BAS e IGP. El resto de los haplotipos se distribuyen solo entre tres o cuatro localidades (Figura 17). El diagrama de skyline, indica que el crecimiento

poblacional de *M. crenulata* inicio hace aproximadamente 80,000 años (Figura 18), alcanzando una fase estacionaria hace 10,000 años (Figura 19).

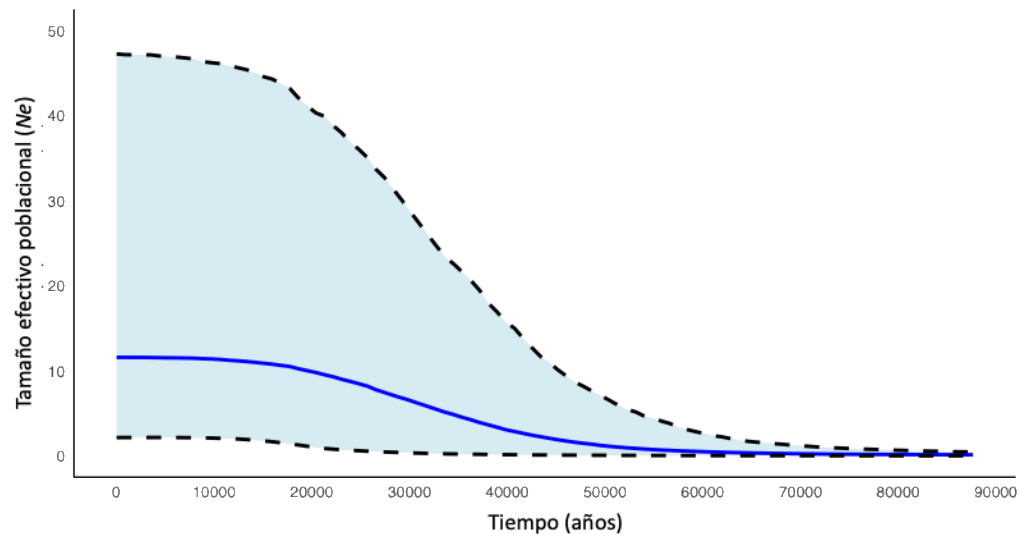


Figura 18. Diagrama de Skyline basado en la matriz colapsada de fragmentos concatenados de los genes *r16s-COI* de *Megathura crenulata*. En el eje x, indica el tiempo en años y comienza en cero, con respecto a la actualidad. La línea azul intenso representan el intervalo de confianza al 95 %.

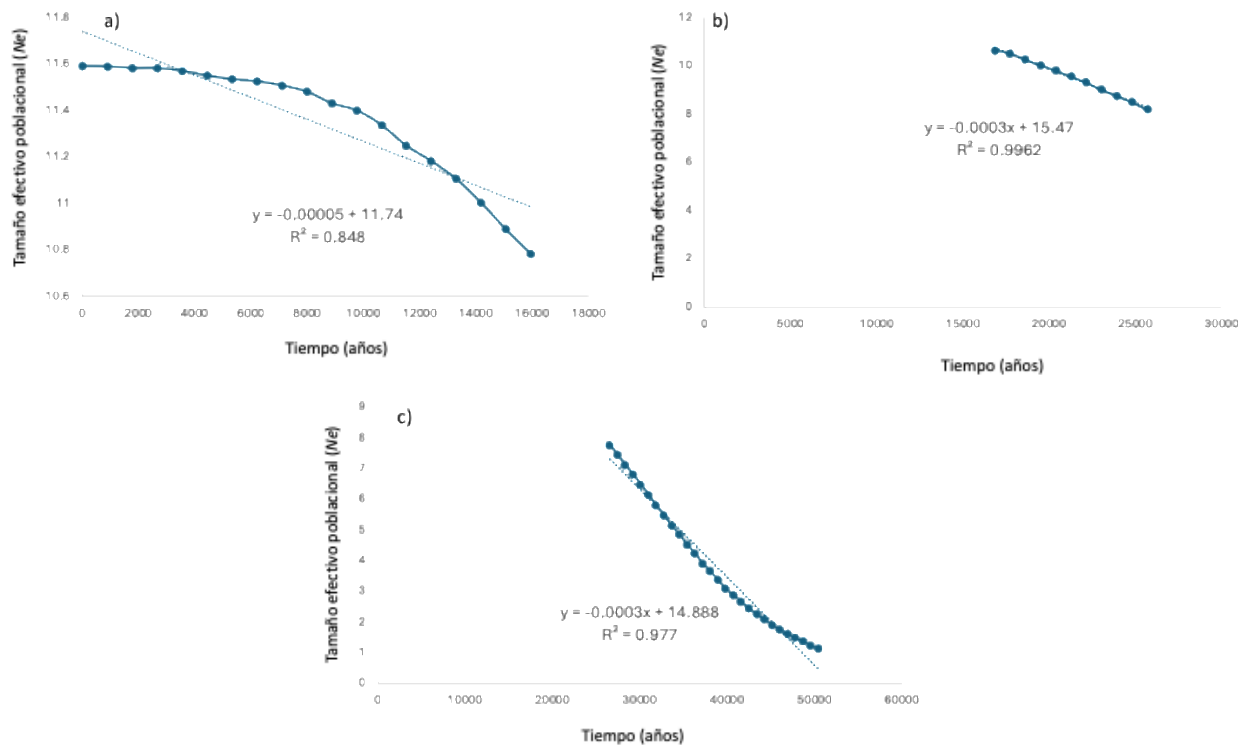


Figura 19. Análisis de regresión lineal de los tiempos de crecimiento poblacional de *Megathura crenulata*. a) Análisis de cero a 18,000 años, b) Análisis de 18,000 a 25,000 años, c) Análisis de 25,000 a 50,000 años.

3.3 Genómica poblacional asociada a marcadores SNPs

3.3.1 Análisis bioinformático de secuenciación de librerías ddRadSeq

En total se obtuvieron 233,708,470 de lecturas crudas a partir de 144 individuos de *M. crenulata*. A partir de este total, solamente se mantuvieron individuos que tuvieron más de >750,000 lecturas. Por lo tanto, 43 individuos fueron descartados de la matriz inicial, además de eliminar tres réplicas técnicas. A partir del módulo *de novo* y *populations* se identificaron 1,854 SNPs en 97 individuos. Con esta base de datos, se llevó a cabo el proceso de filtración de datos faltantes, donde 13 individuos con más de 20% de datos faltantes fueron descartados. Por último, se eliminaron ocho individuos que mostraron señal de contaminación. Por lo tanto, la matriz final de individuos fue de 76 (tabla 7).

Tabla 7. Número de individuos secuenciados en librerías ddRAD-Seq y número individuos después del proceso de filtración (datos faltantes y *relatedness phi*) para el análisis genómico poblacional de *Megathura crenulata*.

No.	Localidad	Muestras secuenciadas	Muestras con >750,000 lecturas retenidas	Réplicas técnicas	Individuos matriz inicial	Individuos con < 20% datos faltantes	Individuos con <i>phi</i> > 0.25
1	CAL	20	14		14	14	12
2	ENS	23	19	1	18	17	15
3	SQT	23	18		18	15	14
4	ISJ	15	9		9	7	7
5	PCA	20	11		11	8	6
6	PEU	23	16		16	13	13
7	BAS	9	4		4	4	4
8	IGP	11	8	1	7	6	5
	Total	144	99	2	97	84	76

3.3.2 Detección de marcadores con potencial adaptativo (*outliers*)

No fue posible la detección de marcadores con potencial adaptativo comunes entre los programas PCAdapt, OutFlank y Bayescan en la matriz de 76 individuos con 1,112 marcadores SNPs.

3.3.3 Diversidad genómica asociada a marcadores SNPs

Todos los SNPs en la matriz cumplieron con el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW), de acuerdo con el análisis realizado. Asimismo, a partir de esta matriz, se evaluaron los parámetros de diversidad genómica. La riqueza alélica global fue de 1.358 ± 0.347 , con valores muy similares entre todas las localidades evaluadas (Tabla 8). De igual forma, la heterocigocidad observada (H_o global = 0.280 ± 0.274) y esperada (H_e global = 0.242 ± 0.184) mostraron patrones consistentes entre las ocho localidades (Tabla 8).

El coeficiente de endogamia (F_{IS}) presentó un valor global de -0.08 ± 0.36 . Considerando, que el intervalo de este parámetro varía de menos uno (-1) a uno (1), donde valores cercanos a -1 indican exogamia, valores cercanos o iguales a cero indican reproducción al azar y valores cercanos a 1 reflejan endogamia. El coeficiente global de las ocho localidades es estadísticamente menor a cero ($p = 2.00^{-17}$), al igual que todas las localidades. Asimismo, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis indica que los promedios entre todas las localidades difieren significativamente entre sí ($p = 0.000001$) y solo IGP es estadísticamente diferente de CAL, ENS, SQT y PUE (Figura 20).

Tabla 8. Diversidad genómica de lapa gigante, *Megathura crenulata*, evaluada en ocho localidades. Número de muestras por localidad (n), riqueza alélica (Ar), heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e) y coeficiente de endogamia (F_{IS}). Asterisco (*) indica significancia estadística a partir de la prueba *t-Student*.

Localidad	Etiqueta	n	Ar	H_o	H_e	F_{IS}
California	CAL	12	1.38 ± 0.33	0.28 ± 0.26	0.24 ± 0.17	$-0.08 \pm 0.36^*$
Ensenada	ENS	15	1.38 ± 0.34	0.27 ± 0.25	0.24 ± 0.17	$-0.09 \pm 0.33^*$
San Quintín	SQT	14	1.38 ± 0.33	0.28 ± 0.26	0.24 ± 0.17	$-0.08 \pm 0.35^*$
Isla San Jerónimo	ISJ	7	1.37 ± 0.35	0.28 ± 0.28	0.24 ± 0.19	$-0.11 \pm 0.39^*$
Puerto Canoas	PCA	6	1.37 ± 0.34	0.28 ± 0.27	0.24 ± 0.18	$-0.11 \pm 0.40^*$
Punta Eugenia	PEU	13	1.38 ± 0.34	0.27 ± 0.26	0.24 ± 0.17	$-0.09 \pm 0.35^*$
Bahía Asunción	BAS	4	1.35 ± 0.36	0.26 ± 0.29	0.24 ± 0.21	$-0.12 \pm 0.44^*$
Isla Guadalupe	IGP	5	1.35 ± 0.36	0.27 ± 0.29	0.22 ± 0.20	$-0.14 \pm 0.45^*$
Total/Global		76	1.35 ± 0.34	0.28 ± 0.27	0.24 ± 0.18	$-0.08 \pm 0.36^*$

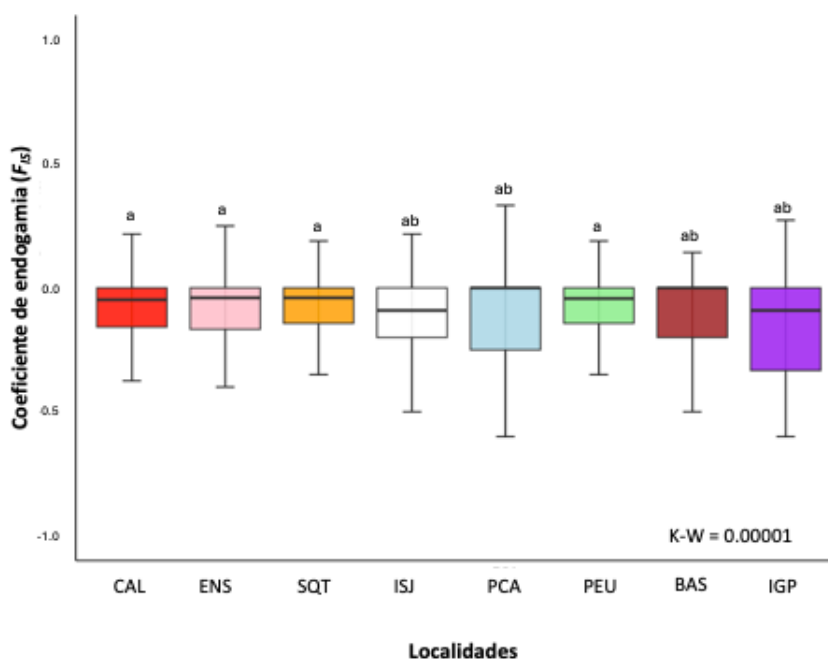


Figura 20. Coeficiente de endogamia (F_{IS}) promedio para cada localidad evaluada dentro de la distribución geográfica de *Megathura crenulata*. Los datos se representan mediante gráficos de cajas y bigotes, donde la línea central indica la mediana, los bordes de la caja corresponden al rango intercuartílico (Q1–Q3) y los bigotes muestran la dispersión de los datos. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (KS) para evaluar diferencias entre localidades. Letras distintas indican diferencias significativas entre grupos según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

3.3.4 Diferenciación genómica y estructura poblacional asociada a marcadores SNPs

El coeficiente de fijación (F_{ST}) dentro de las ocho localidades analizadas presentó una variación de 0 a 0.048. Las comparaciones de localidades que mostraron valores más altos fueron las comparadas con IGP. Además, los valores de probabilidad significativos también estuvieron asociados a esta localidad ($p > 0.0017$), excepto la comparación de IGP con BAS y PCA. Por otra parte, PEU mostró diferencias significativas con respecto a ENS y SQT ($p > 0.0017$) (Tabla 10).

El análisis discriminante de componentes principales (DAPC) retuvo cinco componentes tras ser evaluado con la función *xvaldapc* y el BIC indicó existencia de dos grupos genéticos (Figura 21c). Un grupo formado solamente por IGP y el segundo por el resto de las localidades (CAL, ENS, SQT, ISJ, PCA, PEU y BAS) (Figura 21a). Considerando que la presencia de IGP podría enmascarar la variación dentro del grupo 2; se realizó una prueba de DAPC sin esta localidad; sin embargo, tampoco hubo diferencias internas entre las localidades del grupo 2 (Anexo B).

Por otra parte, el análisis bayesiano de grupos genéticos realizado en las ocho localidades de *Megathura crenulata*, los resultados de la prueba de Evanno (delta K) y el logaritmo de K indican tres grupos genéticos. Este análisis coincide con los valores de F_{ST} y el DACP, en donde se ubica a IGP como un grupo distinto del resto (Figura 22). Sin embargo, el análisis bayesiano detecta a PCA y PEU como un grupo diferente al resto de las localidades (CAL, ENS, SQT, ISJ y BAS).

Tabla 9. Coeficiente de fijación (F_{ST}) de la matriz de 1,112 SNPs neutrales evaluados en ocho localidades dentro de la distribución geográfica de *Megathura crenulata*. Debajo de la línea diagonal se encuentran los valores de F_{ST} para cada comparación y sobre la línea diagonal se indican los valores de probabilidad. Valores resaltados son estadísticamente significativos con respecto a la corrección de Bonferroni: 0.0017.

$F_{ST}/p\text{-valor}$	CAL	ENS	SQT	ISJ	PCA	PEU	BAS	IGP
CAL	--	0.322	0.282	0.051	0.012	0.002	0.463	0.000
ENS	0.001	--	0.019	0.009	0.019	0.000	0.092	0.000
SQT	0.001	0.003	--	0.158	0.013	0.001	0.136	0.000
ISJ	0.004	0.007	0.003	--	0.011	0.003	0.076	0.001
PCA	0.012	0.009	0.008	0.013	--	0.955	0.334	0.006
PEU	0.012	0.014	0.009	0.014	0.005	--	0.349	0.000
BAS	0.000	0.005	0.004	0.008	0.002	0.002	--	0.009
IGP	0.047	0.048	0.051	0.055	0.052	0.055	0.061	--

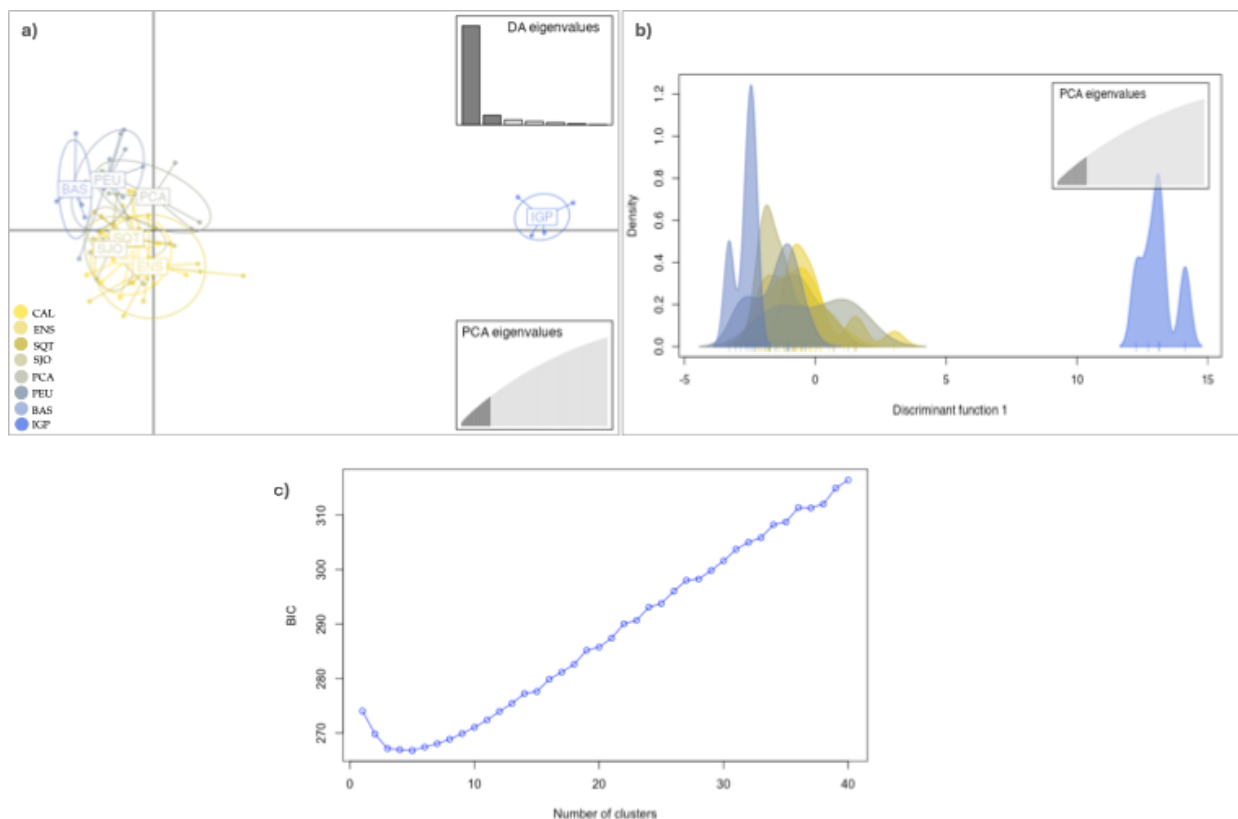


Figura 21. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) de la matriz neutral de 1,112 SNPs de *Megathura crenulata*. a) DAPC de ocho localidades; b) Función Discriminante 1: Separación de Grupos del DAPC de ocho localidades; c) Criterio de Información Bayesiano (BIC) indicativo del número óptimo de agrupaciones.

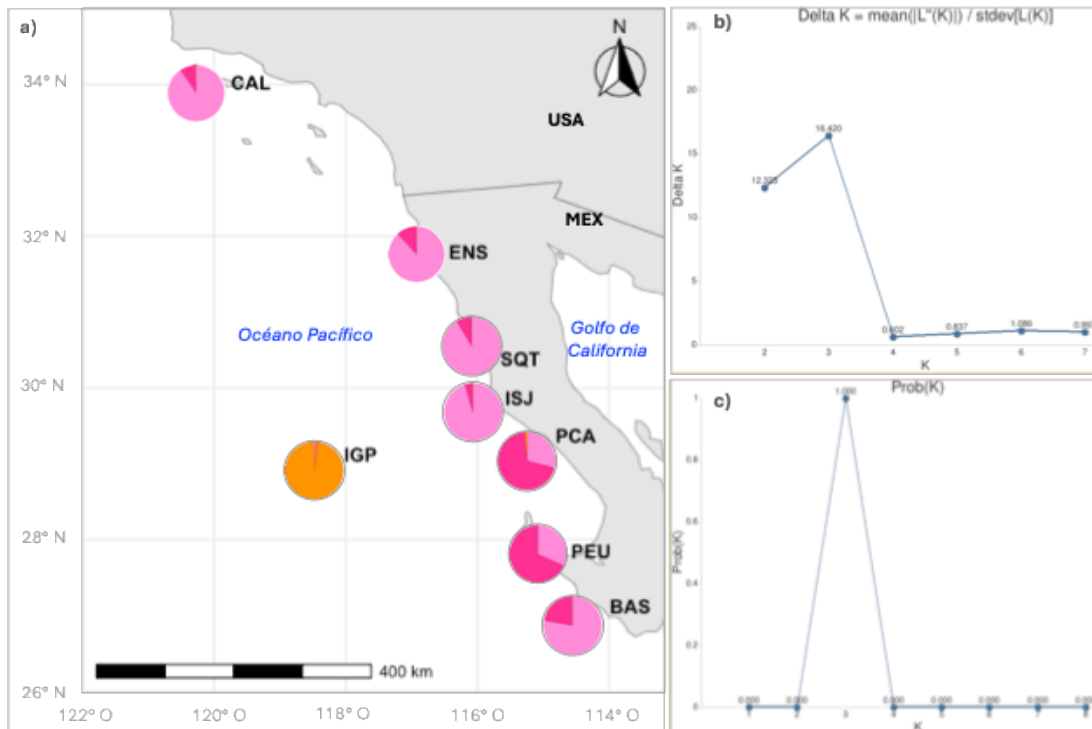


Figura 22. Determinación del número óptimo de clusters (K) a partir del análisis de STRUCTURE. a) Colores indican proporción de pertenencia por localidad a cada uno de los tres componentes genómicos detectados. b) Evaluación de ΔK de acuerdo con el método de Evanno et al. (2005), con el valor óptimo de K identificado en el pico máximo de ΔK . c) Variación de $L(K)$ en función de K, donde $L(K)$ representa la probabilidad del modelo.

3.3.5 Conectividad genética entre localidades

El análisis de conectividad genética entre las ocho localidades de *Megathura crenulata* se llevó a cabo utilizando la base de datos neutral de 1,112 SNPs para evaluar patrones de aislamiento por distancia (IBD) y las tasas de migración entre localidades. Los resultados del IBD, indican que no hay una correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas ($r^2 = 0.194$; $p=0.130$) entre las localidades analizadas (Figura 23). Por otra parte, se detectaron altas tasas de conectividad genética bidireccional entre CAL y ENS, así como CAL y SQT, además de la combinación de ENS con SQT; todos estos con valores cercanos a 1. Asimismo, se identificó que IGP, es una localidad que tiene una baja conectividad con el resto, ya que mostró patrones de migración unidireccionales con menor fuerza (valores menores a 0.5) (Figura 24).

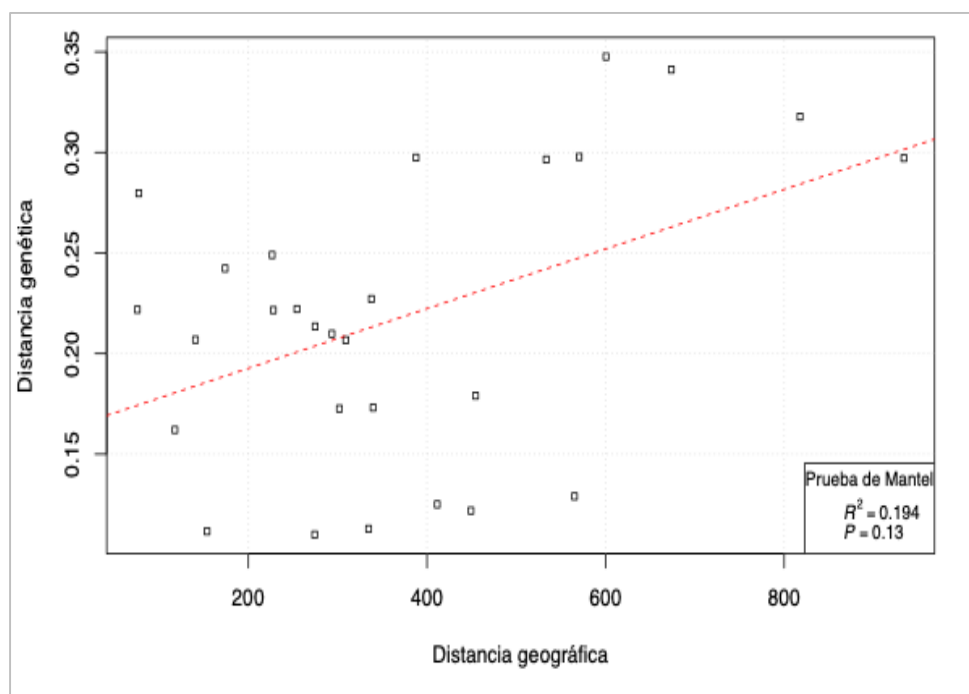


Figura 23. Evaluación del aislamiento por distancia (IBD) en *Megathura crenulata*: correlación entre distancias genéticas y geográficas a partir de la matriz de 1,112 SNPs neutrales obtenidos en ocho localidades dentro de la distribución geográfica de la especie.

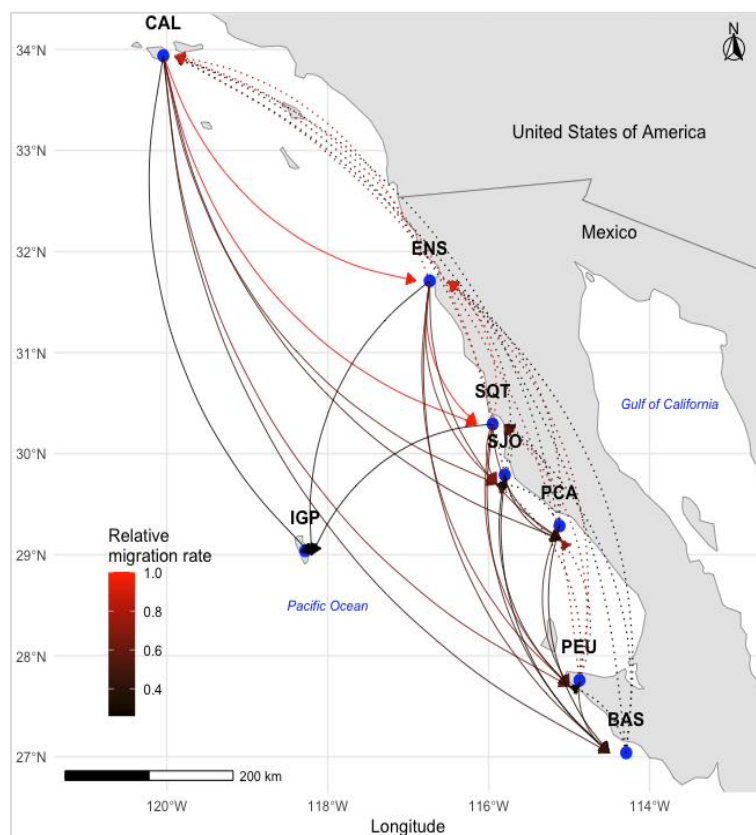


Figura 24. Red de migración bidireccional relativa de *Megathura crenulata* entre ocho localidades dentro de su distribución geográfica, obtenidas a partir de la matriz de 1,112 SNPs neutrales. Línea continua indica dirección de norte a sur y línea punteada indica dirección de sur a norte.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Diversidad de fenotipos de manto y coloración de concha de *Megathura crenulata*

La variación morfológica de *Megathura crenulata* en su entorno natural mostró diferencias entre todas las localidades analizadas, posiblemente influenciada por las condiciones ambientales variables. Estas variaciones están ligadas directamente a la plasticidad fenotípica de la especie, la cual es definida como la capacidad que tiene un genotipo de expresar diferentes fenotipos asociados a las condiciones ambientales (Holloway, 2002). Dichos factores favorecen la generación de variación fenotípica en términos de coloración, grosor y patrones diferenciales en concha o manto en moluscos. En otras especies de moluscos gasterópodos, los factores asociados a la plasticidad fenotípica son los relacionados a estrés térmico, disponibilidad de alimento, corrientes marinas, salinidad, presencia de depredadores e intensidad de oleaje o intensidad lumínica (Bandel, 2001; Blanco et al., 2014; Brown & Quinn, 1988; Sepúlveda et al., 2012).

Por ejemplo, en *Clithon oualaniensis* (Grüneberg, 1982) y *Neritina virginea* (Blanco et al., 2014) ha mostrado la presencia de plasticidad fenotípica en la coloración de la concha, así como estrías con diferentes patrones. Esto, es similar a lo observado en *M. crenulata*, la cual presentó cuatro diferentes variaciones de coloración en la concha. No obstante, en el caso de *C. oualaniensis* y *N. virginea*, se asoció la expresión fenotípica de la coloración de la concha se asoció a dos factores principales. Uno de estos fue la salinidad, ya que ambas especies cohabitan en ambientes marinos y dulceacuícolas. El segundo factor se asoció a la profundidad, ya que, en zonas someras con mayor incidencia de aves, los fenotipos de coloración eran uniformes en comparación con zonas profundas, además se encontraron fracturas en conchas en aguas someras (Blanco et al., 2014; Grüneberg, 1982).

Aunque las variantes fenotípicas están ligadas a factores externos, también hay otra fuente de variación, la cual es heredable e independiente de las condiciones ambientales (García & Winkler, 2012). Como lo observado en la especie *Argopecten purpuratus*, donde la variación de la coloración de la concha no depende de factores exógenos. En contraste con la coloración de la concha de la especie *Nodidicpecten subnodosus* que presenta un patrón contrario (Rojas-Sánchez, 2024).

Las diferentes especies de lapas presentan variaciones morfológicas en la forma y tamaño de la concha, la apertura del ápice y los patrones en su superficie. Estas características han permitido distinguir entre especies y poblaciones, como en *Fissurella pulchra* (Bretos & Chihuailaf, 1990) y *F. latimartiganata* (Olivares-Paz et al., 2011). Sin embargo, en *M. crenulata* estos patrones de diferenciación no fueron observados entre las localidades analizadas.

4.2 Genoma mitocondrial de *Megathura crenulata*

La longitud del mitogenoma observado en este estudio (16,788 pb) es comparable a la de otros genomas mitocondriales de animales (Boore, 1999) y al tamaño medio del mitogenoma en la clase Gastropoda (15,374 pb), basado en 450 mitogenomas completos reportados en GenBank (Ghiselli et al., 2021). Sin embargo, es ligeramente más pequeña que la de *F. volcano* (17,575 pb) y *D. graeca* (17,209 pb), dos especies estrechamente relacionadas dentro del grupo Fissurellidae (Simision Unpublished; Uribe-Arboleda 2016). De acuerdo con los mitogenomas animales, hay 37 genes presentes, incluidas dos subunidades de genes ribosómicos, 13 genes codificadores de proteínas (PCG) y 18 genes de ARN de transferencia (*tARN*).

En cuanto a los *tARN*, se observaron duplicaciones de *tARN-Serina* (I y II) y dos *tARN-Leucina* (I y II). Todas estas características fueron identificadas en la secuencia de *M. crenulata* y es similar a lo reportado en *D. graeca* (Uribe-Arboleda 2016). Asimismo, la duplicación de *tARN* ha sido asociada a procesos evolutivos y de adaptación de las especies (Boore, 1999; Robinson et al., 2016; Uribe-Arboleda, 2022). Este patrón de duplicación se ha detectado en diversas especies de gasterópodos marinos como los abulones *H. rubra* y *H. laevigata*; así como en las lapas *D. graeca* y *F. volcano* (Maynard, 2005; Robinson et al., 2016; Simision Unpublished; Uribe-Arboleda, 2016).

Dentro de la subclase Vetigastropoda, *Megathura crenulata* es la única especie del género *Megathura*. Esta subclase, se divide en cuatro superfamilias relacionadas con las lapas: Haliotoidea, Lepetelloidea, Lepetodiloidea y Fissurelloidea, a la cual pertenece *Megathura*. El análisis del mitogenoma completo y de las PCGs posiciona a *M. crenulata* en el mismo clado que sus taxones hermanos, *F. volcano* y *D. graeca*, ambos de la superfamilia Fissurelloidea. En contraste, las especies del género *Haliotis* forman un clado separado, mientras que *L. schrolli*, de la superfamilia Lepetelloidea, se considera un grupo externo. El conocimiento de genomas mitocondriales completos y reconstrucciones filogenéticas dentro del orden Lepetellida es aún limitado debido a su importante diversidad taxonómica. Sin embargo,

aproximadamente 30 especies de gasterópodos han sido secuenciadas y analizadas para determinar las relaciones filogenéticas. La disposición filogenética observada en este estudio se alinea con los hallazgos de otros autores, entre ellos Aguilera-Muñoz et al. (2009); Grande & Zardoya (2014); Uribe-Arboleda (2016); Uribe et al. (2022).

Los tres enfoques para analizar las relaciones filogenéticas de *M. crenulata*, utilizando el mitogenoma completo, las 13 *PCGs* y solo 3 *PCGs*, indican ligeras diferencias cuando se reduce la información genética (3 *PCGs*) y se considera la muestra de CAL. El árbol filogenético generado con 3 *PCGs*, indica que las muestras de CAL y PCA son genéticamente más cercanas y pueden estar relacionadas con las condiciones oceanográficas durante la temporada de desove de *M. crenulata* en estos sitios. De acuerdo con Armijo-de Vega (1993) *M. crenulata* desova de septiembre a octubre, justo en la temporada en que se forman remolinos anticiclónicos en Bahía Sebastián, Vizcaíno, Baja California (Buenrostro et al., 1995). Estos podrían fungir como barrera oceanográfica entre las localidades de PCA y PEU, lo que combinado con un corto período de dispersión larvaria impediría la distribución norte-sur de las larvas lecitotróficas (Ibragim et al., 1996). Este tipo de patrones se han observado en otras especies de gasterópodos como el abulón amarillo (*H. corrugata*), que ha presentado una diferenciación genética relacionada con este tipo de barreras oceanográficas (Río-Portilla & González-Avilés, 2001).

4.3 Análisis genómico poblacional de *Megathura crenulata*

En este estudio, se analizaron patrones de diversidad y estructura genética y poblacional de *Megathura crenulata* a lo largo de su distribución geográfica, utilizando dos tipos de marcadores moleculares: secuencias de los genes mitocondriales *16s rARN* y *COI*, así como marcadores SNPs. Ambos enfoques proporcionan una perspectiva complementaria sobre la historia evolutiva y la conectividad poblacional de la especie, permitiendo una interpretación integral de los procesos históricos que han modelado la variación genética de *M. crenulata*.

Los análisis basados en el ADN mitocondrial revelaron nula diferenciación genética entre las localidades de estudio y niveles moderados de diversidad genética, coherentes con la historia demográfica de la especie, así como eventos de expansión o contracción poblacional. Por otro lado, los marcadores SNPs permitieron una resolución más detallada de la estructura genética contemporánea, mostrando diferencias significativas entre las localidades estudiadas, lo que sugiere la presencia de barreras genéticas asociadas a características ambientales o factores históricos.

4.3.1 Diversidad genética asociada a marcadores mitocondriales y SNPs

Los parámetros de diversidad genética observados en este estudio para las ocho localidades de *M. crenulata* con marcadores mitocondriales exhiben bajos niveles de diversidad de nucleotídica. En gasterópodos marinos se ha reportado este tipo de patrones con marcadores mitocondriales, en especies como *C. concholepas* (Cárdenas et al., 2009), la lapa pulmonada *Siphonaria lessoni* (Nuñez et al., 2015), los abulones *H. asinina* y *H. ovina* (Klinbunga et al., 2003). Este tipo de patrones observados en *M. crenulata*, (diversidad haplotípica moderada y una baja diversidad nucleotídica) podría sugerir que la población ha estado bajo una reciente expansión poblacional junto con una acumulación de mutaciones (Grant & Bowen, 1998).

Por otra parte, a partir de la matriz neutral de marcadores SNPs (1,112), se encontraron valores altos de diversidad genómica, en términos de heterocigocidad esperada y observada. Estos resultados son similares a lo reportado en otras especies de gasterópodos marinos de la región, como *H. fulgens* (Mares-Mayagoitia et al., 2025; Mejía et al., 2020), *H. corrugata* (Mares-Mayagoitia et al., 2024), *H. cracherodii* (Vargas-Peralta, 2023) y *H. rufescens* (Griffiths et al., 2025). Asimismo, los coeficientes de endogamia en *M. crenulata* fueron negativos y estadísticamente menores a cero, lo que sugiere un patrón de exogamia. Localidades que presentan niveles bajos o negativos de endogamia (exogamia) pueden estar influenciadas por la reproducción aleatoria entre organismos de diferentes localidades, lo cual podría explicarse por un alto grado de conectividad. Este fenómeno impacta directamente en los niveles de diversidad genética, permitiendo mantener una amplia variabilidad y conservar polimorfismos heterogéneos en poblaciones específicas (Hedrick, 2006).

En contraste con *Megathura crenulata*, en especies como los abulones *H. fulgens*, *H. corrugata* y *H. cracherodii*, se han reportado valores bajos pero positivos de endogamia, con promedios de $F_{IS} = 0.004$ (Mares-Mayagoitia et al., 2024), $F_{IS} = 0.024$ (Mejía et al., 2020) y $F_{IS} = 0.091$ (Vargas-Peralta, 2023) respectivamente; lo que indica un nivel bajo de endogamia en sus poblaciones. No obstante, en *H. rufescens* (Griffiths et al., 2025), mostró valores negativos a todo lo largo de su distribución ($F_{IS} = -0.12$), similares a los observados en *M. crenulata*.

Las localidades que presentan niveles bajos o negativos de endogamia (indicativos de exogamia) podrían estar influenciadas por la reproducción aleatoria entre individuos de diferentes poblaciones, lo que sugiere un alto grado de conectividad genética. Esta conectividad permite mantener una elevada diversidad genética, al favorecer la conservación de polimorfismos heterogéneos dentro de las poblaciones (Hedrick,

2006). Por otro lado, la exogamia observada podría estar asociada a un proceso de expansión poblacional reciente, como lo sugiere la evidencia obtenida a partir de los marcadores mitocondriales analizados en este trabajo. En este contexto, los cuellos de botella seguidos por un rápido crecimiento poblacional habrían favorecido la mezcla de linajes previamente aislados (Cowen et al., 2007).

4.3.2 Diferenciación y estructura genética asociada a marcadores mitocondriales y SNPs, dentro de la distribución geográfica de *Megathura crenulata*

Los resultados obtenidos diferenciación y estructura genética a partir de marcadores mitocondriales mostraron una señal débil de diferenciación poblacional, en contraste con el análisis basado en 1,112 marcadores SNPs, que indicó la presencia de tres grupos genéticos definidos. Estas agrupaciones, se observaron partir del análisis de componentes principales (DACP) y el análisis bayesiano de agrupamiento en STRUCTURE. Considerando lo anterior, el primer grupo incluye las localidades de CAL, ENS, SQT, ISJ y BAS; el segundo grupo a PCA y PEU, y el tercero corresponde exclusivamente a IGP. A pesar de esta diferenciación, las poblaciones de *M. crenulata* podrían considerarse una metapoblación, caracterizada por niveles bajos de estructura genética (Allendorf & Luikart, 2007; Curtis et al., 2008).

Comparativamente, en el abulón azul (*H. fulgens*), especie filogenéticamente cerca, también se han reportado la presencia de tres grupos genéticos, que incluye una diferenciación clara en Isla Guadalupe (IGP) con respecto a las poblaciones costeras (Mares-Mayagoitia et al., 2025; Mejía et al., 2020). De manera similar, en los caracoles de la especie *Littorina keenae* se ha descrito este mismo patrón de diferenciación genética en IGP (Ortiz-Sartorius et al., 2021). En este contexto, la diferenciación genética observada en las poblaciones de IGP podría estar influenciada por el aislamiento geográfico que, aunado a las corrientes oceanográficas, limitaría el flujo génico entre la isla y el continente. Este tipo de patrones podrían favorecer un posible efecto fundador (Ibrahim, 1996; Kojima et al., 2005).

El análisis de aislamiento por distancia (IBD) no detectó una relación entre la distancia genética y la distancia geográfica. Esto sugiere que la estructura genética de esta especie no está determinada únicamente por la proximidad geográfica, sino posiblemente influenciada por otros factores, como las corrientes oceánicas del Sistema de la Corriente de California (Palumbi, 2003; Selkoe & Toonen, 2011; Arafeh-Dalmau et al., 2021). A pesar de la ausencia de aislamiento por distancia, IGP mostro una mayor diferencia genética, lo que podría reflejar barreras específicas al flujo génico por su lejanía de la costa. Estos resultados son consistentes con patrones descritos en otras especies marinas de la región, como *H.*

fulgens y *Littorina keenae*, en las que también se ha identificado una diferenciación genética entre poblaciones insulares y costeras (Mares-Mayagoitia et al., 2025; Mejía et al., 2020; Ortiz-Sartorius et al., 2021). La combinación de aislamiento geográfico y corrientes oceánicas podría limitar el flujo génico entre la isla y el continente, promoviendo un posible efecto fundador o adaptación local, dado que las condiciones ambientales en las islas pueden diferir considerablemente de las del continente (Kojima et al., 2005; Ibrahim, 1996). Sin embargo, la conectividad entre localidades depende de tres factores, los cuales son el hábitat, la capacidad de dispersión y el ciclo de vida larvaria (Baco et al., 2016). En este sentido, especies del grupo de los gasterópodos comparten estas características, lo que permite identificar estos patrones similares entre *M. crenulata* y *H. fulgens*; ya que ambas especies cohabitan en la misma región, son organismos semi sésiles y tienen un desarrollo larvario lecitotrófico.

La conectividad genética entre localidades puede verse afectada por el aumento de la temperatura debido a cambios en procesos fisiológicos de las especies marinas. Arafteh-Dalmau et al. (2021) destacan que el incremento de la temperatura y la ocurrencia de olas de calor marinas pueden reducir la duración del desarrollo larval, lo que disminuye la capacidad de dispersión y por ende, limita el flujo genético entre poblaciones, promoviendo un mayor aislamiento en localidades específicas. En el caso de *Megathura crenulata*, Re-Araujo et al. (2025) reportaron que esta especie presenta una ventana de tolerancia térmica estrecha, lo que la hace vulnerable a variaciones significativas de temperatura. Ante condiciones desfavorables, los ejemplares de *M. crenulata* pueden modificar su distribución para evitar el estrés térmico. De hecho, pescadores locales han observado que, durante periodos de temperaturas elevadas, los ejemplares de esta especie migran a zonas más profundas (com. pers. José Mercado, Coop. Punta Canoas, 2018)., donde las condiciones térmicas son más estables y favorables para su supervivencia.

Estos cambios en el comportamiento y en la distribución de *M. crenulata* podrían tener importantes implicaciones para su estructura poblacional y su conectividad genética a lo largo de su intervalo de distribución, aumentando la probabilidad de diferenciación genética entre localidades aisladas.

4.3.3 Demografía histórica de *Megathura crenulata* asociada a marcadores mitocondriales

Los valores significativamente negativos en las pruebas de neutralidad de *Tajima D* (-1.943) y *F* de *Fu's* (-33.240) junto con la detección de una distribución unimodal en la prueba *mismatch*, sugieren que *Megathura crenulata* ha experimentado una expansión poblacional reciente, caracterizada por un exceso

de haplotipos de baja frecuencia (Grant, 2015; Ho et al., 2015; Sano & Tachida 2005; Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Este patrón podría estar correlacionado con el tipo de desarrollo larvario lecitotrófico de la especie, ya que este modo de desarrollo, aunque limitado en comparación con larvas planctotróficas, permite cierto grado de dispersión que favorece la colonización de nuevos hábitats y, por ende, expansiones poblacionales. Larvas lecitotróficas pueden mantener conectividad genética moderada entre poblaciones, particularmente en hábitats costeros continuos, contribuyendo así a patrones genéticos compatibles con expansiones demográficas (Collin, 2003; Shanks, 2009, Pelc et al., 2009); similar a lo registrado para otras especies como *C. concholepas* (Cárdenas et al., 2009) y otras especies de haliótidos (Kivisild, 2013).

De acuerdo con el análisis de cambios demográficos históricos (*Skyline plot*); el crecimiento poblacional de *M. crenulata* coincide con el final de la última glaciación (hace 25,000 años). Este periodo se caracterizó por un aumento de la temperatura del mar, el cambios en el nivel del mar y la estabilización de los factores ambientales, condiciones que habrían favorecido la expansión y adaptación de diferentes especies nuevos entornos (Peterson et al., 1993). Esto resultó en un posible aumento demográfico de la población, que alcanzó una estabilización hace aproximadamente 8,000 años. Estudios basados en marcadores mitocondriales han demostrado que estos eventos climáticos influyeron significativamente en la estructura genética de muchas especies, ya que las fluctuaciones glaciares promovieron contracciones poblacionales en refugios con temperaturas más cálidas y subsecuentes expansiones poblacionales durante los periodos interglaciares (Hewitt, 2000). Este patrón se ha documentado para varias especies de gasterópodos marinos como *C. concholepas*, donde también se ha identificado que el crecimiento de la población ocurrió después del último período glacial (Cárdenas et al., 2009; Vázquez-Domínguez et al., 2009). Además, los análisis genéticos de *M. crenulata* sugieren una expansión del tamaño de la población en el área geográfica evaluada. El análisis del ADN mitocondrial ha permitido rastrear patrones históricos de recolonización y expansión, proporcionando evidencia de los efectos de la última glaciación sobre la diversidad genética actual (Hewitt, 2000).

4.4 Implicaciones para el manejo y medidas de conservación de *Megathura crenulata*

Las medidas de conservación son clave para mantener la diversidad natural. Para lograrlo, es fundamental implementar estrategias de manejo, establecer cuotas de captura, definir temporadas de veda, fijar tallas

mínimas de captura y zonas protegidas. Sin embargo, desarrollar estos planes de manejo requiere un conocimiento previo sobre las poblaciones silvestres. En este sentido, evaluar parámetros de diversidad y estructura genética, así como determinar la conectividad entre las localidades y patrones de migración permite hacer recomendaciones en el ámbito pesquero, como la identificación de zonas susceptibles y de áreas de pesca adecuadas para evitar la sobreexplotación de regiones específicas, protegiendo así los recursos (Ferrera-Rodríguez et al., 2024; Kool et al., 2013; Micheli et al., 2024). Además, en especies con alto potencial acuícola, este conocimiento facilita la selección de sitios óptimos para recolectar reproductores, permitiendo iniciar un ciclo de cultivo cerrado que incluya especímenes con mayor diversidad genética.

La lapa gigante, *M. crenulata*, es una especie que tiene un alto potencial acuícola y pesquero, que en México carece de regulación gubernamental, sin cuotas de captura, temporadas de veda establecida ni sitios protegidos de extracción. Para lo cual, la información generada mediante marcadores mitocondriales y SNPs permite, en primer lugar, identificar a Isla Guadalupe como una población genéticamente diferente de las localidades de la línea de costa. Además, dentro del grupo costero se distinguen dos grandes grupos, separando a Puerto Canoas y Punta Eugenia del resto de las localidades. Por ello, estas tres regiones (Puerto Canoas, Punta Eugenia e Isla Guadalupe) podrían considerarse y manejarse como unidades de manejo diferentes.

Los resultados de este estudio ofrecen una base sólida para el desarrollo de estrategias de manejo y conservación de *M. crenulata*. La conectividad genética detectada entre las ocho localidades sugiere que las poblaciones no están completamente aisladas, lo que puede favorecer el intercambio genético y proporcionar cierta resiliencia ante eventos locales de declive. Sin embargo, la diferenciación genética observada en algunas localidades indica la posible presencia de linajes únicos o adaptaciones locales importantes para la especie. En este sentido, es fundamental adoptar un enfoque de manejo diferenciado que contemple la protección de unidades de manejo evolutivamente significativas, definidas como poblaciones que representan una parte distintiva del legado evolutivo de una especie y que exhiben diferenciación genética, adaptaciones únicas o aislamiento reproductivo (Baco et al., 2016), con el fin de preservar la diversidad genética y garantizar la sostenibilidad de las poblaciones a largo plazo.

La vulnerabilidad de las poblaciones de *Megathura crenulata* está directamente relacionada con amenazas antropogénicas como la sobreexplotación, la contaminación marina y los efectos del cambio climático. En particular, el calentamiento de los océanos y la acidificación del agua pueden afectar negativamente la supervivencia y reproducción de la especie, alterando la conectividad genética entre poblaciones. Estas

condiciones ambientales adversas pueden reducir el flujo génico al limitar la movilidad y dispersión de larvas, así como disminuir la capacidad adaptativa frente a nuevos desafíos, lo que podría conducir a una mayor fragmentación genética y pérdida de diversidad (Pech et al., 2009; White et al., 2010).

Para integrar estos impactos en los planes de conservación, es necesario considerar umbrales de tolerancia térmica específicos de la especie. Estudios han estimado que *Megathura crenulata* presenta una temperatura máxima tolerada cercana a 27.7–28.1 °C (Re-Araujo et al., 2024), valores que representan un límite crítico para su supervivencia y reproducción en condiciones naturales. La exposición prolongada a temperaturas superiores a estos umbrales puede comprometer la conectividad genética y la capacidad adaptativa de las poblaciones.

Además, la respuesta a eventos de temperatura extrema en especies filogenéticamente cercanas a *M. crenulata*, como el abulón negro (*H. cracherodii*), puede ser una referencia para anticipar efectos potenciales en *M. crenulata*. Estudios han demostrado que olas de calor causan estrés térmico severo y mortalidad masiva en *H. cracherodii*, afectando su estructura genética mediante la reducción del tamaño efectivo poblacional y la fragmentación del hábitat (Burge et al., 2014). Estos impactos subrayan la importancia de incluir la variabilidad genética y la conectividad en las estrategias de conservación frente al cambio climático.

Capítulo 5. Conclusiones

Se detectaron variaciones morfológicas y fenotípicas de *Megathura crenulata* entre los diferentes sitios analizados; registrándose tres fenotipos distintos de color de manto y cuatro de color de concha. No obstante, no se detectó una relación genotipo-genotipo. Se detectó una relación alométrica entre el largo y el ancho de la concha, y el fenotipo de manto no mostró una relación significativa.

El genoma mitocondrial de *M. crenulata* tiene una longitud de 16,788 pb y contiene 13 genes codificadores de proteínas (PCGs), un total de 22 genes de ARN de transferencia, dos genes de ARN ribosómicos y una región control de 454 pb. Adicionalmente, los distintos parámetros evaluados apoyan la hipótesis de una expansión poblacional posterior a la última glaciación en el área estudiada.

Los análisis de estructura poblacional con marcadores mitocondriales no mostraron divergencia entre las localidades. En cambio, los análisis con SNPs neutrales revelaron la presencia de tres unidades evolutivas independientes: una correspondiente solo a Isla Guadalupe y potencialmente dos grupos costeros. El primero incluye las localidades de por California, Ensenada, San Quintín, Isla San Jerónimo y Bahía Asunción y el segundo grupo, agrupa a Puerto Canoas y Punta Eugenia. Sin embargo, es necesario aumentar el número de muestras por localidad y ampliar los sitios de muestreo para aclarar estas diferencias.

Finalmente, futuros estudios podrían centrarse en evaluar los efectos del cambio climático sobre la conectividad genética y la adaptación local de *M. crenulata*, así como en investigar el papel de las corrientes oceánicas en la dispersión larval. Esta información permitirá ajustar las estrategias de manejo y garantizar así la conservación efectiva de la especie en un contexto de cambio ambiental global. En conjunto, este estudio aporta conocimiento valioso sobre la lapa gigante, *M. crenulata*, y sienta las primeras bases para su manejo y conservación como un valioso recurso pesquero y acuícola estratégico en la península de Baja California.

Literatura citada

- Aguilera-Muñoz, F., Lafarga-Cruz, F., & Gallardo-Escaráte, C. (2009). Molecular Analysis in Chilean commercial gastropods based on 16s *rRNA*, *COX1* and *ITS 1-5.8S* RDNA-ITS2 sequences. *Gayana* 73(1), 17–27. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-65382009000100003>
- Aktipis, S. W., & Giribet, G. (2010). A phylogeny of Vetigastropoda and other “archaeogastropods”: re-organizing old gastropod clades. *Invertebrate Biology*, 129(3), 220-240. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7410.2010.00198.x>
- Allendorf, F.W., & Luikart, G. (2007). Conservation and the genetics of populations. John Wiley & Sons.
- Alonso-Domínguez, A. (2013). Diversidad genética morfometría de *Fissurella virescens* en el Pacífico oriental tropical [Tesis de maestría en ciencias, Universidad de Guadalajara]. Repositorio institucional. <https://hdl.handle.net/20.500.12104/75136>
- Arafeh-Dalmau, N., Munguia-Vega, A., Micheli, F., Vilalta-Navas, A., Villaseñor-Derbez, J. C., Precoma-de la Mora, M., & Possingham, H. P. (2023). Integrating climate adaptation and transboundary management: Guidelines for designing climate-smart marine protected areas. *One Earth*, 6(11), 1523-1541. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2023.10.002>
- Armijo-De Vega, C. (1993). Crecimiento y reproducción de la lapa *Megathura crenulata* en la Bahía de Todos Santos Baja California, México [Tesis de maestría en ciencias. Universidad Autónoma de Baja California]. Repositorio institucional. <https://drive.google.com/file/d/1qDn8rANwGSJoJtn2DIQXF87VDi9-8Vyg/view?usp=sharing>
- Baco, A. R., Etter, R. J., Ribeiro, P. A., Von der Heyden, S., Beerli, P., & Kinlan, B. P. (2016). A synthesis of genetic connectivity in deep-sea fauna and implications for marine reserve design. *Molecular ecology*, 25(14), 3276-3298. <https://doi.org/10.1111/mec.13689>
- Bandel, K. (2001). The history of Theodoxus and Neritina connected with description and systematic evaluation of related Neritimorpha (Gastropoda). Mitteilungen aus dem geologisch-paläontologischen Institut der Universität Hamburg, 85, 65-164. http://www.paleoliste.de/bandel/bandel_2001e.pdf
- Becker, M.I., Arancibia, S., Salazar, F., Del Campo, M., & De-Loannes, A. (2014). Chapter 2: Mollusk hemocyanin's as natural immunostimulants in biomedical applications. Guy Huynh Thien Duc (Ed.) In Immune Response Activation (45- 74 pp). Iva Lipovic. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=TCShDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA45&dq=Mollusk+hemocyanin's+as+natural+immunostimulants+in+biomedical+applications,+in+immune+response+activation&ots=QBdTOynDDm&sig=vNgj_HXai86I9lobHtbI2DkL7ko#v=onepage&q=Mollusk%20hemocyanin's%20as%20natural%20immunostimulants%20in%20biomedical%20applications%2C%20in%20immune%20response%20activation&f=false
- Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritzsche, G., & Stadler, P.F. (2013). MITOS: improved *de novo* metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular phylogenetics and evolution* 69(2), 313-319. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.023>
- Bieler, R. (1992). Gastropod phylogeny and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23, 311-338. <https://www.jstor.org/stable/2097291>

- Blanco, J. F., Tamayo, S., & Scatena, F. N. (2014). Variación fenotípica de la concha en Neritinae (Gastropoda: Neritimorpha) en ríos de Puerto Rico. *Revista de Biología Tropical*, 62, 53-68. <https://hdl.handle.net/10669/26114>
- Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27(8), 1767–80. <https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767>
- Bouckaert, R., Vaughan, T.G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., & Drummond, A.J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology* 15(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>
- Bretos, M., & Chihuailaf, R. H. (1990). Biometría y otros aspectos de *Fissurella pulchra* (MOLLUSCA:Prosonbranchia). *Revista de Biología Marina*, 25(1), 1–14.
- Brown, K. M., & Quinn, J. F. (1988). The effect of wave action on growth in three species of intertidal gastropods. *Oceanológicas*, 75, 420-425. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00376946#citeas>
- Buenrostro, A. A., Rodríguez, M. F., Peraza, M. M., & Espinoza, M.L.A. (1995). Variaciones de período corto de la circulación anticiclónica en Bahía Sebastián Vizcaíno, BC. *Ciencias Marinas* 21(2), 201-223. <https://www.redalyc.org/pdf/480/48021206.pdf>
- Burge, C. A., Mark Eakin, C., Friedman, C. S., Froelich, B., Hershberger, P. K., Hofmann, E. E., & Harvell, C. D. (2014). Climate change influences on marine infectious diseases: implications for management and society. *Annual review of marine science*, 6(1), 249-277. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010213-135029>
- Cárdenas, L., Castilla, J. C., & Viard, F. (2009). A phylogeographical analysis across three biogeographical provinces of the south-eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. *Journal of biogeography* 36(5), 969-981. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2008.02056.x>
- Carta Estatal Pesquera De Baja California. (2015). Consultado el 05 de mayo 2024. https://www.bajacalifornia.gob.mx/Documentos/Sepesca/doctos/CARTA_ESTATAL_PESQUERA_2000-2018.pdf
- Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., & Postlethwait, J. H. (2011). STACKS: building and genotyping loci *de novo* from short-read sequences. *G3: Genes/ genomes/ genetics*, 1(3), 171-182. DOI: <https://doi.org/10.1111/mec.12354>
- Csardi, G., & Nepusz, T. (2006). The igraph software package for complex network research. *InterJournal, Complex Systems*, 1695. <https://igraph.org>
- Colgan, D. J., Ponder, W. F., & Eggler, P. E. (2000). Gastropod evolutionary rates and phylogenetic relationships assessed using partial 28S rDNA and histone H3 sequences. *Zoologica Scripta*, 29(1), 29-63. <https://doi.org/10.1046/j.1463-6409.2000.00021.x>
- Collin, R. (2003). Worldwide patterns in mode of development in calyptraeid gastropods. *Marine Ecology Progress Series*, 247, 103-122. <https://www.int-res.com/abstracts/meps/v247/p103-122/>

- Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA). 2013. Anuario estadístico de acuicultura y pesca (2013). Consultado el 15 de agosto de 2020. <https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuacultura-y-pesca>
- Cowen, R. K., Gawarkiewicz, G., Pineda, J., Thorrold, S. R., & Werner, F. E. (2007). Population connectivity in marine systems an overview. *Oceanography*, 20(3), 14-21. <https://www.jstor.org/stable/24860093>
- Curtis, H., Barnes N., Schnek, A. & Massarini, A. (2008). *Biología*. (7ª ed). Editorial Médica Panamericana. Consultado el 29 de octubre de 2024. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=mGadUVpdTLsC&oi=fnd&pg=PA172&ots=blENQPhB07&sig=pC0hFVSuD0CwaK3vp4u_IVjVZqs#v=onepage&q&f=false
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., & DePristo, M. A. (2011). 1000 Genomes Project Analysis Group. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- Del Campo, M., Arancibia, S., Nova, E., Salazar, F., González, A., Moltedo, B., De-Loannes, P., Ferreira, J., Manubens, A., & Becker, M.I. (2011). Hemocianinas, una herramienta inmunológica de la biomedicina actual. *Revista Médica de Chile* 139(2), 236–46. <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872011000200015>
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B., & Pybus, O.G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution* 22(5), 1185-1192. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi103>
- Dunnington, D. (2021). ggspatial: Spatial Data Framework for ggplot2. R package version 1.1.5. Disponible en: <https://cran.r-project.org/package=ggspatial>
- Durazo, R. (2015). Seasonality of the transitional region of the California Current System off Baja California. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 120(2), 1173-1196. <https://doi.org/10.1002/2014JC010405>
- 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, 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Edwards, D., Forster, J.W., Chagné, D., Batley, J. (2007). What Are SNPs?. In: Oraguzie, N.C., Rikkerink, E.H.A., Gardiner, S.E., De Silva, H.N. (eds) *Association Mapping in Plants*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-36011-9_3
- Esguiarte, L. E., Aguirre-Liguori, J. A., Jardón-Barbolla, L., Aguirre-Planter, E., & Souza, V. (2013). Genómica de poblaciones: nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(1), 42-56.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>

- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (Version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1(47). <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>
- Fisheries and Aquaculture Department (FAO). (2023). The State of World Fisheries and Aquaculture 2022: Towards Blue Transformation. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Consultado el 03 de marzo de 2023. <https://www.fao.org/publications/sofia/2022/en/>
- Fisheries and Aquaculture Department (FAO). (2024). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2024: La transformación azul en acción. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Consultado en 25 de julio de 2024. <https://doi.org/10.4060/cd0683es>
- Ferrera-Rodríguez, M. R., Malpica-Cruz, L., Munguía-Vega, A., Beas-Luna, R., Flores-Morales, A. L., & Abadía-Cardoso, A. (2024). Revealing genetic patterns across ecoregions in the northeastern Pacific of California and Baja California. *Journal of Biogeography*, 51(11), 2298-2311. <https://doi.org/10.1111/jbi.14988>.
- 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, 977–993. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.092221>
- García, R. M., & Winkler, F. M. (2012). Asociación del color de la concha de reproductores de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) con la supervivencia, crecimiento y desarrollo larval de sus progenies. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(2), 367-375. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9345455>
- Ghiselli, F., Gomes-Dos-Santos, A., Adema, C.M., Lopes-Lima, M., Sharbrough, J., & Boore, J.L. (2021). Molluscan mitochondrial genomes break the rules. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 376(1825), 20200159. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0159>
- Glenn, T. C., Nilsen, R. A., Kieran, T. J., Sanders, J. G., Bayona-Vásquez, N. J., Finger, J. W., Pierson, T. W., Bentley, K. E., Hoffberg, S. L., Louha, S., García-De León, F. J., Del Rio-Portilla, M. A., Reed, K. D., Anderson, J. L., Meece, J. K., Aggrey, S. E., Rekaya, R., Alabady, M., Belanger, M., Winker, K., & Faircloth, B. C. (2019). Adapterama I: universal stubs and primers for 384 unique dual-indexed or 147,456 combinatorially-indexed Illumina libraries (iTru & iNext). *PeerJ* 7, e7755. <https://doi.org/10.7717/peerj.7755>
- Gómez-Valdés, M. M. (2012). Caracterización del nivel trófico de *Megathura crenulata* (Sowerby, 1825) mediante el uso de la señal isotópica del $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ [Tesis de maestría en ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C]. Repositorio institucional. <http://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/491>
- Gorbach, D. M., Hu, Z. L., Du, Z. Q., & Rothschild, M. F. (2009). SNP discovery in *Litopenaeus vannamei* with a new computational pipeline. *Animal Genetics*, 40 (1), 106–109. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01792.x>
- Grande, C., & Zardoya, R. (2014). Moluscos. *Digital Csic*. <http://hdl.handle.net/10261/100133>
- Grant, W. S., & Bowen, W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of heredity*, 89(5), 415-426. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.5.415>

- Grant, W. S. (2015). Problems and cautions with sequence mismatch analysis and Bayesian skyline plots to infer historical demography. *Journal of Heredity*, 106(4), 333-346. <https://doi.org/10.1093/jhered/esv020>
- Griffiths, J. S., Smith, K., & Whitehead, A. (2025). Seascape Genomics of Red Abalone: Limited Range-Wide Population Structure and Evidence for Local Adaptation. *Molecular Ecology*. 34(4), e17650. <https://doi.org/10.1111/mec.17650>.
- Grüneberg, H. (1982). Pseudo-polymorphism in *Clithon oualaniensis*. Proceedings of the Royal Society of London. *Series B. Biological Sciences*, 216(1203), 147-157. <https://doi.org/10.1111/mec.17650>
- Harris, J., & Markl, J. (1999). Hemocianina de lapa californiana (KLH): una revisión biomédica. *Micron*, 30(6), 597–623.
- Hedrick, P. W. (2006). Genetic polymorphism in heterogeneous environments: the age of genomics. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37(1), 67-93. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110132>
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913. <https://doi.org/10.1038/35016000>
- Hijmans, R. J. (2019). geosphere: Spherical Trigonometry. R package version 1.5-10. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=geosphere>
- Ho S. Y. W., & Shapiro B. (2011). Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Mol. Ecol. Resour.* 11(3), 423–434. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02988.x>
- Ho, P. T., Kwan, Y. S., Kim, B., & Won, Y. J. (2015). Postglacial range shift and demographic expansion of the marine intertidal snail *Batillaria attramentaria*. *Ecology and Evolution* 5(2), 419-435. <https://doi.org/10.1002/ece3.1374>
- Holloway, G. (2002). Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. *Heredity* 89, 410. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800153>
- Houston, R. D., Bean, T. P., Macqueen, D. J., Gundappa, M. K., Jin, Y. H., Jenkins, T. L., & Stevens, J. R. (2020). Harnessing genomics to fast-track genetic improvement in aquaculture. *Nature Reviews Genetics*, 21(7), 389–409. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0227-y>
- Ibragim, K. M., Nikols, R. A., & Hewiq, G. M. (1996). Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansions. *Heredity*, 77, 282-291. <https://doi.org/10.1038/hdy.1996.142>
- Jombart, T. & Ahmed, I. (2011). Adegnet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27, 3070–3071. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr521>.
- 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>.
- King, J. R., Agostini, V. N., Harvey, C. J., McFarlane, G. A., Foreman, M. G., Overland, J. E., & Aydin, K. Y. (2011). Climate forcing and the California Current ecosystem. *ICES Journal of Marine Science*, 68(6), 1199-1216. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsr009>

- Kivisild, T. (2013). Founder Effect in: Brenner's encyclopedia of genetics (2^a ed.). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00552-0>
- Klinbunga, S., Pripue, P., Khamnamtong, N., Puanglarp, N., Tassanakajon, A., Jarayabhand, P., Hirono, I., Aoki, T., & Menasveta, P. (2003). Genetic diversity and molecular markers of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand. *Marine Biotechnology* 5(5), 505–17. <https://doi.org/10.1007/s10126-002-0108-8>
- Kool, J. T., Moilanen, A., & Treml, E. A. (2013). Population connectivity: recent advances and new perspectives. *Landscape Ecology*, 28, 165–185. <https://doi.org/10.1007/s10980-012-9819-z>
- Kojima, S., Kamimura, S., Iijima, A., Kimura, T., Mori, K., Hayashi, I., & Furota, T. (2005). Phylogeography of the endangered tideland snail *Batillaria zonalis* in the Japanese and Ryukyu Islands. *Ecological research*, 20, 686–694. <https://doi.org/10.1007/s11284-005-0082-5>.
- Lischer, H. & Excoffier, L. (2012). PGDSPIDER: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28, 298–299. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr642>
- Liu, Z. J., & Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1–4), 1–37. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.027>
- Lotterhos, K. E., & Whitlock, M. C. (2014). Evaluation of demographic history and neutral parameterization on the performance of F_{ST} outlier tests. *Molecular ecology*, 23(9), 2178–2192. <https://doi.org/10.1111/mec.12725>
- Luu, K., Bazin, E. & Blum, M.G. (2017). PCAdapt: an R package to perform genome scans for selection based on principal component analysis. *Molecular Ecology Resources*, 17, 67–77. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12592>
- Mares-Mayagoitia, J. A., Lafarga-De la Cruz, F., Micheli, F., Cruz-Hernández, P., de-Anda-Montañez, J. A., Hyde, J., & Valenzuela-Quiñonez, F. (2024). Seascape genomics of the pink abalone (*Haliotis corrugata*): An insight into a cross-border species in the northeast Pacific coast. *Journal of Heredity*, 115(2), 188–202. <https://doi.org/10.1093/jhered/esad083>
- Mares-Mayagoitia, J.A., Mejía-Ruiz, P., Lafarga-De la Cruz, F., Micheli, F., Cruz-Hernández, P., De-Anda-Montañez, J.A., Hyde, J., Hernández-Saavedra, N.Y., De Jesús-Bonilla, V.S., Vargas-Peralta, C.E., Flores-Morales, A.L., Pares-Sierra, A.F., & Valenzuela-Quiñonez, F. (2025). A Seascape Genomics Perspective on Restrictive Genetic Connectivity Overcoming Signals of Local Adaptations in the Green Abalone (*Haliotis fulgens*) of the California Current System. *Ecology and Evolution*, 15(2), e70913. <https://doi.org/10.1002/ece3.70913>
- Markl, J., Savel-Niemann, A., Wegener-Strake, A., Soling, M., Schneider, A., Gebauer, W., & Harris, J.R. (1991). The Role of two distinct subunit types in the architecture of Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH). *Naturwissenschaften* 78, 512–514. <https://doi.org/10.1007/BF01131401>
- Mau, A., & Jha, R. (2018). Aquaculture of two commercially important mollusks (abalone and limpet): existing knowledge and futures prospects. *Reviews in Aquaculture* 10(3), 611–625. <https://doi.org/10.1111/raq.12190>

- Maynard, B. T., Kerr, L. J., Mckiernan, J. M., Jansen, E. S., & Hanna, P. J. (2005). Mitochondrial DNA sequence and gene organization in the Australian blacklip abalone *Haliotis rubra* (Leach). *Marine Biotechnology* 7, 645-658. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0013-z>
- Mazariegos-Villarreal, A., Piñón-Gimate, A., Aguilar-Mora, F., Medina, M., & Serviere-Zaragoza, E. (2013). Diet of the keyhole limpet *Megathura crenulata* (Mollusca: Gastropoda) in subtropical rocky reefs. *Journal of Shellfish Research*, 32(2), 297–303. <https://doi.org/10.2983/035.032.0208>
- McARTHUR, A. G., & Harasewych, M. G. (2003). Molecular systematics of the major lineages of the Gastropoda. *Molecular systematics and phylogeography of mollusks*. Smithsonian Institution, Washington, D.C., 328 pp.
- 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, 1126–1131. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13145>
- Mejía-Ruiz, P., Perez-Enriquez, R., Mares-Mayagoitia, J. A., & Valenzuela-Quirónez, F. (2020). Population genomics reveals a mismatch between management and biological units in green abalone (*Haliotis fulgens*). *PeerJ*, 8, e9722. <https://doi.org/10.7717/peerj.9722>
- Micheli, F., Saenz-Arroyo, A., Alto, E., Beas-Luna, R., Boch, C.A., Cárdenas, J.C., & Woodson, C.B. (2024). Social-ecological vulnerability to environmental extremes and adaptation pathways in small-scale fisheries of the southern California Current. *Frontiers in Marine Science* 11, 1322108. <https://doi.org/10.3389/fmars.2024.1322108>
- Miller, C., & Robbins, R. (1940). Chemical analysis and vitamin assays of opihi, the Hawaiian limpet. *Philippine Journal of Science*. 71(26), 141-63. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19401401307>
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106(949), 283-292. <https://doi.org/10.1086/282771>
- Nielsen, E. S., Walkes, S., Sones, J. L., Fenberg, P. B., Paz-García, D. A., Cameron, B. B. & Bay, R. A. (2024). Pushed waves, trailing edges, and extreme events: Eco-evolutionary dynamics of a geographic range shift in the owl limpet, *Lottia gigantea*. *Global Change Biology*, 30(7), e17414. <https://doi.org/10.1111/gcb.17414>
- Núñez, J. D., Fernández-Iriarte, P. J., Ocampo, E. H., Ludica, C., & Cledón, M. (2015). Deep phylogeographic divergence among populations of limpet *Siphonaria lessoni* on the east and west coasts of South America. *Marine Biology* 162, 595-605. <https://doi.org/10.1007/s00227-014-2607-3>
- Núñez-Farfán, J., Careaga, S., Fornoni, J., Ruiz-Montoya, L., & Valverde, P. (2003). La evolución de la plasticidad fenotípica. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 6(1), 16–24. <https://www.sidalc.net/search/Record/KOHA-OAI-ECOSUR:31484>
- Oakes, F. R., Mctee, S., Culver, J., Morse, D. (2004). El efecto del cautiverio y la dieta sobre las proporciones de isoformas de KLH en *Megathura crenulata*. *Bioquímica Comparativa y Fisiología, Parte A: Fisiología Molecular e Integrativa* 138(2), 169–73.

- Olivares-Paz, A., Quinteiro, J., & Rey-Méndez, M. (2011). Filogenia molecular de las especies del subgénero *Fissurella* (Mollusca: Vetigastropoda) de la costa chilena. *Revista de biología marina y oceanografía*, 46(3), 339-348. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572011000300005>
- Ortiz-Sartorius, A., Correa-Sandoval, F., Santamaría-del Angel, E., Giffard-Mena, I., & Camarena-Rosales, F. (2021). Relaciones biogeográficas insulares de *Littorina keenae* Rosewater, 1978, de Isla Guadalupe e Isla Cedros en el Pacífico Mexicano, un análisis morfométrico. *Areas Naturales Protegidas Scripta*. 7(1), 69-90. <https://doi.org/10.18242/anpscripta.2021.07.07.01.0005>
- Palumbi, S. R. (2003). Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine protected areas. *Ecological Applications*, 13(sp1), S146–S158. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(2003\)013\[0146:PGDCAT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(2003)013[0146:PGDCAT]2.0.CO;2)
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., Mcmillan, W.O., Stice, L., & Grabowski, G. (2002). The simple fools guide to PCR. Simple Fool's Guide.
- Pebesma, E. (2018). Simple Features for R: Standardized Support for Spatial Vector Data. *The R Journal*, 10(1), 439-446 <https://doi.org/10.1201/9780429459016>
- Pelc, R. A., Warner, R. R., & Gaines, S. D. (2009). Geographical patterns of genetic structure in marine species with contrasting life histories. *Journal of Biogeography*, 36(10), 1881-1890. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2009.02138.x>
- Peterson, C., Barber, R., & Skilleter, G. (1993). Chapter 2: Global warming and coastal ecosystem response: How to Northern and Southern hemispheres may differ in the Eastern Pacific Ocean in: *Earth Systema Responses to global change*. Academic Press.
- Petersen, 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), e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- Povh, J. A., Lopera Barrero, N. M., Ribeiro, R. P., Lupchinski Jr., E., Gomes, P. C. & López, T. S. (2008). Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1), 5–15. <https://doi.org/10.4067/s0718-16202008000100001>
- Pritchard, J., Falush, D., & Stephens, M. (2002). Inference of population structure in recently admixed populations. *The American Journal of Human Genetics*, 71: 177. <https://hdl.handle.net/11858/00-001M-0000-000E-C674-E>
- Privé, F., Luu, K., Vilhjálmsson, B.J. & Blum, M.G. (2020). Performing highly efficient genome scans for local adaptation with R package pcadapt version 4. *Molecular Biology and Evolution*, 37, 2153–2154. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa053>
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., 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>
- Ramírez-Bello, J., Vargas-Alarcón, G., Tovilla-Zárate, C. & Fragoso, J. M. (2013). Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): Implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN

- estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México*, 149 (2), 220–228. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4233417>
- Ramírez-Manguilar, A. M. (2005). Variabilidad estacional e interanual en el Sistema de la Corriente de California frente a la costa de Baja California, México [Tesis de maestría en ciencias. Universidad Autónoma de Baja California]. Repositorio institucional. <https://drive.google.com/file/d/1ous-gMLHRJPGAfDNyu4Izdmlzjl5vki/view?usp=sharing>
- Raymond, W. W., Barber, J. S., Dethier, M. N., Hayford, H. A., Harley, C. D., King, T. L., & McDonald, P. S. (2022). Assessment of the impacts of an unprecedented heatwave on intertidal shellfish of the Salish Sea. *Ecology*, 103(10). <https://doi.org/10.1002/ecy.3798>
- Re-Araujo, A. D., Díaz, F., Sánchez-Ovando, J. P., Lafarga-de la Cruz, F., Alvarez-Lee, L., & Angeles-Gonzalez, L. E. (2025). Thermal Biology and Metabolic Scope of Two Species of Juvenile Gastropod Mollusks Inhabiting Kelp Forests. *Zoological Studies*, 64(6). <https://zoolstud.sinica.edu.tw/Journals/64/64-06.pdf>
- Rice, W.R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43(1), 223–225. <https://doi.org/10.2307/2409177>
- Río-Portilla, M. A., & González-Avilés, J. G. (2001). Population genetics of the yellow abalone, *Haliotis corrugata*, in Cedros and San Benito Islands: A preliminary survey. *Journal of Shellfish Research* 20(2), 765–770.
- Robinson, N. A., Hall, N. E., Ross, E. M., Cooke, I. R., Shiel, B. P., Robinson, A. J., & Strugnell, J. M. (2014). The complete mitochondrial genome of *Haliotis laevigata* (Gastropoda: Haliotidae) using MiSeq and HiSeq sequencing. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(1), 437–438. <https://doi.org/10.3109/19401736.2014.900611>
- Rohland, N., & Reich, D. (2012). Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome research*, 22(5), 939–946. <https://doi.org/10.1101/gr.128124.111>
- Rojas-Sánchez, D. (2024). Plasticidad fenotípica de las proteínas de la matriz de la concha de mano de león (*Nodipecten subnodosus*) [Tesis de maestría en ciencias, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C]. Repositorio institucional. <http://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/2861>
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van, Der. Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., & Huelsenbeck, J.P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-Del Barrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., & Sánchez-García, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* 34(12), 3299–3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Sambrook, J., Fritish, E.F., & Maniatais, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1626.
- Sandoval-Castillo, J., Robinson, N. A., Hart, A. M., Strain, L. W., & Beheregaray, L. B. (2018). Seascape genomics reveals adaptive divergence in a connected and commercially important mollusk, the

- greenlip abalone (*Haliotis laevis*), along a longitudinal environmental gradient. *Molecular ecology*, 27(7), 1603-1620. <https://doi.org/10.1111/mec.14526>
- Sano, A., & Tachida, H. (2005). Gene genealogy and properties of test statistics of neutrality under population growth. *Genetics*, 169(3), 1687-1697. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.032797>
- Santorum, J. M., Darriba, D., Taboada, G. L., & Posada, D. (2014). Jmodeltest.org: selection of nucleotide substitution models on the cloud. *Bioinformatics* 30(9), 1310-1311. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu032>
- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2011). Marine connectivity: A new look at pelagic larval duration and genetic metrics of dispersal. *Marine Ecology Progress Series*, 436, 291–305. <https://doi.org/10.3354/meps09238>
- Sepúlveda, R. D., Jara, C. G., & Gallardo, C. S. (2012). Morphological analysis of two sympatric ecotypes and predator-induced phenotypic plasticity in *Acanthina monodon* (Gastropoda: Muricidae). *Journal of Molluscan Studies*, 78(2), 173-178. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/epdfplus/10.1086/BBLv216n3p373>
- Shanks, A. L. (2009). Pelagic larval duration and dispersal distance revisited. *The biological bulletin*, 216(3), 373-385. <https://doi.org/10.1086/BBLv216n3p373>
- Söhngen, S. M., Stahlmann, A., Harris, J. R., Müller, S. A., Engel, A., & Markl, J. (1997). Mass determination, subunit organization and control of oligomerization states of keyhole limpet hemocyanin (KLH). *European Journal of Biochemistry*, 248(2), 602–614. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00602.x>
- Sokal, R., & Rohlf, J.F. (1969). Biometry. The principles and practices of statistics in biological research. W.H Freeman and Company, New York.
- South, A. (2017). rnatuarearth: World Map Data from Natural Earth. R package version 0.1.0. Disponible en: <https://cran.r-project.org/package=rnatuarearth>
- Strobel, A., Hu, M. Y., Gutowska, M. A., Lieb, B., Lucassen, M., Melzner, F., & Mark, F. C. (2012). Influence of temperature, hypercapnia, and development on the relative expression of different hemocyanin isoforms in the common cuttlefish *Sepia officinalis*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 317(8), 511-523. <https://doi.org/10.1002/jez.1743>.
- Streit, K., Jackson, D., Degnan, B. M. & Lieb, B. (2005). Expresión de desarrollo de dos isoformas de hemocianina *Haliotis asinina*. *Differentiation*, 73(7), 341–349.
- Swerdlow, R.D., Ebert, R.F., Lee, P., Bonaventura, C., & Miller, K.L. (1996). Keyhole limpet hemocyanin: structural and functional characterization of two different subunits and multimers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 113(3), 537-548. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02091-8](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02091-8)
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30, 2725–29. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

- Teacher, A. G. & Griffiths, D.J. (2011). HapStar: automated haplotype network layout and visualization. *Molecular Ecology Resources* 11(1), 151–53. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02890.x>.
- Torres-Moye, G. (2012). Mainland and island kelp forests in northern Baja California, Mexico: subtidal community structure, dynamics, and connectivity for the design of marine protected areas [Tesis de doctorado en ciencias, University of California Davis. Repositorio institucional. https://search.library.ucdavis.edu/permalink/01UCD_INST/9fle3i/alma990036858220403126
- Trussell, G. C. (2000). Phenotypic plasticity in an intertidal snail: the role of a common crab predator. *Evolution*, 54(1), 151–163. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00015.x>
- Untergasser, A., Cutcutache, L., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, & M., Rozen S. G. (2012). Primer3 - New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15), 115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>.
- Uribe, J. E., Sei, M., & Harasewych, M. G. (2022). The mitogenome of the sunken wood limpet *Notocrater youngi*: insights into mitogenome evolution in Lepetellida (Gastropoda: Vetigastropoda). *Journal of Molluscan Studies* 88(2). <https://doi.org/10.1093/mollus/eyac009>
- Uribe-Arboleda, J. E. (2016). Mitogenómica y filogenia de linajes de gasterópodos altamente diversificados (Vetigastropoda, Neritimorpha y Conoidea) [Tesis de doctorado en ciencias, Universidad Autónoma de Madrid]. Repositorio institucional. <http://hdl.handle.net/10486/676841>
- Vargas-Peralta, C. E. (2023). Identificación de especies para trazabilidad de abulones del Pacífico nororiental y genómica poblacional de *Haliotis cracherodii* en peligro crítico [Tesis de doctorado en ciencias, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, B. C.]. Repositorio institucional. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/3936>
- Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño, T., & Gutiérrez-García, T.A. (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista chilena de historia natural*, 82(2), 277-297. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2009000200009>
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wickham H., Girlich M., Ruiz E. (2024). dbplyr: A 'dplyr' Back End for Databases. R package version 2.5.0, <https://github.com/tidyverse/dbplyr>, <https://dbplyr.tidyverse.org/>
- Wickham, H., Vaughan, D., Girlich, M. (2024). tidyr: Tidy Messy Data. R package version 1.3.1, <https://github.com/tidyverse/tidyr>, <https://tidyr.tidyverse.org>
- White, C., Selkoe, K. A., Watson, J., Siegel, D. A., Zacherl, D. C., & Toonen, R. J. (2010). Ocean currents help explain population genetic structure. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1688), 1685-1694. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.2214>
- 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, S24-S36. <https://doi.org/10.1186/s12864-025-11259-9>.

- Wilke, T., Schultheiß, R., & Albrecht, C. (2009). As time goes by a simple fool's guide to molecular clock approaches in invertebrates. *American Malacological Bulletin*, 27(1/2), 25-45. <https://doi.org/10.4003/006.027.0203>.
- Wooldridge, B., Orland, C., Enbody, E., Escalona, M., Mirchandani, C., Corbett-Detig, R., Kapp, J. D., Fletcher, N., Cox-Ammann, K., Raimondi, P., & Shapiro, B. (2024). Limited genomic signatures of population collapse in the critically endangered black abalone (*Haliotis cracherodii*). *Molecular Ecology*, 00, e17362. <https://doi.org/10.1111/mec.17362>
- Yao, T., Zhao, H., He, J., Han, T., Peng, W., Zhang, H., & Jiang, J. (2019). Expresión génica y actividades de fenoloxidasa de isoformas de hemocianina en respuesta a infecciones por patógenos en abulón *Haliotis diversicolor*. *Revista Internacional de Macromoléculas Biológicas*, 129, 538–551.
- Yu, Y., Zhang, X., Liu, J., Li, F., Huang, H., Li, Y., & Xiang, J. (2014). Molecular markers for identifying a new selected variety of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 33(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00343-014-3232-1>
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis* (4^a ed.). Prentice Hall.
- Zenger, K. R., Khatkar, M. S., Jones, D. B., Khalilisamani, N., Jerry, D. R., & Raadsma, H. W. (2019). Genomic selection in aquaculture: Application, limitations and opportunities with special reference to marine shrimp and pearl oysters. *Frontiers in Genetics*, 9, 693. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00693>

Anexos

Tabla 10. Secuencias de adaptadores (*index*) utilizados en la preparación de librerías genómicas de ddRAD-Seq, de acuerdo con el protocolo descrito por Peterson y colaboradores, 2012.

Nombre Identificador	Secuencia
PCR2_idx_2_CGATGT	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACATC- GGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGC
PCR2_idx_3_TTAGGC	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCCTAA- GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGC
PCR2_idx_5_ACAGTG	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCACTGTG- TGACTGGAGTTCAGACGTGTGC

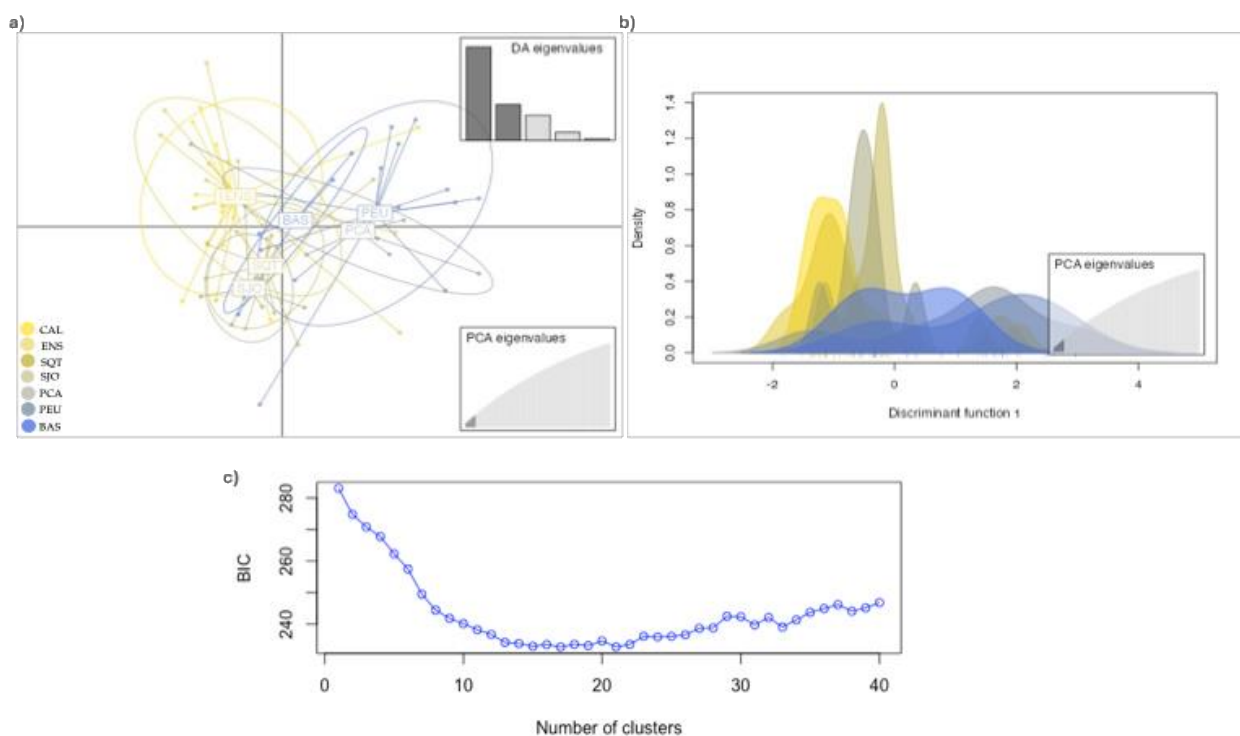


Figura 25. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) de la matriz neutral de 1,112 SNPs de *Megathura crenulata* para el análisis de agrupaciones de siete localidades. a) DAPC de siete localidades; b) Función Discriminante 1: Separación de Grupos del DAPC de siete localidades; c) Criterio de Información Bayesiano (BIC) indicativo del número óptimo de agrupaciones.

