

TESIS DEFENDIDA POR
ALMA VANIA BLANCAS LÓPEZ
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

DR. AXAYÁCATL ROCHA OLIVARES

Director del Comité

DR. LUIS EDUARDO CALDERÓN AGUILERA

Miembro del Comité

DR. MIGUEL ANGEL DEL RÍO PORTILLA

Miembro del Comité

DR. AXAYÁCATL ROCHA OLIVARES

*Coordinador del programa de posgrado en
Ecología Marina*

DR. DAVID HILARIO COVARRUBIAS ROSALES

Director de Estudios de Posgrado

30 de Septiembre de 2009

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
EN ECOLOGÍA MARINA**

**CONECTIVIDAD DEMOGRÁFICA DE *Pocillopora verrucosa* (Anthozoa:
Scleractinia) EN EL PACÍFICO MEXICANO**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

ALMA VANIA BLANCAS LÓPEZ

Ensenada, Baja California, México, Septiembre de 2009

RESUMEN de la tesis de **ALMA VANIA BLANCAS LÓPEZ**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Septiembre 2009.

CONECTIVIDAD DEMOGRÁFICA DE *Pocillopora verrucosa* (ANTHOZOA: SCLERACTINIA) EN EL PACÍFICO MEXICANO

Resumen aprobado por:

Dr. Axayácatl Rocha Olivares

Director de Tesis

Estimar la diversidad genética y conectividad demográfica poblacional de corales hermatípicos es fundamental para evaluar la vulnerabilidad de los sistemas arrecifales ante cambios ambientales. *Pocillopora verrucosa* es un coral dominante y principal constructor de arrecifes en el Pacífico mexicano, por lo que en este trabajo se analizaron sus niveles de conectividad entre siete arrecifes coralinos utilizando ADN ribosomal (ITS2). La diversidad haplotípica varió de media a relativamente alta ($h = 0.52 - 0.82$) mientras que la nucleotídica fue consistentemente baja ($p = 0.003 - 0.016$). Se encontró una estructura genética pequeña pero significativa ($\Phi_{ST} = 0.02$, $p = 0.04$). Sin embargo, la diferenciación interdémica fue insuficiente para mantener la significancia de pruebas pareadas para todas ellas después de la corrección por pruebas múltiples. Un haplotipo (IT-3) predominó en la mayoría (52%) de las muestras, lo cual es consistente con una reproducción asexual por fragmentación, principal estrategia reproductiva de la especie en el Pacífico mexicano. Por otra parte, se obtuvieron altos valores de flujo genético entre la mayoría de las localidades, teniendo que las mayores tasas de migración ocurrieron de Islas Marietas hacia La Paz, de Ixtapa hacia Cabo Pulmo y de Ixtapa hacia Islas Marías. Se observó una concordancia entre los principales patrones de flujo genético de *P. verrucosa* y la hidrodinámica promedio superficial del Pacífico mexicano. Si bien el flujo genético es considerable entre algunas localidades estudiadas, existe evidencia de una desviación significativa del estado de panmixia entre todas ellas. Se observaron dos patrones de demografía histórica en las localidades de acuerdo a la distribución de diferencias interhaplotípicas. Uno de ellos, encontrado en Ixtapa e Islas Marías, sugiere que estas poblaciones probablemente han permanecido estables demográficamente. El segundo patrón, compartido por el resto de las poblaciones, sugiere que han sufrido una expansión demográfica repentina. Finalmente, es importante resaltar que las inferencias hechas a partir de las secuencias del ADNr de este trabajo constituyen una primera aproximación, ya que un sólo gen puede ser insuficiente para evaluar los patrones y procesos que determinan la conectividad de *P. verrucosa* a lo largo del Pacífico mexicano. Por lo tanto, se deben realizar estudios adicionales con un mayor número de marcadores genéticos para entender mejor la ecología molecular de la especie.

Palabras Clave: *Pocillopora verrucosa*, diversidad genética, conectividad demográfica.

ABSTRACT of the thesis presented by **ALMA VANIA BLANCAS LÓPEZ** as a partial requirement to obtain the **MASTER OF SCIENCE** degree in **MARINE ECOLOGY**. Ensenada, Baja California, México. September, 2009.

DEMOGRAPHIC CONNECTIVITY OF *Pocillopora verrucosa* (ANTHOZOA: SCLERACTINIA) ALONG THE MEXICAN PACIFIC COAST

Knowledge about the levels of genetic diversity and demographic connectivity among populations of corals is essential to assess the vulnerability of coral-reef systems to environmental changes. *Pocillopora verrucosa* is one of the dominant hermatypic corals and major coral-reef builder along the Mexican Pacific. Consequently, the demographic connectivity of *P. verrucosa* was assessed among seven coral reefs, using ribosomal DNA (ITS2). Haplotype diversity ranged from medium to relatively high levels ($h = 0.52$ to 0.82) whereas nucleotide diversity was consistently low ($p = 0.003$ to 0.016). A small but significant level of genetic structure ($\Phi_{ST} = 0.02$, $p = 0.04$) was found among sampled localities. However, levels of inter-demic differentiation were insufficient to maintain significance of pairwise comparisons after correction for multiple tests. A single haplotype (IT-3) was found in most of the individuals (52%), which was consistent with the asexual mode of reproduction (fragmentation) suggested as the main reproductive strategy of this species in the Mexican Pacific. High levels of gene flow were estimated among most locations. The highest rates of migration occurred from Isla Marietas to La Paz, Ixtapa to Cabo Pulmo and Ixtapa to Islas Mariás. A correlation was found between the main patterns of gene flow and the average superficial hydro-dynamics of the Mexican Pacific. Even though high levels of gene flow were estimated among localities, there is evidence of a significant departure from panmixia. Mismatch distribution analyses revealed two historical demographic patterns in the seven localities. One shared by Ixtapa and Islas Marias, suggests that corals may have remained in demographic equilibrium. The second suggests that the rest may have experienced a sudden population expansion. Finally, it is important to note that inferences made from the rDNA sequences in this study should be viewed as a first approximation, since analysis of a single gene may be insufficient to reveal the patterns and processes responsible for maintaining connectivity levels in *P. verrucosa* along the Mexican Pacific. Therefore, additional studies involving a larger number of genetic markers should be carried out to fully understand the molecular ecology of the species.

Keywords: *Pocillopora verrucosa*, genetic diversity, demographic connectivity.

Agradecimientos

Al Dr. Axayácatl Rocha por dirigir esta tesis, pero principalmente por todo el apoyo, asesoría, paciencia y confianza que me ha brindado a lo largo de este año y medio de trabajo.

Al Dr. Luis Calderón por transmitirme el gusto por los corales y por permitirme participar en el proyecto: CONACYT–SEMARNAT–INE “Vulnerabilidad de los arrecifes coralinos de las costas mexicanas por efecto del cambio global y posibles consecuencias socioambientales”. Gracias por los consejos y sugerencias para mejorar esta tesis.

Al Dr. Miguel Ángel del Río por el tiempo dedicado en la corrección y enriquecimiento de este trabajo.

A Nancy Saavedra por su valiosa ayuda en esta tesis, por haber dedicado gran parte de su tiempo en la enseñanza de técnicas de laboratorio y análisis de datos. Muchas gracias por todo el apoyo y consejos.

A todas las personas que en gran medida hicieron posible este estudio al realizar la colecta de ejemplares: al equipo de Héctor Reyes Bonilla, de Andrés López Pérez y de Amilcar Cupul Magaña.

A CONACYT por el otorgamiento de la beca de maestría, la cual me ayudó en la manutención durante la realización de esta investigación.

Al CICESE por darme la oportunidad de realizar un posgrado en esta institución.

A Nancy, Anne, Jorge y Janto por su gran ayuda y por todo el tiempo que compartimos juntos trabajando en el laboratorio de Ecología Molecular. Comadre compartir contigo todas las desveladas, el trabajo, los enojos, el estrés y las alegrías fue un gusto y una gran experiencia.

A mis grandes amigos de la maestría (Anne, Bertha, Dany y Jose) por los días de estudio, las parrandas y principalmente por su apoyo en los momentos más difíciles, ustedes fueron mi familia aquí en Ensenada. ¡Los quiero muchísimo!

A Mario por estar a mi lado en algo tan importante en mi vida, gracias por apoyarme en todo momento y por ser parte de este logro.

A Geny y Lourdes por todo el apoyo que me brindaron a mi llegada y durante toda mi estancia en Ensenada.

A mis amigos de toda la vida quienes siempre me han motivado y apoyado en todo lo que he hecho. Porque a pesar del tiempo, la distancia y todas las cosas que hemos pasado, siempre me han brindado su apoyo y cariño. Su amistad es una de las mejores satisfacciones en mi vida.

A mi hermana porque siempre ha estado a mi lado apoyándome y queriéndome. Gracias por darme la bendición de conocer al angelito que más amo y que ilumina mi vida. ¡Clau y Uri los amo mucho!

A mi padre y a mi madre por su inmenso amor y apoyo incondicional. Este logro no hubiera sido posible sin su ayuda, así que es tanto de ustedes como mío. ¡Gracias por todo lo que han hecho por mí!

CONTENIDO

	Página
I. Introducción.....	1
I.1. Arrecifes coralinos y corales hermatípicos.....	1
I.2. Deterioro de los arrecifes coralinos.....	2
I.3. Genética poblacional en corales.....	3
I.3.1. Diversidad genética.....	3
I.3.2. Conectividad demográfica.....	5
I.3.3. Biología reproductiva de corales hermatípicos.....	7
II. Antecedentes.....	9
II.1. <i>Pocillopora verrucosa</i>	9
II.2. Reproducción y genética poblacional de <i>Pocillopora spp</i>	10
II.3. Genética poblacional de especies coralinas en el Pacífico mexicano.....	12
III. Justificación.....	14
IV. Hipótesis.....	16
V. Objetivos.....	17
V.1. Objetivo General.....	17
V.2. Objetivos Específicos.....	17
VI. Metodología.....	18
VI.1. Área de estudio.....	18
VI.2. Colecta de muestras.....	18
VI.3. Análisis genéticos.....	18
VI.3.1. Extracción de ADN.....	18
VI.3.2. Amplificación.....	20
VI.3.3. Purificación y secuenciación.....	21
VI.4. Análisis de datos.....	21
VI.4.1. Edición y alineamiento de secuencias.....	21
VI.4.2. Estimación de la diversidad genética.....	21
VI.4.3. Estimación de la estructura genética.....	22
VI.4.4. Flujo genético.....	23
VI.4.5. Aislamiento por distancia.....	23
VI.4.6. Relaciones filogenéticas entre haplotipos.....	24
VI.4.7. Demografía histórica.....	24
VII. Resultados.....	26
VII.1. Muestreo.....	26
VII.2. Extracción de ADN y genotipificación.....	27
VII.3. Identificación y distribución de haplotipos.....	29

CONTENIDO (Continuación)

VII.3.1.	ADN ribosomal (ITS2).....	29
VII.3.2.	ADN mitochondrial (intrón <i>Nad5</i>).....	32
VII.4.	Diversidad genética.....	32
VII.5.	Estructura genética.....	33
VII.6.	Flujo genético.....	35
VII.7.	Aislamiento por distancia.....	37
VII.8.	Relaciones filogenéticas.....	38
VII.8.1.	ADN ribosomal (ITS2).....	38
VII.8.2.	ADN mitochondrial (intrón <i>Nad5</i>).....	41
VII.9.	Demografía histórica.....	42
VIII.	Discusión.....	44
VIII.1.	Variabilidad y utilidad de los loci empleados en <i>P. verrucosa</i>	44
VIII.2.	Diversidad genética.....	46
VIII.3.	Diferenciación genética.....	49
VIII.4.	Conectividad demográfica de <i>P. verrucosa</i> en el Pacífico mexicano.....	53
VIII.4.1.	Estrategia reproductiva dominante.....	53
VIII.4.2.	Flujo larvario.....	54
VIII.4.3.	Rutas de dispersión de acuerdo a los patrones de circulación oceanográfica.....	56
VIII.5.	Aislamiento por distancia y patrones filogeográficos.....	58
VIII.6.	Demografía histórica.....	59
VIII.7.	Posibles explicaciones de los resultados obtenidos con el ITS2.....	61
IX.	Conclusiones y perspectivas sobre la investigación.....	66
X.	Literatura citada.....	67
IX.	Apéndice.....	78

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 1. Estructura de las regiones de los genes utilizados en este estudio. Intrón <i>Nad5</i> del ADNmt (A), intrón β-Tub del ADNn (B) y regiones ITS1 e ITS2 del ADNr (C). Los rectángulos de colores denotan las regiones codificantes. Las barras negras indican las regiones no codificantes que fueron analizadas.....</p>	4
<p>Figura 2. Patrones de diferenciación geográfica y genética de acuerdo a la magnitud de la tasa de migración por generación (m) y del tamaño efectivo poblacional (N_e). Tomado de Hellberg <i>et al.</i>, 2002.....</p>	6
<p>Figura 3. Coral hermatípico <i>Pocillopora verrucosa</i> (Fotos: Luis Calderón-Aguilera).....</p>	9
<p>Figura 4. Localidades de muestreo: (LOR) Loreto, (LPA) La Paz y (CPU) Cabo Pulmo, Baja California Sur; (IIS) Isla Isabel, (IMA) Islas Mariás e (IMR) Islas Marietas, Nayarit; (IXT) Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero; (BHU) Bahías de Huatulco, Oaxaca. Patrones generales de corrientes superficiales del Pacífico mexicano: (CC) Corriente de California, (CT) Corriente o giro de Tehuantepec, (CEM) Corriente del Este de México, (CCR) Corriente de Costa Rica, (\rightarrow) circulación en invierno y ($\cdots\rightarrow$) circulación en verano en la entrada del Golfo de California (Álvarez-Borrego, 2002; Kessler, 2006).....</p>	19
<p>Figura 5. Gráficas circulares de la frecuencia relativa de haplotipos compartidos (colores) y privados (blanco) por localidad (H = número de haplotipos).....</p>	31
<p>Figura 6. Representación de las mayores magnitudes relativas y dirección del flujo genético entre las localidades, obtenidas a partir de una de las simulaciones con el programa Migrate. Líneas discontinuas representan las principales corrientes del Pacífico mexicano.....</p>	36
<p>Figura 7. Correlación entre la distancia genética (Φ_{st}) y la distancia geográfica entre pares de localidades.....</p>	37

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Página

- Figura 8. Árbol filogenético creado con el método Neighbor Joining basado en las distancias interhaplotípicas del ITS2 de *Pocillopora verrucosa* en el Pacífico mexicano, utilizando a *P. eydouxi* como grupo externo para enraizar el árbol. Los cuadros de colores sólidos representan las localidades, los recuadros representan los grupos formados para interpretar la topología (A, B, C, D)..... 39
- Figura 9. Árbol consenso de los 108 árboles de máxima parsimonia de los haplotipos del ITS2 de *Pocillopora verrucosa* en el Pacífico mexicano..... 40
- Figura 10. Árbol filogenético creado con el método Neighbor Joining de los haplotipos del intrón *Nad5* de *Pocillopora verrucosa* en el Pacífico mexicano..... 41
- Figura 11. Distribución de diferencias interhaplotípicas con base en las secuencias de la región del ITS2 del ADNr de *Pocillopora verrucosa* en las localidades del Pacífico mexicano. Las líneas representan la distribución esperada y la observada por el modelo de expansión repentina. S.S.D = suma de las desviaciones cuadradas..... 43

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I.	Cebadores utilizados para amplificar los loci del ITS1-5.8S-ITS2 (A), del intrón <i>Nad5</i> (B) y del intrón y exón de β -tubulina (C) de <i>Pocillopora verrucosa</i>	20
Tabla II.	Tamaño de muestra (<i>n</i>) y fechas de colecta de <i>Pocillopora verrucosa</i> en el Pacífico mexicano.....	26
Tabla III.	Número de extracciones y amplificaciones para cada locus por localidad.....	27
Tabla IV.	Número de secuencias obtenidas para el intrón <i>Nad5</i> , para el ITS2 y porcentaje de productos de PCRs secuenciados por localidad (% _{PCS})..	28
Tabla V.	Sitios variables, conservados e informativos para parsimonia en las secuencias de los loci ITS2 y <i>Nad5</i>	29
Tabla VI.	Frecuencias relativas de los haplotipos del ITS2 de <i>Pocillopora verrucosa</i>	30
Tabla VII.	Frecuencias relativas de los haplotipos del intrón <i>Nad5</i> de <i>Pocillopora verrucosa</i> y sus frecuencias relativas por localidad.....	32
Tabla VIII.	Número de haplotipos por localidad (H), índice de diversidad haplotípica (<i>h</i>) y nucleotídica (π) para el locus ITS2 de <i>Pocillopora verrucosa</i> en el Pacífico mexicano.....	33
Tabla IX.	Porcentajes de variación de los componentes de variancia e índice de fijación (Φ_{ST}) obtenidos con el AMOVA.....	34
Tabla X.	Valores de Φ_{ST} de las comparaciones pareadas entre localidades (bajo la diagonal) y sus valores de <i>p</i> (sobre la diagonal).....	34
Tabla XI.	Valores del número de migrantes efectivos por generación (Nm) de <i>Pocillopora verrucosa</i> entre localidades a partir de los valores de Φ_{ST}	35

LISTA DE TABLAS (Continuación)

	Página
Tabla XII. Estimaciones de los valores de θ ($4N_e \cdot \mu$) mediante verosimilitud máxima con una de las simulaciones de MCMC.....	35
Tabla XIII. Estimaciones de las tasas de migración entre poblaciones ($M=m/\mu$) mediante verosimilitud máxima con una de las simulaciones de MCMC.....	36
Tabla XIV. Resultados de la distribución de distancias de las comunidades arrecifales en el Pacífico mexicano. H = número de haplotipos, τ = Tiempo ocurrido en número de generaciones desde la expansión, θ_0 =Tamaño poblacional antes de la expansión, θ_1 = Tamaño poblacional después de la expansión.....	42
Tabla XV. Niveles de variabilidad de las regiones ITS (ADNr) en algunas especies coralinas.....	47
Tabla XVI. Diferenciación genética (índice de fijación) encontrada en estudios de especies de <i>Pocillopora</i> y otros géneros de corales del Pacífico mexicano.....	50

I. Introducción

I.1. Arrecifes coralinos y corales hermatípicos

Los arrecifes coralinos son estructuras calcáreas construidas por organismos cnidarios (Orden Scleractinia) que tienen la capacidad de depositar carbonato de calcio (CaCO_3). Estas estructuras arrecifales proveen el sustrato de uno de los ecosistemas de mayor importancia desde el punto de vista ecológico y económico. Ecológicamente son sistemas altamente productivos y son uno de los ecosistemas con mayor diversidad en el mundo. Asimismo, los corales tienen un papel relevante en el flujo de carbono en el océano debido a su capacidad para depositar CaCO_3 . Además, debido a que son organismos sésiles, con una larga permanencia en el tiempo, sus estructuras calcáreas pueden utilizarse como centinelas de los cambios climáticos. Por otra parte, las estructuras arrecifales representan una protección de la línea de costa contra marejadas y oleaje. Económicamente, los arrecifes coralinos albergan un gran número de especies de valor comercial, las cuales representan un importante recurso pesquero. Asimismo, estos sistemas son una fuente de ingreso económico debido a que son áreas de interés ecoturístico. (Jordan, 1993; Ruppert y Barnes, 1996; Knowlton, 2001a; Reyes-Bonilla *et al.*, 2005).

Uno de los componentes principales y con mayor diversidad de los arrecifes son los corales hermatípicos, éstos mantienen una asociación simbiótica con microalgas llamadas zooxantelas. Esta asociación proporciona beneficios para ambas especies: el coral provee a las zooxantelas un ambiente seguro y nutrientes tales como dióxido de carbono (CO_2), fosfatos y compuestos nitrogenados. A cambio, los corales reciben productos fotosintéticos como oxígeno y moléculas orgánicas que aumentan sus tasas de depósito de CaCO_3 (Muscatine, 1990; Hughes *et al.*, 1992; Iglesias-Prieto *et al.*, 2004).

La asociación simbiótica coral-zooxantela sólo se presenta en condiciones específicas de salinidad, luz, nutrientes y temperatura (18 a 30°C), por lo que la distribución de los corales hermatípicos se encuentra limitada a latitudes de 30°N y 30°S, encontrándose principalmente en las costas intertropicales del Atlántico, Indo Pacífico y Pacífico oriental, en donde la incidencia solar es alta y las concentraciones de nutrientes, así como de partículas suspendidas en el agua son bajas (Hughes y Connell, 1999; Veron, 2000; Knowlton, 2001b).

I.2. Deterioro de los arrecifes coralinos

A pesar de la capacidad de adaptación que se ha observado en los arrecifes coralinos ante los cambios del medio ambiente a lo largo de millones de años, en las últimas décadas se ha registrado un deterioro considerable en estos sistemas debido principalmente a factores antropogénicos y a eventos climáticos naturales (Stoddart, 1984; Chadwick-Furman, 1996; Wood, 2001).

Los arrecifes coralinos cercanos a zonas pobladas afrontan una creciente amenaza ocasionada por actividades humanas como: la pesca, la contaminación química del agua con fertilizantes, hidrocarburos y pesticidas; el anclaje y encalle de botes sobre los arrecifes; la destrucción directa ocasionada por buzos; el incremento de sedimentos en áreas costeras como producto de construcciones urbanas o como resultado de la deforestación; la acidificación de las aguas debido al incremento exponencial del CO₂ atmosférico y el cambio climático global. Estos impactos han ocasionado la destrucción de un gran número de especies y han afectado los arrecifes a escala local y en algunas ocasiones a escala regional (Dayton *et al.*, 1995; Hawkins *et al.*, 1999; Hughes y Connell, 1999; Tilot *et al.*, 2008).

Por otra parte, los disturbios naturales (como huracanes y ciclones) que acentúan cambios en la temperatura, luz, concentración de nutrientes, sedimentos o reducción de la circulación del agua, también ocasionan daños en los arrecifes coralinos (Wood, 2001).

Una de las manifestaciones más evidentes del deterioro de los arrecifes es el blanqueamiento de los corales hermatípicos. El blanqueamiento es un fenómeno que refleja la pérdida de pigmentación ocasionada por la disminución del número de zooxantelas (60-90%) o bien por una menor concentración de pigmentos fotosintéticos en los endosimbiontes. Este fenómeno es una respuesta a condiciones de estrés ocasionadas por la contaminación, la sedimentación, las enfermedades, el incremento o disminución de luz y principalmente por el aumento de la temperatura superficial del mar (Glynn, 1996; Wilkinson, 2002; Hughes *et al.*, 2003; Van Oppen, 2007).

Los eventos de blanqueamiento masivo se han registrado desde 1979 en varios ecosistemas arrecifales del mundo. En 1998 se reportó un evento de blanqueamiento masivo en arrecifes coralinos en más de 50 países provocando una mortalidad del 30 al 99% de los corales. En algunas zonas esto se asoció a un incremento de la temperatura

ocasionado por el fenómeno de El Niño Oscilación del Sur (ENSO). En los arrecifes del Pacífico se observaron blanqueamientos sincronizados en varias localidades, donde se pudo observar que las especies coralinas afectadas mostraron distintas capacidades de resistencia y resiliencia (Reyes-Bonilla *et al.*, 2002; Jiménez y Cortés, 2003; West y Salm, 2003; Guzmán y Cortés, 2007; Golbuu *et al.*, 2007).

Actualmente se ha observado un incremento en la temperatura superficial del océano atribuido al cambio climático global. En zonas ecuatoriales donde la temperatura es el factor de mayor importancia para la distribución y abundancia de especies coralinas, este incremento representa una amenaza para la supervivencia de estos organismos (Glynn, 1991; Hughes *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2005).

I.3. Genética poblacional en corales

La finalidad de la genética poblacional es evaluar, a través del muestreo dirigido de genes, aspectos relevantes de una población como el flujo genético, la filogeografía, la filopatría y la estructura de una población (Hellberg *et al.*, 2002).

En el caso de los sistemas arrecifales, el conocimiento de la diversidad genética y los patrones de conectividad demográfica, así como los cambios genéticos y evolutivos en los corales, es fundamental para evaluar la vulnerabilidad y capacidad de resistencia y resiliencia (tanto a escala espacial como temporal) de estos sistemas a amenazas presentes y futuras (Ayre y Hughes, 2004; Hellberg, 2007).

I.3.1. Diversidad genética

La variación de genes dentro de cada especie o diversidad genética está determinada principalmente por procesos de mutación, recombinación y reproducción sexual, sin embargo, también es afectada por procesos de selección natural, endogamia, deriva génica y flujo genético. La diversidad genética representa el reservorio de variabilidad disponible para dar respuesta al medio. La supervivencia selectiva de esa diversidad permite la adaptación de los organismos a través del tiempo, por lo cual el conocer los niveles de diversidad genética en las poblaciones coralinas es esencial para evaluar si las poblaciones cuentan con la suficiente diversidad para enfrentar los cambios ambientales.

Se han utilizado distintos marcadores bioquímicos (aloenzimas) y moleculares (genes nucleares y citoplasmáticos) para estimar de manera directa la diversidad genética de las poblaciones de organismos invertebrados marinos, sin embargo, aún existe un número limitado de estos marcadores, lo que restringe los estudios genéticos de estos organismos (Hellberg *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2003).

Los genes del ADN mitocondrial (ADNmt) animal se han utilizado para diversos estudios filogenéticos debido a que tienden a acumular más rápido cambios en las secuencias nucleotídicas en comparación con el ADN nuclear (ADNn). Además, el ADNmt es matrilineal y no presenta recombinación. Sin embargo, en los cnidarios el ADNmt evoluciona mucho más lento que en la mayoría de los metazoarios, lo cual ha limitado su utilidad para realizar estudios de genética poblacional en este grupo. Existen algunas regiones no codificantes del ADNmt, como el intrón *Nad5* (Figura 1A), que en algunas especies coralinas ha presentado una alta tasa mutacional y la suficiente variación nucleotídica para realizar estudios de genética poblacional intraespecífica (Brown *et al.*, 1979; Shearer *et al.*, 2002; Flot y Tillier, 2007; Concepcion *et al.*, 2006).

A pesar de que en los animales el ADNn tiene una tasa evolutiva menor que el ADNmt, en algunas especies coralinas se han encontrado genes nucleares que presentan regiones con la suficiente variabilidad nucleotídica para realizar estudios de genética poblacional. Tal es el caso de la región no codificadora del gen nuclear de la β -tubulina (β -tub) (Figura 1B), donde se ha encontrado un polimorfismo en algunas especies de corales hermatípicos (López y Knowlton, 1997; Fukami *et al.*, 2004).

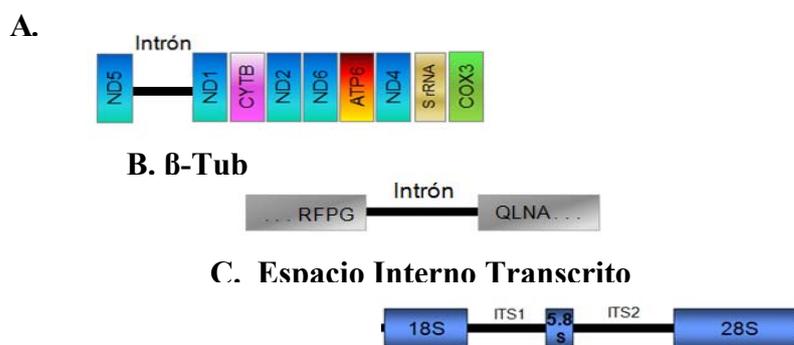


Figura 1. Estructura de las regiones de los genes utilizados en este estudio. Intrón *Nad5* del ADNmt (A), intrón β -Tub del ADNn (B) y regiones ITS1 e ITS2 del ADNr (C). Los rectángulos de colores denotan las regiones codificantes. Las barras negras indican las regiones no codificantes que fueron analizadas.

Uno de los genes que se ha utilizado con mayor frecuencia para obtener información sobre la diversidad genética intraespecífica y las diferencias interespecíficas en los corales hermatípicos, es la región espaciadora interna transcrita ribosomal (ITS). La región ITS1-ITS2 (Figura 1C) tiene un alto grado de variación nucleotídica comparado con otras regiones del ADN ribosomal (ADNr), además, debido a que presenta cientos de copias por genoma, ésta es una región fácil de amplificar (White *et al.*, 1990).

Para poder determinar las diferencias existentes en la diversidad genética entre una población y otra, los datos obtenidos a partir de marcadores moleculares deben ser interpretados utilizando modelos de genética poblacional. Estos modelos hacen supuestos sobre la herencia y el equilibrio entre deriva génica, migración y mutación. De esta manera, los patrones geográficos de variación genética se pueden utilizar para inferir procesos ecológicos relacionados con la conectividad demográfica de los organismos.

I.3.2. Conectividad demográfica

La conectividad demográfica es el flujo de organismos entre distintas zonas geográficas, la cual no sólo involucra la migración de los organismos, sino también la supervivencia, el crecimiento y la reproducción de éstos. Para entender los patrones de este flujo es importante conocer factores como la demografía, la oceanografía y la filogeografía. A través de modelos de diferenciación genética y geográfica se puede inferir si una población es cerrada o abierta (Hedrick, 2000; Hellberg *et al.*, 2002; Ayre y Hughes, 2004).

De acuerdo a Hellberg y colaboradores (2002), existen diferentes escenarios de los patrones de diferenciación geográfica y genética de acuerdo al flujo genético o magnitud de la tasa de migración por generación (m) y del tamaño efectivo poblacional (N_e) (Figura 2). Teniendo que las poblaciones pueden ser completamente cerradas cuando $N_e m$ es bajo. Es decir, cuando en poblaciones pequeñas se presenta algún tipo de barrera que no permite el flujo genético, estas poblaciones serán afectadas principalmente por la deriva genética (proceso estocástico que cambia las frecuencias alélicas en una población) dando lugar a una diferenciación genética entre las distintas poblaciones (estructura genética). Por otra parte, las poblaciones pueden ser

completamente abiertas cuando en poblaciones grandes se presentan altos niveles de flujo genético ($N_e m$ es alto) permitiendo que distintas regiones geográficas sean genéticamente homogéneas (población panmíctica)

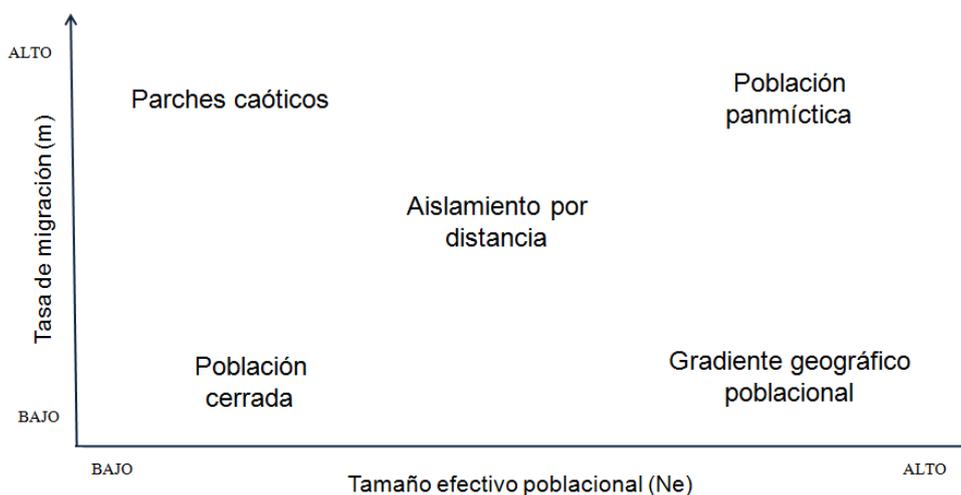


Figura 2. Patrones de diferenciación geográfica y genética de acuerdo a la magnitud de la tasa de migración por generación (m) y del tamaño efectivo poblacional (N_e). Tomado de Hellberg *et al.*, 2002.

Además de las poblaciones cerradas y abiertas, existen tres escenarios intermedios. Uno es el gradiente geográfico, donde debido a que el tamaño efectivo poblacional es alto las poblaciones no se ven afectadas por la deriva genética, sin embargo, las bajas tasas de migración permiten que la selección natural establezca un gradiente genético a lo largo de un gradiente ambiental. Otro escenario intermedio son los parches caóticos, en donde poblaciones pequeñas presentan altas tasas de migración generando que la mayor diferenciación genética se observe dentro de las poblaciones (diferencias entre generaciones). Finalmente, el aislamiento por distancia es un escenario intermedio donde las poblaciones pueden mostrar similitudes genéticas graduales. En este caso, el flujo genético se da en función de la distancia geográfica de tal manera que las poblaciones más lejanas son las más diferenciadas genéticamente (Figura 2).

A través de estos modelos se pueden desarrollar estrategias de conservación mediante la detección de áreas de interés prioritario, teniendo que poblaciones aisladas

con baja diversidad y flujo genético (población cerrada) podrían ser más vulnerables a cambios ambientales.

En el caso de organismos sésiles como los corales, el flujo larvario (plánulas) representa el principal medio a través del cual se da la conectividad demográfica que media el intercambio de organismos y de genes entre las poblaciones. Existen diversos factores físicos y biológicos que influyen en la dispersión larvaria como las características ambientales-locales del océano, la sincronización en la expulsión de gametos y la capacidad de fases larvarias para sobrevivir y alcanzar sitios de asentamiento. Si las condiciones son favorables para la dispersión de fases planctónicas, los individuos de una región se mezclarán genéticamente con los de otras regiones, formando una sola población. Por el contrario, si las condiciones no son favorables e impiden la dispersión, se pueden llegar a formar barreras que generarán las condiciones apropiadas para el aislamiento reproductivo entre poblaciones y por lo tanto diferenciación genética (Harrison y Wallace, 1990; Gay y Andrews, 1994; Palumbi, 1997; Yu *et al.*, 1999; Dai *et al.*, 2000; Magalon *et al.*, 2005).

1.3.3. Biología reproductiva de los corales hermatípicos

Debido a que en los corales el flujo larvario representa el principal medio a través del cual se da la conectividad demográfica, la biología reproductiva de estos organismos es un factor clave en el entendimiento de este proceso. Los corales hermatípicos presentan diversos modos de reproducción que pueden cambiar en respuesta a cambios temporales en su ambiente. Estos organismos pueden reproducirse sexual o asexualmente. Asexualmente se reproducen por gemación o fragmentación, lo cual representa un proceso selectivamente favorable para el desarrollo de nuevas colonias en ambientes estables, ya que es rápido y presenta bajas tasas de mortalidad. En este tipo de reproducción el reclutamiento es local (Hughes *et al.*, 1992; Fautin, 2002).

La reproducción sexual involucra distintas etapas como: gametogénesis, desove, fertilización, fecundación, formación de plánulas y asentamiento larvario. Estas etapas están controladas por factores intrínsecos y extrínsecos (Medina-Rosas, 2000; Waller y Tyler, 2005). La mayoría de las especies de coral presentan gónadas de ambos sexos dentro del mismo pólipo (hermafroditas), sin embargo, también existen especies que

presentan sexos separados (gonocóricas). Por otra parte, la fertilización puede realizarse de manera interna (retención de óvulos que son fertilizados internamente) o de manera externa (expulsión de gametos que son fertilizados en el mar). Varios días después de la fecundación se forma una larva conocida como la plánula, ésta puede dispersarse en el plancton y posteriormente fijarse al sustrato marino para formar una colonia. La dispersión de plánulas representa una ventaja para el intercambio y flujo genético entre las poblaciones (Harrison y Wallace, 1990; Richmond y Hunter, 1990; Carlon, 1999).

II. Antecedentes

II.1. *Pocillopora verrucosa*

Pocillopora verrucosa es un coral hermatípico que se localiza principalmente en las regiones coralinas del Océano Índico, Pacífico y Mar Rojo, en aguas someras no muy expuestas, en un rango de temperatura de 22 a 32°C y a profundidades de 0 hasta 25 metros. Los pólipos de este coral se encuentran inmersos entre cálices de protuberancias rugosas (verrucae) que forman grupos firmes y compactos. Estos pólipos forman pequeñas colonias, de no más de quince centímetros de tamaño, con finas ramas que presentan varias divisiones menores, que le dan un aspecto arborescente y rugoso. La coloración de esta especie suele ser marrón o crema, aunque pueden llegar a observarse algunos ejemplares morados o rosas (Figura 3) (Wilson, 1988; Veron, 2000).

La clasificación taxonómica de este coral hermatípico es la siguiente:

Phylum: Cnidaria

Clase: Anthozoa

Orden: Scleractinia

Familia: Pocilloporidae

Género: *Pocillopora*

Especie: *verrucosa*



Figura 3. Coral hermatípico *Pocillopora verrucosa* (Fotos: Luis E. Calderón-Aguilera).

En el Golfo de California y en toda la costa americana occidental *P. verrucosa* es una de las especies dominantes y es considerada uno de los principales constructores de arrecifes (Wilson, 1988; Veron, 2000).

Se ha podido observar que los modos reproductivos de *Pocillopora* varían según la posición geográfica. En el Pacífico central y occidental la mayoría de especies de *Pocillopora* son organismos hermafroditas con desarrollo simultáneo de gametos masculinos y femeninos y fecundación interna. En el Mar Rojo y el Pacífico oriental se ha observado que la fecundación y el desarrollo larvario ocurren en la columna de agua. Sin embargo, en algunos sitios del Pacífico central y oriental se ha reportado que el modo reproductivo dominante de *Pocillopora* es asexual, ya que casi no se observa producción de plánulas (Wilson, 1988; Glynn *et al.* 1991; Sier y Olive, 1994; Veron, 2000).

II.2. Reproducción y genética poblacional de *Pocillopora* spp.

Trabajos realizados sobre la biología reproductiva de una especie de *Pocillopora* en el Pacífico mexicano sugieren que posiblemente la reproducción sexual de estos organismos no sea exitosa en esta región, ya que no se ha podido observar la producción de plánulas. Vizcaíno-Ochoa (2003) analizó los modos reproductivos de tres especies de corales en Bahía de Banderas, encontrando que *P. damicornis* es una especie hermafrodita. Esta especie fue la primera en presentar formación de gametos (relacionada con el aumento de temperatura), pero fueron reabsorbidos posteriormente, hecho al que atribuyó la ausencia de embriones y plánulas. Rodríguez-Troncoso (2004) encontró que en el arrecife La Entrega en Oaxaca, *P. damicornis* no presentó indicios de desarrollo gonádico y no hubo evidencias de reproducción sexual, por lo cual sugiere que en esa zona el modo reproductivo de esta especie es por fragmentación. Chávez-Romo (2004) menciona que *P. damicornis* se manifestó como un organismo hermafrodita con desarrollo simultáneo de gametos masculinos y femeninos en Bahía de La Paz, B.C.S. Asimismo, menciona que se detectaron cuatro estadios de desarrollo para ovocitos y espermatozoides, presentándose gametos maduros por un periodo de cinco meses. A pesar de esto, en esta zona tampoco se observó la producción de plánulas.

Se han realizado algunos estudios sobre la genética poblacional de especies del género *Pocillopora* que muestran la existencia de una estructura poblacional en ciertos arrecifes. Stoddart (1984) encontró diferenciación genética entre 25 colonias de *P. damicornis* en las costas del suroeste de Australia (separados por una distancia

aproximadamente de hasta 400km) utilizando electroforesis de aloenzimas. Este autor sugirió que la diferenciación observada entre las poblaciones de *P. damicornis* fue resultado de un tamaño poblacional efectivo pequeño debido al reclutamiento local ocasionado por reproducción asexual. Asimismo, Benzie y colaboradores (1995) encontraron diferencias genéticas significativas entre poblaciones de *P. damicornis* en tres hábitats en la Isla One Tree al sur de la Gran Barrera Arrecifal Australiana. Ellos encontraron un alto grado de reproducción sexual en las poblaciones de *P. damicornis*, lo cual no concordaba con el modo dominante de reproducción reportado para esta especie en esa región. También, determinaron un flujo genético considerable atribuido a las corrientes locales, sugiriendo que las diferencias genéticas son el resultado de la selección natural en los diferentes ambientes dentro de estos sistemas arrecifales.

Por otra parte en la zona oriental de la Gran Barrera Arrecifal, Ayre y Hughes (2004) encontraron que en las localidades más aisladas, las colonias de cinco especies de corales hermatípicos (*P. damicornis*, *Acropora cuneata*, *A. valida*, *Seriatopora hystrix* y *Styllophora pistillata*) se encontraron genéticamente diferenciadas del resto.

Adjeroud y Tsuchiya (1999) encontraron diferencias genéticas significativas al examinar la variación en la composición genética de seis poblaciones de *P. damicornis* en cuatro islas separadas por aproximadamente 650 km en el Archipiélago de Ryukyu al sur de Japón. Asimismo, reportaron un flujo genético relativamente moderado de acuerdo a las características de las etapas larvarias y a los patrones de circulación de la región (corriente de Kuroshio y otras corrientes más localizadas). A través de desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg infirieron que la reproducción asexual era el principal modo reproductivo en el mantenimiento y establecimiento de las poblaciones.

Magalon y colaboradores (2005) encontraron que la variación genética dentro de siete poblaciones de *P. meandrina* reflejaron un déficit de heterocigosis (utilizando cuatro loci microsatelitales) en poblaciones de Polinesia, en el Pacífico sur, separadas por distancias entre 200 y 2000 km. Asimismo, encontraron que los patrones de diferenciación genética no correspondían a los patrones de corrientes oceanográficas de las poblaciones muestreadas, teniendo una mayor diferenciación a escala local que a gran escala.

Ridgway y colaboradores (2001) no encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de *P. verrucosa* en seis arrecifes coralinos (separados por aproximadamente 200 km) al sureste de África (a través de electroforesis de aloenzimas), concluyendo que en esos arrecifes se mantienen altos niveles de dispersión larvaria y reclutamiento a largas distancias evitando así cualquier diferenciación geográfica, por lo que los sistemas arrecifales de esta zona se pueden considerar como una sola población genéticamente homogénea (panmíctica). A través de desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg infirieron que la reproducción sexual es el modo reproductivo de mayor importancia para mantener estas poblaciones.

II.3. Genética poblacional de especies coralinas en el Pacífico mexicano

En la actualidad sólo existen tres trabajos sobre la conectividad demográfica de tres especies de corales hermatípicos en las comunidades arrecifales del Pacífico mexicano. Saavedra-Sotelo (2007) encontró que *Pavona gigantea* presentó estructura genética en cuatro comunidades arrecifales del Pacífico mexicano, la cual atribuyó a bajos niveles de conectividad demográfica (utilizando marcadores de ADNn y ADNmt). Asimismo, menciona que los niveles de flujo genético encontrados entre las localidades fueron influenciados por la hidrodinámica variable del Pacífico tropical y nororiental, lo que hizo poco evidente la relación entre la estructura genética y los patrones de circulación oceánica.

Por otra parte, Chávez-Romo y colaboradores (2008) reportaron estructura genética de *Pocillopora damicornis* en 6 comunidades arrecifales en el Pacífico mexicano (utilizando cuatro sistemas enzimáticos). Estos autores mencionan que la variación genética fue similar a lo largo del Pacífico mexicano, presentándose un déficit de heterocigotos en la mayoría de las poblaciones. Esto lo asociaron principalmente al modo de reproducción predominante (fragmentación) y a los patrones de corrientes en esta región.

Paz-García (2009) encontró que la mayoría de las poblaciones del coral *Porites panamensis* presentaron una deficiencia de heterocigotos en tres áreas de desarrollo coralino del Pacífico mexicano (utilizando cuatro sistemas enzimáticos). Asimismo, observó una ligera estructuración genética en las poblaciones que se encuentran dentro del Golfo de California y una estructuración de moderada a alta en las poblaciones que

se encuentran en la entrada del Golfo de California y sur del Pacífico mexicano. Finalmente, menciona que los patrones de circulación oceánica pueden en gran medida estar generando la composición genética en grupos y la estructuración genética observada en las poblaciones de *P. panamensis*.

III. Justificación

Como se mencionó anteriormente, los arrecifes de coral son uno de los ecosistemas con mayor diversidad en el mundo y son sistemas altamente productivos, por esta razón tienen una gran importancia ecológica, tanto a escala local como regional. Por otra parte, los arrecifes son sistemas importantes económicamente ya que son el hábitat de muchas especies de valor comercial, por lo cual, los arrecifes también representan un recurso pesquero de gran valor económico. Sin embargo, en las últimas décadas, diversos factores antropogénicos y eventos climáticos naturales han deteriorado considerablemente los arrecifes coralinos. La capacidad de adaptación y supervivencia de los corales ante cambios ambientales depende de diversos factores tales como su reproducción, tamaños poblacionales, niveles de conectividad y de variabilidad genética.

El profundizar en estudios genéticos y conocer los niveles de diversidad genética y el grado de conectividad demográfica existente entre poblaciones es de gran importancia para contribuir en el conocimiento de: 1) la historia evolutiva de los corales, 2) la historia de vida de las especies, 3) las conexiones demográficas actuales e históricas entre poblaciones coralinas, 4) los cambios genéticos debidos a presiones ambientales y 5) la dinámica poblacional de los sistemas arrecifales. Con estos conocimientos se podrá determinar la capacidad de tolerancia y plasticidad de las especies coralinas a perturbaciones naturales y antropogénicas a las que se encuentran sujetos actualmente, con el propósito de establecer estrategias de manejo adecuadas para cada sistema arrecifal. No obstante, actualmente existen muy pocos trabajos sobre los patrones de conectividad demográfica entre las poblaciones coralinas, lo cual resulta una limitante para poder conocer las condiciones de vulnerabilidad y susceptibilidad de los corales hermatípicos ante cambios ambientales.

Dentro de los corales hermatípicos, *Pocillopora verrucosa* es una de las especies dominantes y se considera uno de los principales constructores de arrecifes en las costas del Pacífico mexicano. Por esta razón, el conocer los niveles de diversidad y flujo genético de especies clave como *P. verrucosa* representa un elemento básico para entender los patrones de conectividad demográfica de los corales en la región y para poder predecir la vulnerabilidad de los sistemas arrecifales ante cambios ambientales.

Este trabajo se enmarca dentro del proyecto “Vulnerabilidad de los arrecifes coralinos de las costas mexicanas por efecto del cambio global y posibles consecuencias socioambientales” (Fondo Sectorial CONACYT –SEMARNAT–INE Ref. 023390), cuyo objetivo general es estimar los posibles efectos que tendrían el incremento en la temperatura superficial del mar y de la presión parcial atmosférica de bióxido de carbono sobre los arrecifes coralinos de las costas mexicanas del Pacífico, como consecuencia del cambio global. Básicamente trata de identificar los factores físico, biológicos y sociales que determinan la vulnerabilidad de los arrecifes coralinos, así como las consecuencias socioambientales que tendría la degradación de estos ecosistemas (SEMARNAT-CONACYT, 2006).

IV. Hipótesis

La hipótesis nula de esta investigación es que el coral hermatípico *Pocillopora verrucosa* forma una población homogénea genéticamente (población panmíctica) a lo largo del Pacífico mexicano.

V. Objetivos

V.1. Objetivo general

Estimar los niveles de diversidad y de flujo genético del coral hermatípico *Pocillopora verrucosa* en el Pacífico mexicano.

V.2. Objetivos específicos

- 1) Evaluar el grado de polimorfismo de tres loci en *P. verrucosa*.
- 2) Estimar la diversidad genética de *P. verrucosa* en las localidades de estudio.
- 3) Cuantificar la estructura poblacional que presenta esta especie en el Pacífico mexicano.
- 4) Estimar los niveles y la dirección del flujo genético de estos organismos en el Pacífico mexicano.
- 5) Evaluar los patrones filogenéticos y filogeográficos.
- 6) Evaluar la demografía histórica que presenta *P. verrucosa* en el Pacífico mexicano.

VI. Metodología

VI.1. Área de estudio

Para realizar la presente investigación se utilizaron muestras provenientes de ocho sistemas arrecifales localizados en la costa del Pacífico Mexicano (Figura 4). Esta zona del Pacífico presenta una hidrodinámica que está fuertemente influenciada por la topografía del continente, teniendo corrientes débiles como la del Este de México (CEM) que va del norte de Oaxaca hasta la boca del Golfo de California y la Corriente de Costa Rica (CCR) proveniente del domo de Costa Rica con dirección Sur-Norte. Por otra parte, esta zona también es influenciada por la Corriente de California (CC) proveniente de Alaska, y por el giro anticiclónico o cuenca de Tehuantepec (CT). Asimismo, existen diferencias estacionales en la circulación de las aguas en la entrada del Golfo de California (Figura 4) (Álvarez-Borrego, 2002; Kessler, 2006).

VI.2. Colecta de muestras

Se colectaron muestras de 30 colonias (separadas por 3 a 5 metros como mínimo entre cada una de ellas) de *Pocillopora verrucosa* de las ocho localidades (Figura 4). Por medio de buceo SCUBA, con ayuda de un cincel y un martillo se obtuvieron aproximadamente 5 cm² de tejido coralino en cada colonia. Los tejidos se preservaron colocándolos en frascos de plástico individuales a temperatura ambiente con una solución salina (DMSO al 20%, NaCl saturado y EDTA 250 mM pH 8), para ser transportados al laboratorio de Ecología Molecular del Departamento de Oceanografía Biológica del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada.

VI.3. Análisis genéticos

VI.3.1. Extracción de ADN

Para realizar la extracción y purificación de ADN se utilizó el protocolo de bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB, Doyle y Doyle, 1987), colocando en tubos de microcentrífuga 300 µl de amortiguador de extracción CTAB, 5 µl de proteinasa K (10 µg/ml) y aproximadamente 100 mg de tejido del coral (extrayendo con una aguja de

disección y una navaja el tejido de los coralites). Una vez purificado el ADN, el botón/precipitado formado se resuspendió en 100 μ l de TE pH 8.0 (frío).

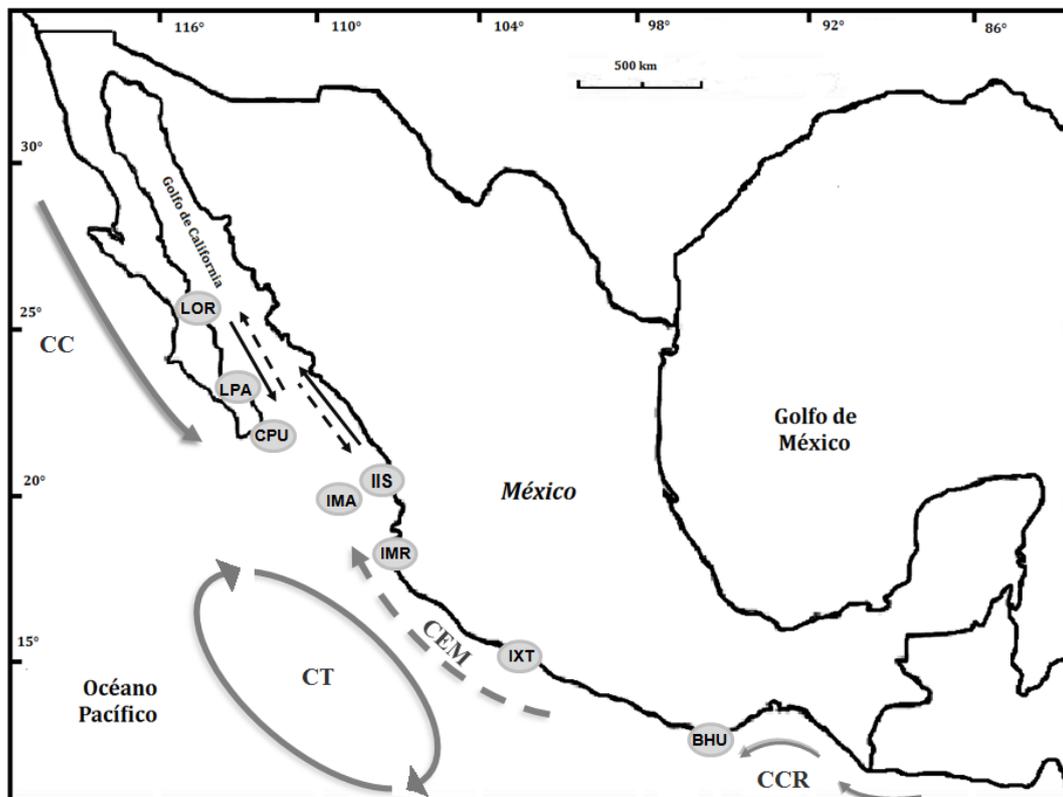


Figura 4. Localidades de muestreo: (LOR) Loreto, (LPA) La Paz y (CPU) Cabo Pulmo, Baja California Sur; (IIS) Isla Isabel, (IMA) Islas Marías e (IMR) Islas Marietas, Nayarit; (IXT) Ixtapa Zihuatanejo, Guerrero; (BHU) Bahías de Huatulco, Oaxaca. Patrones generales de corrientes superficiales del Pacífico mexicano: (CC) Corriente de California, (CT) Corriente o giro de Tehuantepec, (CEM) Corriente del Este de México, (CCR) Corriente de Costa Rica, (—>) circulación en invierno y (--->) circulación en verano en la entrada del Golfo de California (Álvarez-Borrego, 2002; Kessler, 2006).

La presencia e integridad de ADN se verificaron mediante geles al 1.5% de agarosa con bromuro de etidio (0.5 μ g/ μ l) y solución amortiguadora Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X, utilizando TBE 0.5X como amortiguador de corrimiento. Los geles se corrieron a 100 volts durante 45 min y posteriormente se observaron en un trasiluminador (marca UVP). Para evitar la degradación del ADN extraído, éste se mantuvo a -20°C.

VI.3.2. Amplificación

Para cumplir con los objetivos propuestos en esta investigación, se probó la amplificación de los siguientes loci: (A) la región que comprende a los genes ITS1-5.8S-ITS2 del ADN ribosomal, (B) un intrón del ADNmt que se encuentra entre los genes NAD5 y NAD1, y (C) una parte de la región del intrón y exón de un gen nuclear β -tubulina (Tabla I). Las amplificaciones se realizaron por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un termociclador Bio-RAD (DNA Engine[®]).

Tabla I. Cebadores utilizados para amplificar los loci del ITS1-5.8S-ITS2 (A), del intrón *Nad5* (B) y del intrón y exón de β -tubulina (C) de *Pocillopora verrucosa*.

Cebadores		Secuencia de los oligos (5' → 3')	Tamaño del fragmento (pb)	Referencia
A	<i>ITS3</i>	Sentido	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC	White <i>et al.</i> , 1990
	<i>ITS2</i>	Antisentido	GCTGCGTTCTTCATCGATGC	
	<i>ITS5</i>	Sentido	GAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
	<i>ITS4</i>	Antisentido	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
B	<i>NAD5_316F</i>	Sentido	GGGGAYCCTCATRTKCCTCG	Concepción <i>et al.</i> , 2006.
	<i>NAD1_445R</i>	Antisentido	ARCCCAATCGAAACYTCATAACT	
C	<i>BetaTub F</i>	Sentido	GCATGGGAACGCTCCTTATTT	Fukami <i>et al.</i> , 2004.
	<i>BetaTub R</i>	Antisentido	ACATCTGTTGAGTGAGTTCTG	

Cada reacción de PCR (25 μ l de volumen final) incluyó 9 μ l de dNTPs (0.5mM cada uno), 2.5 μ l de 10X PCR buffer (Tris HCl 100 mM, KCl 500 mM y MgCl₂ 15 y 20 mM), 1 μ l de cada oligo (10 μ M), 0.2 μ l de taq DNApol (5U/ μ l) y 2 μ l de ADN genómico diluido a 1:10 ó 1:100 con TE. Los perfiles de termociclado utilizados fueron los siguientes. Para la región ITS1-5.8S-ITS2: 1 x 94°C (1 min), 35 x [1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 2 min a 72°C], 1 x [1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 10 min a 72°C] y 1 x 72°C (5 min). Para el intrón *Nad5*: 1 x 95°C (2 min), 35 x [30 seg a 95°C, 45 seg a 55°C, 1 min a 72°C] y 1 x 72°C (10 min). Para el locus β -tubulina: 1 x 94°C (2 min), 30 x [45 seg a 94°C, 45 seg a 45°C, 1.5 min a 72°C] y 1 x 72°C (5 min).

Para verificar la cantidad y calidad de producto de PCR se corrieron geles al 1.5% de agarosa con bromuro de etidio (0.5 μ g/ μ l) incluyendo en uno de los carriles una escalera de alto peso molecular para corroborar el tamaño de los productos de PCR. Los

geles se corrieron a 100 volts durante 45 min y posteriormente se observaron en un trasiluminador.

VI.3.3. Purificación y secuenciación

De los tres loci empleados en este estudio, sólo la segunda región interna transcrita del ADN ribosomal (ITS2) y el intrón *Nad5* del ADNmt fueron genotipificados debido a su mayor porcentaje de éxito en las amplificaciones. Los productos de PCR se purificaron siguiendo el protocolo de exoSAP-IT®. Este producto contiene dos enzimas hidrolíticas: la exonucleasa y la fosfatasa alcalina de camarón. La primera enzima rompe los enlaces fosfodiéster del ADN de una sola hebra. La segunda enzima elimina los grupos fosfato de los dNTP's. La proporción empleada fue de 1 µl de exoSAP-IT por cada 2.5 µl de producto de PCR. Las reacciones se incubaron a 37°C por 15 min, y posteriormente a 80°C por 15 min para desactivar las enzimas.

Una vez purificado el producto de PCR se realizaron reacciones de secuenciación para una sola de las hebras, utilizando los cebadores *ITS3* y *NADI_445R*. Las reacciones con un volumen final de 12µl contenían: 4µl de producto purificado, 3µl de cebador 1 µM, 2.0µl de BigDye™ v3.1 y 3.5 µl de agua destilada estéril. Estas reacciones se sometieron al siguiente perfil de termociclado: 1 x 94°C (1 min), 25 x [10 seg a 94°C, 10 seg a 50°C, 4 min a 60°C]. Los productos fueron secuenciados automáticamente con un secuenciador ABI 377 (Applied Biosystems Inc, California).

VI.4. Análisis de datos

VI.4.1. Edición y alineamiento de secuencias

Se editaron las secuencias nucleotídicas de cada hebra de ADN utilizando el programa Codon Code Aligner v 2.0.6. Una vez editadas, las secuencias se alinearon (Clustal W) y se identificaron los sitios conservados, variables e informativos con el programa MEGA v 4.0.

VI.4.2. Estimación de la diversidad genética

Se obtuvo una lista de haplotipos totales y por localidad utilizando el programa Dna SP v 4.0 (Rozas *et al.*, 2003). La diversidad haplotípica y nucleotídica se calculó para cada localidad, utilizando el programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.* 2006). Para

evaluar la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean diferentes, se estimó el índice de diversidad haplotípica (ecuación 1) (Nei, 1987).

$$h = \frac{n}{n-1} \left(\sum_{i=1}^k p_i^2 \right) \quad (1)$$

Donde h es la diversidad haplotípica, n es el tamaño de muestra, k es el número de haplotipos encontrados y p_i es la frecuencia del i -ésimo haplotipo de la muestra.

Para estimar la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos tomados al azar sean diferentes se utilizó el índice de diversidad nucleotídica (ecuación 2) (Nei, 1987).

$$\pi = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k p_i p_j d_{ij}}{L} \quad (2)$$

Donde π es la diversidad nucleotídica, p es la frecuencia de cada uno de los nucleótidos, d es la distancia genética entre nucleótidos, i y j son comparados y L es el número de nucleótidos (longitud de la secuencia).

VI.4.3. Estimación de la estructura genética

Para estimar el nivel de estructura genética se realizó un Análisis de Variancia Molecular (AMOVA) probando la hipótesis nula de panmixia (ausencia de estructura genética). Para esto se utilizó el índice de fijación (F_{ST} , Wright, 1951) y el parámetro Φ_{ST} , ambos cuantifican la pérdida de diversidad debido a la ausencia de apareamiento al azar en la población en su conjunto, sólo que el Φ_{ST} incorpora las distancias euclidianas interhaplotípicas como componente de varianza. Para obtener la matriz de distancias interhaplotípicas se calculó el mejor modelo evolutivo con el programa Model test v 3.7 (Posada y Crandall, 1998) y posteriormente se obtuvo la matriz con el programa PAUP 4b10 (Swofford, 1998). El F_{ST} y Φ_{ST} pueden tomar valores de 0 a 1, teniendo que un valor de 0 indica que las frecuencias alélicas son idénticas entre muestras. Valores estadísticamente diferentes de 0 sugieren la presencia de subdivisión poblacional y el valor de 1 indica que cada muestra se ha fijado a una variante alélica distinta. Para calcular la significancia de estos valores se utilizó el método no paramétrico de permutaciones utilizando el programa Arlequín v3.1 (Excoffier *et al.* 2006).

Se realizaron comparaciones pareadas de los valores de Φ_{ST} para estimar las diferencias entre las distintas localidades arrecifales del Pacífico mexicano. Para reducir la posibilidad de cometer errores del tipo I se realizó la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

VI.4.4. Flujo genético

El número de migrantes efectivos por generación (flujo genético Nm) entre las localidades se estimó a partir de la formula descrita por Nei (1987)

$$Nm = \left(\frac{1 - F_{ST}}{2F_{ST}} \right) \quad (3)$$

Donde Nm es el número efectivo de migrantes entre poblaciones por generación. En lugar del F_{ST} , se utilizaron los valores de Φ_{ST} .

Asimismo, con el programa Migrate v 2.0 (Beerli, 2004) se estimaron los valores de Nm y N_e (tamaño efectivo poblacional) utilizando verosimilitud máxima mediante simulaciones de Cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC), para las cuales se utilizaron las secuencias de cada localidad. Con este método se estiman las tasas de migración asimétrica entre poblaciones utilizando la teoría de coalescencia, considerando las mutaciones históricas, genealogía y los distintos tamaños de las subpoblaciones. Para el análisis de MCMC se utilizó una serie de 10 cadenas cortas (5, 000 árboles calculados) y 3 cadenas largas (50, 000 árboles calculados), los 10, 000 primeros árboles fueron ignorados. Se realizaron 12 simulaciones para evaluar la consistencia de los resultados.

VI.4.5. Aislamiento por distancia

Utilizando el programa Isolation by Distance IBD 1.52 (Bohonak, 2002) se calcularon los valores pareados del índice de fijación (F_{st}) entre localidades y se correlacionaron con las distancias geográficas entre localidades, para poder determinar si la distancia geográfica juega un papel determinante en el aislamiento reproductivo entre poblaciones.

VI.4.6. Relaciones filogenéticas entre haplotipos

Para evaluar las relaciones filogenéticas entre los haplotipos encontrados en el locus del ADNr y en los del ADNmt, se construyeron árboles filogenéticos aplicando el método de distancia Neighbor Joining utilizando el programa MEGA v 4.0 (Kumar *et al.*, 2004). Se implementaron 1000 replicas de bootstrapping no paramétrico para evaluar la solidez de la topología.

Para calcular las matrices de distancia de los análisis filogenéticos se calculó, mediante verosimilitud máxima, el mejor modelo evolutivo de un total de 56 modelos con el programa Model test v 3.7 (Posada y Crandall, 1998). Posteriormente, se calculó la matriz de distancias interhaplotípicas del modelo con el mejor ajuste con el programa PAUP 4b10 (Swofford, 1998). Para enraizar el árbol se utilizaron secuencias de especies congénicas.

Para el caso del locus del ADNr, también se realizó un árbol mediante el método de máxima parsimonia, para el cual se calculó un árbol consenso de todos los árboles de mayor parsimonia con el programa PAUP v 4.0 (Swofford, 1998).

VI.4.7. Demografía histórica

Con base en las distancias génicas entre los individuos y suponiendo cierta tasa evolutiva se pueden inferir aspectos de la historia demográfica de las poblaciones, a través de estimados provisionales de tiempo absoluto de coancestría (tiempo en que dos secuencias convergen en la secuencia que les dio origen). A partir de estos estimados se pueden formar histogramas de frecuencia de la distribución de diferencias interhaplotípicas entre pares de haplotipos (distribuciones de *mismatch*) (Slatkin y Hudson, 1991). Este análisis permite detectar el efecto genético de eventos de colonización o cuello de botella ocurridos en el pasado, lo cual es posible porque los eventos de crecimiento y disminución del tamaño poblacional dejan señales en la distribución de distancias que se ven reflejadas en la forma de la distribución (Rogers y Harpending, 1992; Rogers, 1995). De manera general, las poblaciones que han permanecido en equilibrio demográfico estable por mucho tiempo presentan distribuciones de *mismatch* multimodales y disperejas, mientras que aquellas que han sufrido expansiones repentinas o cuellos de botella presentan distribuciones suaves y unimodales (Harpending, 1994).

Para este trabajo se realizó un análisis de distribución de *mismatch* con el propósito de conocer aspectos sobre la demografía histórica de las poblaciones de *P. verrucosa* del Pacífico mexicano. Para este análisis, se construyó la distribución de diferencias interhaplotípicas para cada localidad y se calcularon los parámetros del modelo de expansión repentina de Rogers y Harpending (1992), partiendo de la hipótesis nula de la existencia de un evento de expansión. Para esto se utilizó el programa Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2006), con el que también se probó la bondad de ajuste del modelo utilizando el método de mínimos cuadrados.

VII. Resultados

VII.1. Muestreo

Se obtuvieron un total de 304 muestras de colonias de *Pocillopora verrucosa* provenientes de las ocho localidades muestreadas en el Pacífico mexicano (Tabla II). En las Islas Marías fue donde se obtuvo el menor tamaño de muestra ($n=19$), mientras que en Bahías de Huatulco el mayor ($n=62$). El tamaño de muestra (n) obtenido por localidad estuvo determinado principalmente por las condiciones y limitaciones durante el muestreo. La extensión de las comunidades coralinas no fue un factor que influyera en el n obtenido, ya que de acuerdo a registros de las características de los arrecifes del Pacífico mexicano, Cabo Pulmo es la localidad que presenta la mayor extensión mientras que Loreto la menor, lo cual no concuerda con el n obtenido en este trabajo (Reyes-Bonilla *et al.*, 2005; Calderón-Aguilera *et al.*, 2009).

Es importante destacar que en Bahías de Huatulco, Ixtapa Zihuatanejo, Isla Isabel y Cabo Pulmo se realizó la colecta de especímenes en tres sitios separados por una distancia de 2 a 6 km aproximadamente, lo cual es un factor que disminuye la probabilidad de obtener clones de una misma colonia.

Tabla II. Tamaño de muestra (n) y fechas de colecta de *Pocillopora verrucosa* en el Pacífico mexicano.

	Localida	n	Fecha de colecta	Coordena		No. de sitios
(LOR)*	Loreto, B.C.S	41	Abril 2009	25°57'47"N	111°20'41"O	2
(LPA)*	La Paz, B. C. S.	38	Noviembre 2008	24°20'20"N	110°18'39"O	1
(CPU)*	Cabo Pulmo, B. C. S.	37	Noviembre 2008	23°24'22"N	109°24'54"O	3
(IIS)*	Isla Isabel, Nayarit	36	Junio 2008	21°50'28"N	105°52'58"O	3
(IMA)*	Islas Marías, Nayarit	19	Julio 2008	21°38'55"N	106°27'39"O	1
(IMR)*	Islas Marietas, Nayarit	21	Julio 2008	20°41'39"N	105°35'34"O	1
(IXT)*	Ixtapa , Guerrero	50	Abril 2009	17°36'80"N	101°31'53O	3
(BHU)*	Huatulco, Oaxaca	62	Diciembre 2008	15°44'43"N	96° 7'35"O	3
	Total		304			

* Estas siglas se utilizan para referirse a las localidades en el resto de las tablas y figuras.

VII.2. Extracción de ADN y genotipificación

Del total de las muestras recolectadas (304) se logró extraer y purificar ADN del 97% de ellas. En cinco de las ocho localidades se efectuó con éxito el 100% de las extracciones (La Paz, Cabo Pulmo, Isla Isabel, Islas Marías e Islas Marietas) y únicamente en tres localidades (Loreto, Ixtapa y Bahías de Huatulco) no se obtuvo el suficiente tejido para realizar la extracción de ADN de todas las muestras (Tabla III).

El éxito en la amplificación de los tres loci empleados en este estudio fue variable (Tabla III). Se obtuvo un gran porcentaje de éxito en la amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS2 en casi todas las localidades (70%). Sin embargo, debido al gran tamaño del fragmento (más de 1000 pb), se observó una pérdida de casi 200 pb en cada uno de los extremos de los ITS de las secuencias obtenidas. Por esta razón, se amplificaron por separado las regiones del ITS1 y del ITS2. Se observó que el ITS1 presentaba múltiples bandas por organismo, un menor porcentaje de amplificación en comparación con el ITS2 y la presencia de varios microsatélites (resultados no presentados). Por estas razones se optó por enfocar los esfuerzos en la región del ITS2, para el cual se presentan los resultados.

Tabla III. Número de extracciones y amplificaciones para cada locus por localidad.

Localidad	<i>n</i>	No. de extracciones	Amplificaciones exitosas por locus		
			ITS2	<i>Nad5</i>	β - Tub
LOR	41	39	30	2	-
LPA	38	38	38	7	9
CPU	37	37	37	32	27
IIS	36	36	36	26	25
IMA	19	19	19	9	8
IMR	21	21	21	10	7
IXT	50	46	39	5	8
BHU	62	59	-	2	-
Total	304	295	220	93	84

La región del ITS2 fue la que presentó el mayor éxito de amplificación (75%). Cabe mencionar que el éxito de amplificación de este locus por localidad fue alto, ya que en la mayoría de las localidades se obtuvo el 100% de las amplificaciones (La Paz, Cabo Pulmo, Isla Isabel, Islas Marías e Islas Marietas) y sólo en dos localidades un

porcentaje menor (Ixtapa, 84% y Loreto, 76%). Sin embargo, a pesar del considerable esfuerzo realizado con distintas metodologías, no se logró amplificar ninguna muestra de Bahías de Huatulco para este gen. El locus β -Tub fue el que presentó el menor éxito de amplificación de los tres loci (29%). En Loreto y en Bahías de Huatulco no se obtuvo ninguna amplificación con este gen.

Debido al bajo porcentaje de organismos amplificados con el locus β -Tub estas muestras no se secuenciaron. Con el ITS2 se obtuvieron satisfactoriamente la mayoría de las secuencias (90%), sin embargo, para el intrón *Nad5* se presentaron varias inconsistencias obteniendo únicamente el 28% de éxito (Tabla IV). El éxito de secuenciación del locus *Nad5* fue bajo debido principalmente a que en varios organismos se amplificó y secuenció el ADN de los simbiontes, lo cual se corroboró al realizar el BLAST de las secuencias que no pudieron ser alineadas con el resto de las secuencias *Nad5* de *P. verrucosa*. Asimismo, se observó la presencia de múltiples bandas por organismo, lo que indica que hay más de un haplotipo por colonia coralina, sin embargo, por razones de tiempo estos organismos no fueron analizados.

Tabla IV. Número de secuencias obtenidas para el intrón *Nad5*, para el ITS2 y porcentaje de productos de PCRs secuenciados por localidad (%_{PCS}).

Localidad	Locus			
	ITS2	% _{PCS}	<i>Nad5</i>	% _{PCS}
LOR	24	80	-	0
LPA	35	92	-	0
CPU	33	89	-	0
IIS	31	86	15	57
IMA	16	84	2	22
IMR	20	95	3	30
IXT	38	97	4	80
BHU	-	-	2	100
Total	197	90	26	28

Después de limpiar, alinear y eliminar las bases de los extremos de las secuencias consenso, se obtuvieron alineamientos múltiples con una longitud de 437 bases para el ITS2 y de 433 bases para el *Nad5* (Tabla V). El ITS2 presentó 16 sitios variables de los cuales el 59% fueron transiciones y el 41% transversiones. Asimismo, en las secuencias del ITS2 se presentó una región de repeticiones tetranucleotídicas y

dos sitios de inserción o borrado (indels) (Apéndice 1). Para el *Nad5* se encontraron 3 sitios variables de los cuales dos fueron transversiones y una transición. Para este locus se presentó un sitio con inserción o borrado.

Tabla V. Sitios variables, conservados e informativos para parsimonia en las secuencias de los loci ITS2 y *Nad5*.

Locus	Longitud de alineamiento	Sitios conservados	Sitios variables	Sitios informativos
ITS2	437	401	16	16
<i>nad5</i>	433	430	3	1

VII.3. Identificación y distribución de haplotipos

VII.3.1. ADN ribosomal (ITS2)

A partir de las 197 secuencias individuales obtenidas para el ITS2 se encontraron un total de 35 constituciones genéticas o haplotipos (H), de los cuales el 60% fueron haplotipos privados (IT-15–IT-35), es decir haplotipos que sólo se presentaron en una localidad (Tabla VI). El número de haplotipos encontrados por localidad fue variable, teniendo que Ixtapa (donde se obtuvo el mayor tamaño de muestra) presentó el mayor número de haplotipos (H=15), donde el 53% fueron privados. En Islas Marías fue donde se encontraron menos haplotipos (4) con un 25% de privados, siendo esta localidad la que presentó el menor tamaño de muestra ($n=16$) (Tabla VI y Figura 4).

Por otra parte, al comparar el número de haplotipos compartidos entre pares de localidades, se encontró que Loreto (H=11) y Cabo Pulmo (H=12) fueron las localidades que compartieron el mayor número (7). Cabe mencionar que Loreto presentó el menor porcentaje de haplotipos privados (9%).

De los 35 haplotipos, el IT-3 fue el que presentó la mayor frecuencia relativa (0.51) y fue el único haplotipo que se encontró en todas las localidades con una alta frecuencia (0.41 a 0.68). Los haplotipos IT-7 e IT-8 (frecuencia relativa= 0.07 y 0.08 respectivamente) se presentaron en casi todas las localidades, sin embargo estuvieron ausentes en dos de las localidades centrales. Los haplotipos compartidos más raros

fueron el IT-2, IT-9, IT-10, IT-12 e IT-14 (frecuencia relativa=0.010), los cuales se encontraron en localidades distintas en un organismo por localidad (Tabla VI).

Tabla VI. Frecuencias relativas de los haplotipos del ITS2 de *Pocillopora verrucosa*.

Haplotipo	Localidades							Frecuencia relativa global
	LOR n=24	LPA n=35	CPU n=33	IIS n=31	IMA n=16	IMR n=20	IXT n=38	
IT-1	0.083		0.091		0.063			0.030
IT-2	0.042		0.030					0.010
IT-3	0.417	0.514	0.455	0.613	0.688	0.550	0.474	0.518
IT-4	0.042			0.161			0.026	0.036
IT-5	0.125					0.050		0.020
IT-6	0.083		0.030	0.097				0.030
IT-7	0.042	0.171	0.121			0.050	0.053	0.071
IT-8	0.042	0.114	0.061		0.188	0.200	0.053	0.081
IT-9	0.042		0.030					0.010
IT-10	0.042	0.029						0.010
IT-11		0.057	0.030				0.026	0.020
IT-12		0.029					0.026	0.010
IT-13			0.030				0.079	0.020
IT-14				0.032		0.050		0.010
IT-15*	0.042							0.005
IT-16*		0.029						0.005
IT-17*		0.029						0.005
IT-18*		0.029						0.005
IT-19*			0.061					0.010
IT-20*			0.030					0.005
IT-21*			0.030					0.005
IT-22*				0.032				0.005
IT-23*				0.032				0.005
IT-24*				0.032				0.005
IT-25*					0.063			0.005
IT-26*						0.050		0.005
IT-27*						0.050		0.005
IT-28*							0.053	0.010
IT-29*							0.026	0.005
IT-30*							0.053	0.010
IT-31*							0.026	0.005
IT-32*							0.026	0.005
IT-33*							0.026	0.005
IT-34*							0.026	0.005
IT-35*							0.026	0.005
% haplotipos privados	9	33	25	43	25	29	53	60

* Haplotipos privados.

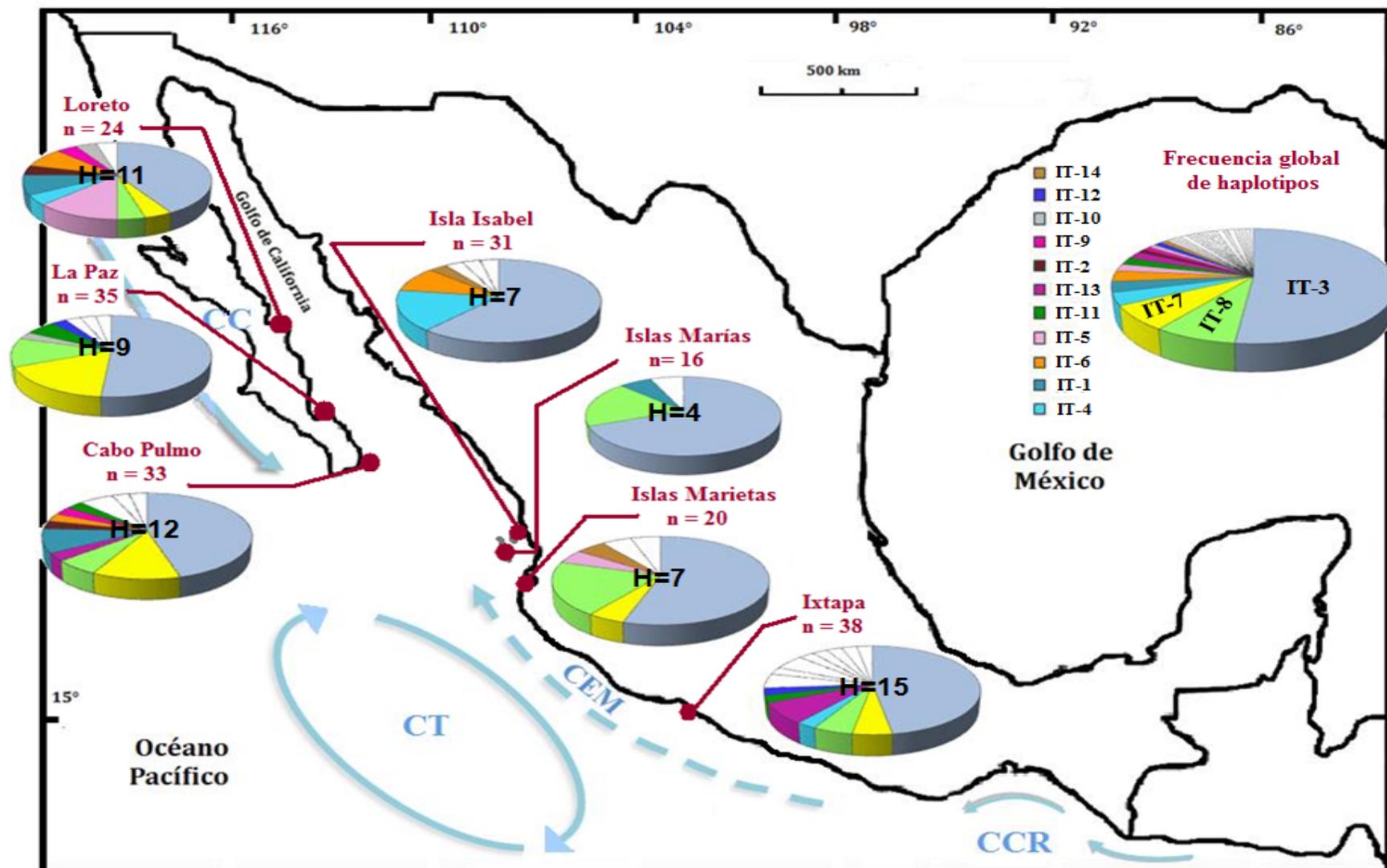


Figura 5. Gráficas circulares de la frecuencia relativa de haplotipos compartidos (colores) y privados (blanco) por localidad (H = número de haplotipos).

VII.3.2. ADN mitocondrial (intrón *Nad5*)

A pesar de que el número de secuencias obtenidas con el intrón *nad5* no son suficientes para hacer una comparación entre localidades, se obtuvo el número de haplotipos totales y por localidad para evaluar el nivel y patrón de polimorfismo de las secuencias del ADNmt. Se encontraron 5 haplotipos, de los cuales sólo uno fue compartido (NAD-1), mismo que presentó la mayor frecuencia (0.81) y se encontró en todas las localidades (Tabla VII). Los dos organismos secuenciados en Islas Marías y los dos de Bahías de Huatulco presentaron el haplotipo más abundante (NAD-1).

Por otra parte, Isla Isabel fue la localidad que presentó el mayor número de haplotipos (3), sin embargo, esto puede ser el resultado de que es la localidad con mayor número de secuencias.

Tabla VII. Frecuencias relativas de los haplotipos del intrón *Nad5* de *Pocillopora verrucosa* y sus frecuencias relativas por localidad.

	Localidades					Frecuencia relativa global
	IIS n=15	IMA n=2	IMR n=3	IXT n=4	BHU n=2	
NAD-1	0.867	1	0.33	0.75	1	0.81
NAD-2	0.067					0.04
NAD-3	0.067					0.04
NAD-4			0.67			0.08
NAD-5				0.25		0.04
% <i>H</i> privados	67	-	50	50	-	80

Debido al limitado número de secuencias obtenidas por localidad para el intrón *Nad5*, los análisis cuantitativos que se presentan a continuación se basan únicamente en el locus ITS2.

VII.4. Diversidad genética

Los valores de diversidad haplotípica fueron relativamente altos en todas las localidades, variando entre 0.51 (Islas Marías) y 0.81 (Loreto) (Tabla VIII). De manera general, los valores más altos se encontraron en las localidades de Baja California Sur (Cabo Pulmo, Loreto y La Paz), mientras que en el complejo de islas (Islas Marías, Isla Isabel e Islas Marietas) se encontraron los valores más bajos. Cabe mencionar que Islas Marías fue la localidad que presentó la menor diversidad tanto haplotípica como en número de haplotipos, y fue la de menor tamaño de muestra.

Por otra parte, se puede observar que se obtuvieron valores bajos de diversidad nucleotídica en todas las localidades, lo cual indica que existe una diferenciación nucleotídica muy pequeña entre los haplotipos encontrados. Al igual que en la diversidad haplotípica, la menor diversidad nucleotídica se presentó en Islas Marías (0.003). El valor más alto se observó en Ixtapa (0.016) a pesar de que esta localidad no fue la de mayor diversidad haplotípica.

Tabla VIII. Número de haplotipos por localidad (H), índice de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) para el locus ITS2 de *Pocillopora verrucosa* en el Pacífico mexicano.

Localidad	ITS2			
	n_s	H	h	π
LOR	24	11	0.819 ± 0.073	0.008 ± 0.005
LPA	35	9	0.706 ± 0.073	0.010 ± 0.005
CPU	33	12	0.780 ± 0.069	0.011 ± 0.006
IIS	31	7	0.604 ± 0.092	0.006 ± 0.004
IMA	16	4	0.517 ± 0.132	0.003 ± 0.002
IMR	20	7	0.679 ± 0.102	0.009 ± 0.005
IXT	38	15	0.772 ± 0.071	0.016 ± 0.008
Total y promedios	197		0.697	0.009

n_s = número de especímenes secuenciados por localidad.

VII.5. Estructura genética

El valor del índice de fijación, obtenido a partir del Análisis de Varianza Molecular para la hipótesis nula de panmixia entre todas las muestras, fue pequeño pero significativo ($\Phi_{ST}=0.02$, $p=0.04$). El nivel de significancia refleja la existencia de una estructura genética entre las localidades, a pesar de que sólo el 2.1% de la varianza ocurrió entre las localidades.

Para definir el grado de diferenciación entre cada una de las localidades se realizaron comparaciones pareadas entre localidades, los valores de Φ_{ST} que se obtuvieron oscilan entre -0.0001 (Isla Isabel-Islas Marías) y 0.073 (La Paz-Isla Isabel). Si bien cuatro pares de localidades resultaron en valores de Φ_{ST} significativos para las pruebas individuales, después de la corrección de Bonferroni no se encontró ninguna diferencia significativa de las pruebas pareadas, lo cual indica que la diferenciación interdémica fue insuficiente para mantener la significancia después de la corrección por pruebas múltiples (Tabla X).

Tabla IX. Porcentajes de variación de los componentes de variancia e índice de fijación (Φ_{ST}) obtenidos con el AMOVA .

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la variancia	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	6	20.18	0.05	2.1
Dentro de poblaciones	190	400.48	2.11	97.9
<i>Total</i>	<i>196</i>	<i>420.665</i>	<i>2.15298</i>	

Índice de fijación Φ_{ST} = 0.02098 ($p = 0.047$)

Tabla X. Valores de Φ_{ST} de las comparaciones pareadas entre localidades (bajo la diagonal) y sus valores de p (sobre la diagonal).

Φ_{ST} \ p	LOR	LPA	CPU	IIS	IMA	IMR	IXT
LOR		0.197	0.588	0.064	0.070	0.436	0.146
LPA	0.0151		0.579	0.011 ^{NS}	0.058	0.187	0.389
CPU	-0.0109	-0.0108		0.032 ^{NS}	0.046 ^{NS}	0.251	0.561
IIS	0.0429	0.0734	0.0499		0.370	0.359	0.037 ^{NS}
IMA	0.0549	0.0720	0.0634	-0.0001		0.722	0.091
IMR	-0.0037	0.0168	0.0089	0.0011	-0.0162		0.281
IXT	0.0211	-0.0014	-0.0084	0.0509	0.0527	0.0064	

(NS) valores de p no significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni.

Debido a que en las secuencias se encontró una región de repeticiones tetranucleotídicas (microsatélite compuesto: sitios 151-171), se realizó por separado un análisis de esta región. A partir del número de repeticiones se identificaron siete alelos que se codificaron cualitativamente. La diferencia en sus frecuencias produjo un valor de F_{ST} de 0.03 ($p = 0.02$) con 3.4% de variancia entre las localidades. Sin embargo, al realizar las comparaciones pareadas tampoco se encontraron diferencias significativas entre las localidades después de la corrección de Bonferroni (Apéndice 2).

Es importante mencionar que al analizar las secuencias del ITS2 sin la región del microsatélite, se obtuvo un Φ_{ST} de 0.007 no significativamente distinto de cero ($p=0.19$) (Apéndice 3). Esto indica que la señal de diferenciación genética entre las secuencias estudiadas se encuentra principalmente en la región de las repeticiones tetranucleotídicas y no en el polimorfismo de sustituciones.

VII.6. Flujo genético

A partir de los Φ_{ST} pareados de las secuencias completas se estimó el número de migrantes efectivos por generación (Nm) (Tabla XI). Se presentaron siete valores que correspondieron a un número infinito de migrantes efectivos, lo cual refleja el máximo nivel de flujo genético entre las localidades y es el resultado de un Φ_{ST} igual a cero. Cuatro de estos valores máximos se presentaron entre localidades cercanas geográficamente (menos de 350km). Sin embargo, tres valores se presentaron entre localidades que tienen más de 1,000km de distancia entre ellas. Los valores más bajos se mostraron entre La Paz con Isla Isabel e Islas Marías ($Nm=6$).

Tabla XI. Valores del número de migrantes efectivos por generación (Nm) de *Pocillopora verrucosa* entre localidades a partir de los valores de Φ_{ST} .

	LOR	LPA	CPU	IIS	IMA	IMR	IXT
LOR							
LPA	32.6						
CPU	Infinito	Infinito					
IIS	11.1	6.3	9.5				
IMA	8.6	6.4	7.4	Infinito			
IMR	Infinito	29.2	55.4	426.9	Infinito		
IXT	23.1	Infinito	Infinito	9.3	9	77.3	

En cuanto a los resultados obtenidos con el programa Migrate, los valores de θ (equivalentes al producto del tamaño poblacional efectivo y de la tasa mutacional) así como los valores de las tasas de migración, no fueron consistentes en las 12 simulaciones (Apéndice 4). Por lo cual se reportan los resultados de una de las simulaciones que representa al mayor porcentaje de las coincidencias. En general, se presentaron valores muy bajos de θ , teniendo que Ixtapa mostró el valor más alto (0.0256) mientras que Islas Marías el más bajo (0.0020) (Tabla XII).

Tabla XII. Estimaciones de los valores de θ ($4Ne\cdot\mu$) mediante verosimilitud máxima con una de las simulaciones de MCMC.

	LOR	LPA	CPU	IIS	IMA	IMR	IXT
<i>n</i>	24	35	33	31	16	20	38
$\theta=4Ne\cdot\mu$	0.0099	0.0068	0.0111	0.0029	0.0020	0.0024	0.0256
95% C.I.	(0.005 – 0.049)	0.004 – 0.034)	(0.005 – 0.055)	(0.002 – 0.014)	(0.001 – 0.010)	(0.002 – 0.012)	(0.017 – 0.128)

Por otra parte, las tasas de migración mostraron que los mayores valores de flujo se presentaron de Islas Marietas hacia La Paz, de Ixtapa hacia Cabo Pulmo y de Ixtapa hacia Islas Mariás (Tabla XIII y Figura 6) con una consistencia del 60 al 70% en las 12 simulaciones MCMC. En general, las demás localidades obtuvieron niveles relativamente altos de flujo genético entre localidades cercanas geográficamente, principalmente entre las localidades de Baja California Sur (Apéndice 4). Por otra parte se pudo observar que entre las localidades más lejanas geográficamente, en la mayoría de las simulaciones, las tasas de migración fueron menores a 1 (Apéndice 4).

Tabla XIII. Estimaciones de las tasas de migración entre poblaciones ($M=m/\mu$) mediante verosimilitud máxima con una de las simulaciones de MCMC.

<i>Flujos unidireccionales</i>			<i>Flujos bidireccionales</i>				
Localidades			Localidades				
Origen	Destino	M =	Origen	Destino	M =		
IMR	→	LPA	55321	IXT	↔	IMA	51975
IXT	→	CPU	54192	IMA	↔	IXT	20701
LPA	→	LOR	18911	LOR	↔	CPU	10668
IIS	→	IMR	8244	CPU	↔	LOR	1491
IIS	→	LOR	7717				
CPU	→	IIS	7645				
IMA	→	IIS	3539				
IXT	→	LPA	1843				
IIS	→	LPA	1196				

En estas tablas no se incluyeron las tasas de migración menores a 1.

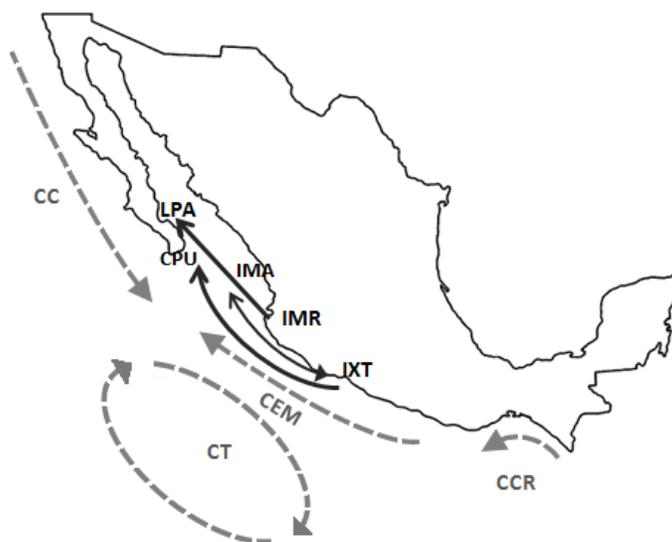


Figura 6. Representación de las mayores magnitudes relativas y dirección del flujo genético entre las localidades, obtenidas a partir de una de las simulaciones con el programa Migrate. Líneas discontinuas representan las principales corrientes del Pacífico mexicano.

VII.7. Aislamiento por distancia

A pesar de que después de la corrección secuencial de Bonferroni no se encontró diferenciación genética de *P. verrucosa* entre pares de localidades del Pacífico mexicano, se realizó un análisis de aislamiento por distancia para evaluar la posible correlación entre las distancias genéticas (Φ_{ST}) y las distancias geográficas de las localidades, la cual resultó no significativa (Figura 7). Es importante destacar que en la parte superior de la gráfica se observa una agrupación que corresponde a las correlaciones entre las localidades de Baja California Sur con Islas Mariás e Isla Isabel, sin embargo, aunque Islas Marietas tiene una distancia geográfica similar a las otras islas, la correlación de esta isla con Baja California Sur no se encuentra en esa agrupación.

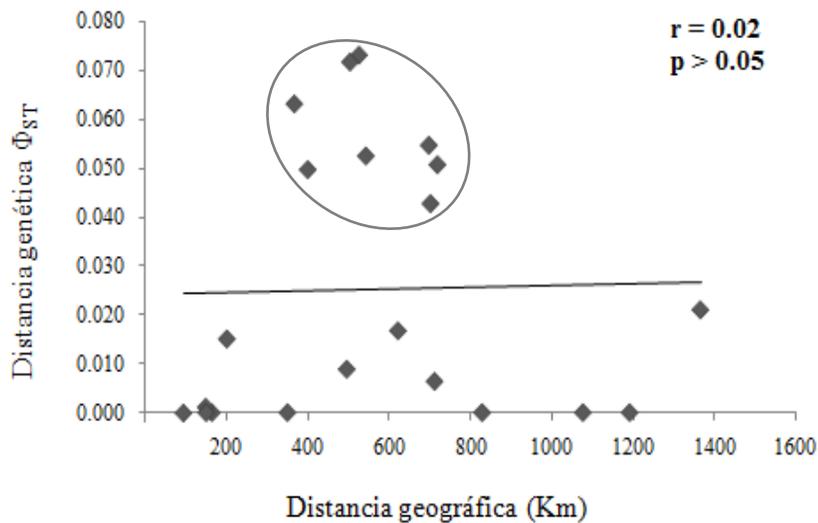


Figura 7. Correlación entre la distancia genética (Φ_{ST}) y la distancia geográfica entre pares de localidades.

VII.8. Relaciones filogenéticas

VII.8.1. ADN ribosomal (ITS2)

En general el análisis filogenético de los 35 haplotipos, mediante el método de Neighbor Joining (NJ) empleando distancias interhaplotípicas, reflejo la baja divergencia entre los haplotipos. Se produjo un árbol con una topología compleja con la presencia de varios subgrupos (Figura 8). A pesar de que las agrupaciones poseen bajos valores de bootstrap no paramétrico, de manera general se puede definir la topología con la siguiente expresión simbólica (A (B(C, D))), donde A es el ancestro donde está enraizado el árbol, B está representado por cinco haplotipos que divergen en dos subgrupos (C y D) en los que se encuentran los demás haplotipos. De esta manera, los haplotipos más ancestrales son los del grupo B (IT-1, IT-3, IT-7, IT-31 e IT-35), de los cuales la mayoría son haplotipos compartidos. Sin embargo, es importante resaltar que estos haplotipos basales no son monofiléticos.

Por otra parte, se pueden observar dos grupos monofiléticos (bajamente soportados por valores de bootstrap) con la presencia de varias politomías (C y D). De acuerdo a la posición de los nodos, las divergencias más recientes ocurrieron entre los haplotipos IT-21 e IT-30 con un valor de bootstrap de 54.

En cuanto a la filogeografía, la topología general de este árbol no refleja la presencia de un patrón entre la filogenia de los haplotipos y la ubicación de las localidades. Únicamente en el grupo D se observa una subdivisión que presenta una agrupación de cinco haplotipos provenientes de la región de Baja California Sur (IT-6, IT-19, IT-2, IT-4 e IT-15).

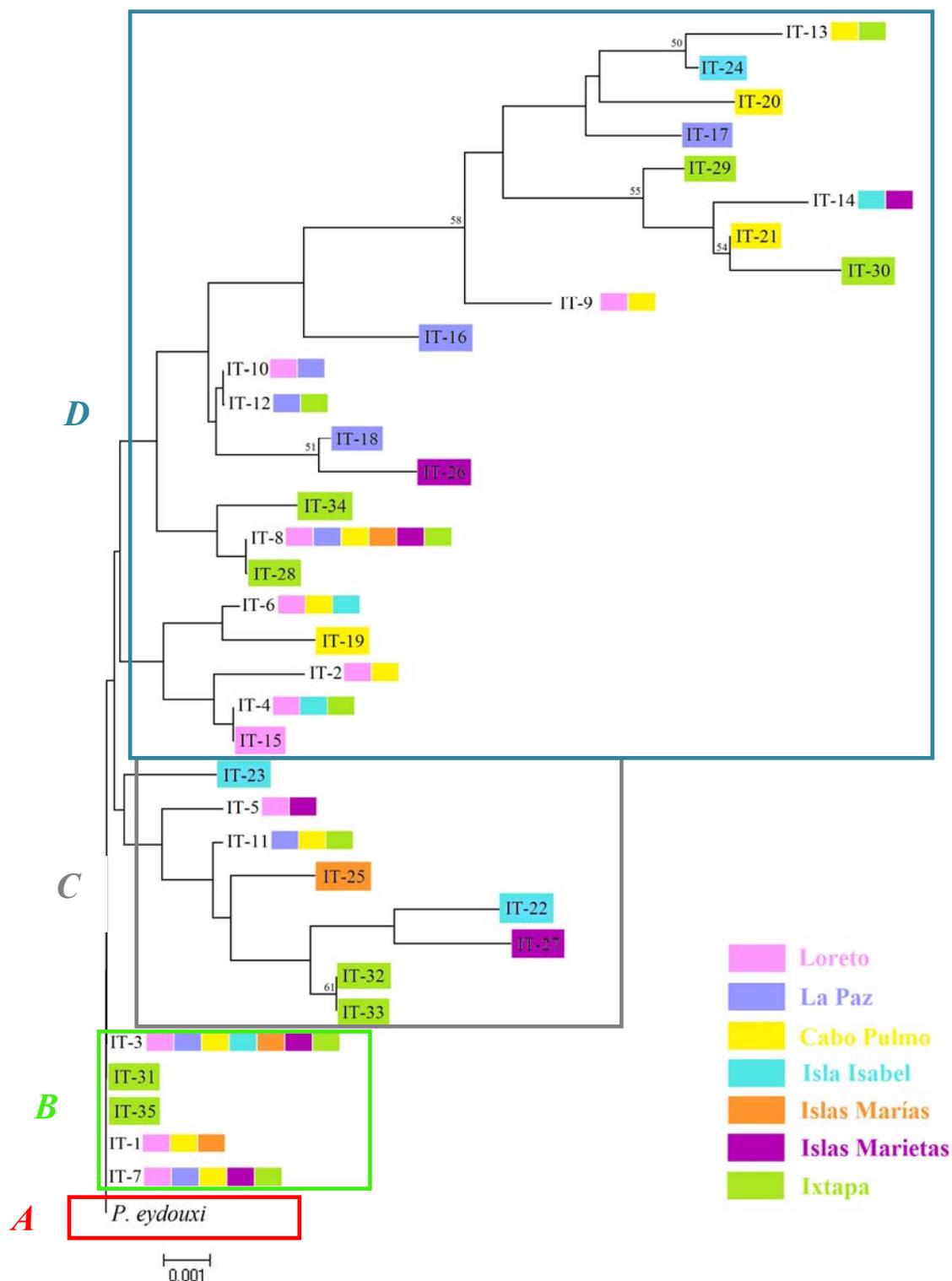


Figura 8. Árbol filogenético creado con el método Neighbor Joining basado en las distancias interhaplotípicas del ITS2 de *Pocillopora verrucosa* en el Pacífico mexicano, utilizando a *P. eydouxi* como grupo externo para enraizar el árbol. Los cuadros de colores sólidos representan las localidades, los recuadros representan los grupos formados para interpretar la topología (A, B, C, D).

El análisis de Máxima Parsimonia (MP) también refleja una baja divergencia entre casi todos los haplotipos y una muy limitada resolución filogenética. Esta baja resolución coincide con el árbol obtenido con el método Neighbor Joining (NJ). Las semejanzas entre ambas reconstrucciones (NJ y MP) consistieron en dos grupos: uno formado por los haplotipos IT-22, IT-27, IT-32 e IT-33, y otro grupo formado por los haplotipos IT-17, IT-13 e IT-24 (Figura 9).

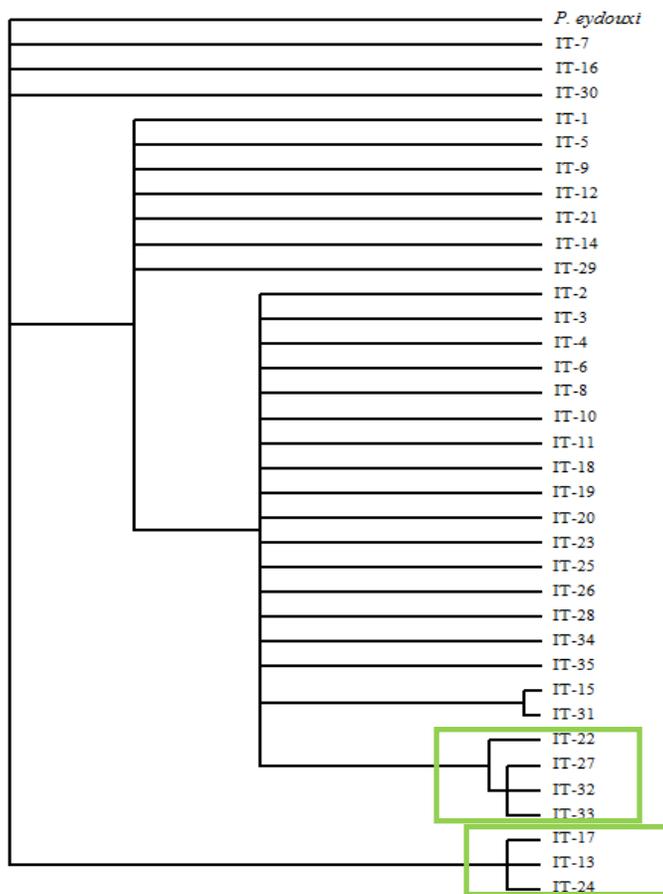


Figura 9. Árbol consenso de los 108 árboles de máxima parsimonia de los haplotipos del ITS2 de *Pocillopora verrucosa* en el Pacífico mexicano.

VII.8.1. ADN mitocondrial (intrón *Nad5*)

Finalmente, se realizó un árbol filogenético con el método Neighbor Joining para los cinco haplotipos encontrados con el intrón *Nad5*. Se utilizó a *P. eydouxi* como grupo externo para enraizar el árbol (Figura 10). En la topología de este árbol se observan dos grupos monofiléticos. El bajo nivel de divergencia que existe entre los haplotipos NAD-1 y NAD-2 aunado a su posición en la topología, sugieren que éstos son los haplotipos más recientes. Teniendo así, que el haplotipo compartido (NAD-1) es uno de los haplotipos derivados.

A pesar de la baja cantidad de secuencias analizadas y del bajo polimorfismo que presentaron, se puede observar que en uno de los grupos monofiléticos se agruparon los tres haplotipos encontrados en Isla Isabel.

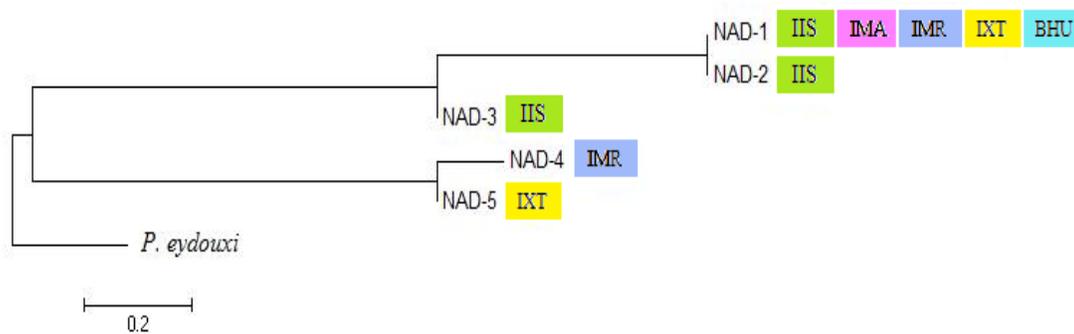


Figura 10. Árbol filogenético creado con el método Neighbor Joining de los haplotipos del intrón *Nad5* de *Pocillopora verrucosa* en el Pacífico mexicano.

VII.9. Demografía histórica

En el análisis de distribución *mismatch* el número de diferencias pareadas entre las secuencias de los haplotipos oscilaron entre 7 (Islas Marías) y 29 (Ixtapa) (Tabla XIV y Figura 11). En los histogramas de frecuencia se puede observar que en tres comunidades arrecifales del Pacífico mexicano se presentó una distribución unimodal en cero diferencias, mientras que en las otras cuatro localidades se presentó una distribución multimodal.

De acuerdo a los parámetros del modelo de expansión repentina (θ_0 y θ_1), en Ixtapa e Islas Marías se observa un gran incremento poblacional, sin embargo, los valores no se ajustaron al modelo ($p < 0.05$), lo que indica que el locus ITS2 no guarda señales de una expansión demográfica súbita.

Por otra parte, los resultados obtenidos en Loreto, La Paz, Cabo Pulmo, Isla Isabel e Islas Marietas sugieren que estas comunidades arrecifales todavía conservan señales de una expansión demográfica. En Loreto, La Paz, Cabo Pulmo e Islas Marietas, los parámetros θ_0 y θ_1 sugieren que el crecimiento poblacional ha sido pequeño en comparación con el incremento poblacional ocurrido en Isla Isabel.

Tabla XIV. Resultados de la distribución de distancias de las comunidades arrecifales en el Pacífico mexicano. H = número de haplotipos, τ = Tiempo ocurrido en número de generaciones desde la expansión, θ_0 =Tamaño poblacional antes de la expansión, θ_1 = Tamaño poblacional después de la expansión.

Parámetros	Localidades						
	LOR	LPA	CPU	IIS	IMA	IMR	IXT
H	11	9	12	7	4	7	15
τ	6.8	9.8	9.9	0.8	0.1	11.1	0.000
θ_0	0.0000	0.0000	0.0017	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
θ_1	4.8025	2.6063	5.1077	99999.0	99999.0	2.1205	99999.0
<i>p-valores</i>	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	< 0.05	> 0.05	< 0.05

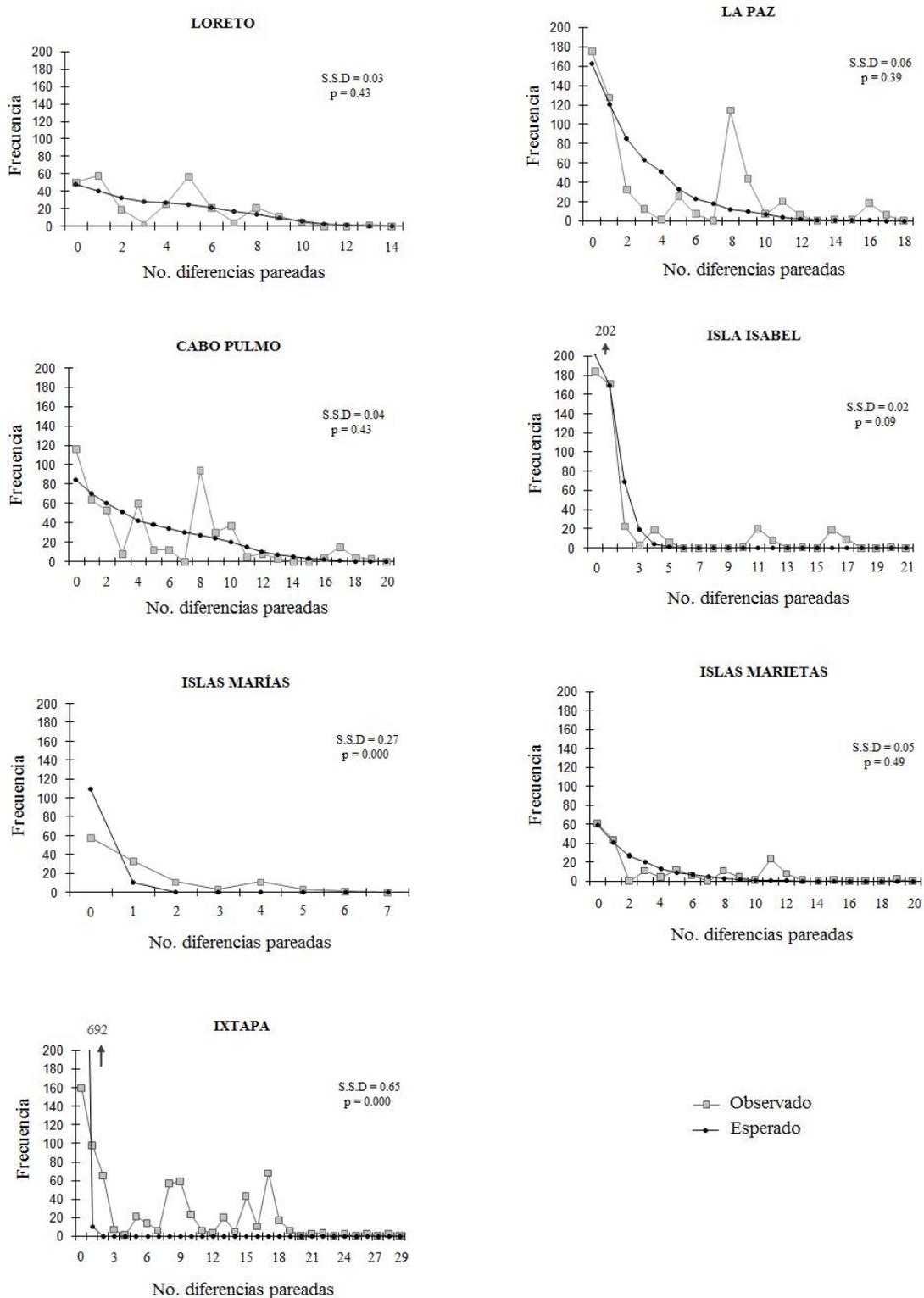


Figura 11. Distribución de diferencias interhaplotípicas con base en las secuencias de la región del ITS2 del ADNr de *Pocillopora verrucosa* en las localidades del Pacífico mexicano. Las líneas representan la distribución esperada y la observada por el modelo de expansión repentina. S.S.D = suma de las desviaciones cuadradas.

VIII. Discusión

VIII.1. Variabilidad y utilidad de los loci empleados en *Pocillopora verrucosa*

Para hacer inferencias sobre los patrones de conectividad demográfica y los niveles de diversidad genética entre las comunidades coralinas, es importante utilizar y comparar la información obtenida a partir de distintos marcadores moleculares debido a que entre más genes se estudien, las interpretaciones de la conectividad son más confiables. Para este trabajo se trataron de utilizar tres loci, logrando obtener resultados satisfactorios de uno sólo.

El ADNmt ha sido ampliamente utilizado para estudios genéticos en animales, debido a que tiende a acumular mutaciones a una tasa mayor que el ADNn. Sin embargo, en los cnidarios el ADNmt evoluciona mucho más lento que en la mayoría de los metazoarios (Shearer *et al.*, 2002; Avise, 2004). A pesar de esto se han utilizado distintos marcadores mitocondriales para evaluar el polimorfismo de diversas especies coralinas (Concepción *et al.*, 2006; Flot y Tillier, 2007; Vollmer y Palumbi, 2007). Tomando en cuenta que el tejido de los corales hermatípicos contiene el genoma de numerosas zooxantelas (Takabayashi *et al.*, 2006), la manera de asegurar que sólo se amplifique el ADN de los corales es mediante el uso de cebadores específicos. Los cebadores utilizados para amplificar el intron *Nad5* fueron diseñados y probados en varias especies coralinas (Concepción *et al.*, 2006), sin embargo en este trabajo se observó que los cebadores no fueron específicos para los corales ya que funcionaron tanto en *P. verrucosa* como en los simbiositos. A pesar de que no se habían reportado problemas con la especificidad de estos cebadores, se debe tomar en cuenta que son degenerados lo que reduce significativamente su especificidad, además de que son cebadores que se sientan en los genes NAD5 y NAD1, los cuales son altamente conservados en la mayoría de las especies; factor que contribuyó en la amplificación del ADNmt de ambas especies.

A diferencia del ADNmt, el ADNn de los cnidarios tiende a acumular mutaciones a la misma tasa que en otros grupos animales (Hellberg, 2006), por lo cual resulta importante comparar los resultados obtenidos a partir de genes del ADNmt y del ADNn. Fukami y colaboradores (2004) encontraron que el gen nuclear β -Tub presentó una alta variabilidad nucleotídica al analizar la divergencia entre algunas especies coralinas del Pacífico y del Atlántico. Por otra parte, Lopez y Knowlton (1997) encontraron tres sitios

altamente polimórficos en la región del intrón de β -Tub en *Montastrea annularis*. En el presente trabajo surgieron algunos problemas con la genotipificación del gen nuclear β -Tub, por lo cual no se lograron obtener las suficientes amplificaciones para realizar los análisis genéticos. De acuerdo con Lopez y Knowlton (1997) las dificultades para analizar el locus β -Tub tanto en la amplificación (presencia de dos bandas) como en la secuenciación, se deben principalmente a que los genes β -Tub comprenden a una familia de genes múltiples en varios eucariotas.

Por otra parte, las regiones ITS (ADNr) han sido utilizadas ampliamente para estudios de genética poblacional en varios organismos, debido a que éstas presentan una mayor variabilidad que otras secuencias de regiones nucleares y mitocondriales. Además, como presentan cientos de copias por genoma, ésta es una región fácil de amplificar (White *et al.*, 1990; Schlotterer *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2004; Liao, 1999; Álvarez y Wendel, 2003; Flot *et al.*, 2008). En el Pacífico mexicano, Saveedra-Soletto (2007) obtuvo un mayor éxito de amplificación en la región del ITS1 e ITS2 (83%) entre tres loci utilizados en el estudio de la estructura genética del coral hermatípico *Pavona gigantea*. Esto coincide con los resultados obtenidos en este trabajo para el ITS2 en *P. verrucosa*, ya que se obtuvo un gran éxito de amplificación en casi todas las comunidades arrecifales (75%). La falta de éxito en la amplificación de las muestras de Bahías de Huatulco se puede atribuir a la posible falla del cebador ITS4 en la región del gen 28S. Esta inferencia se basa en el hecho de que en una prueba realizada con distintos cebadores para los genes 5.8S y 28S, se observó la presencia de bandas débiles y de gran tamaño (amplificación de gran parte del gen 28S) sólo cuando se utilizaron cebadores diferentes al ITS4. Por esta razón se diseñaron dos cebadores específicos que se sentarán en el gen 28S (en una región más cercana al ITS2), sin embargo por falta de tiempo no se pudieron analizar para ser incluidas en este trabajo.

La presencia de microsatélites y múltiples bandas en la región del ITS1 e ITS2 son características que se han observado en algunas especies coralinas y principalmente en especies del género *Pocillopora* (Chen *et al.*, 2004; Magalon *et al.*, 2004; Combsch *et al.*, 2008; Flot *et al.*, 2008). Esto se pudo observar en casi todas las amplificaciones de la región del ITS1 de este trabajo, ya que se obtuvieron más de tres bandas por organismo (más de un haplotipo por colonia). Las secuencias de los organismos que presentaron una sola banda mostraron la presencia de regiones de repeticiones dinucleotídicas, sin embargo debido al

bajo número de secuencias obtenidas no se realizaron análisis cuantitativos en esta región, únicamente se utilizó la región del ITS2.

VIII.2. Diversidad genética

La diversidad genética de las poblaciones coralinas es un factor esencial para evaluar la capacidad adaptativa de estos organismos a cambios ambientales. Para poder cuantificar la diversidad genética es importante utilizar regiones que presenten un alto grado de variación nucleotídica. A pesar de que el ADNmt evoluciona mucho más lento en los cnidarios que en la mayoría de los metazoarios (Shearer *et al.*, 2002), en algunas especies coralinas se han encontrado regiones que presentan una alta tasa mutacional y la suficiente variación nucleotídica para realizar estudios de genética poblacional. Flot y Tillier (2007) encontraron que el genoma mitocondrial de morfoespecies de *Pocillopora* contenía dos regiones variables: D-loop (1.5% de diferencias entre las secuencias) y ORF (1% de diferencias). Asimismo, Vollmer y Palumbi (2007) observaron altos valores de diversidad genética en la región control (D-loop) de *Acropora cervicornis*. Concepción y colaboradores (2006) encontraron que para 15 especies coralinas, algunas regiones no codificantes del ADNmt presentaban la misma tasa mutacional que el resto del genoma mitocondrial de los corales, lo cual proporcionaba la suficiente variación nucleotídica para realizar estudios de genética poblacional. Sin embargo, en otras regiones del ADNmt no existe una variabilidad suficiente, por ejemplo, Ridgway (2002) no encontró diferencias en un fragmento del ADNmt (COI) en *P. verrucosa* y en *P. damicornis* al sur de África.

En este trabajo, las pocas secuencias obtenidas para el intrón *Nad5* reflejaron una baja variabilidad nucleotídica entre secuencias (3 sitios variables en 433pb) lo que es consistente con la lenta tasa evolutiva del ADNmt de los cnidarios. Asimismo, coincide con la poca variabilidad que mostró *Pavona gigantea* en un intrón del ADNmt que se encuentra entre los genes NAD3 y NAD5 (2 sitios variables en 113pb) (Saavedra-Sotelo, 2007). En ambas especies, esto resultó en poca información filogeográfica e insuficiente variabilidad para estimar los niveles de estructura genética con este locus.

En cuanto al ADNr, en algunas especies coralinas se ha encontrado que las regiones ITS presentan el suficiente polimorfismo para realizar análisis de genética poblacional (Tabla XV). Rodríguez-Lanetty y Hoeg-Guldberg (2002) y Takabayashi y colaboradores

(2003) obtuvieron un número suficiente de haplotipos en *Plesiastrea versipora* (H=36) y en *Stylophora pistillata* (H=26), respectivamente, para analizar mediante estudios filogenéticos la estructura genética de estas especies entre distintos sistemas arrecifales en el Pacífico occidental. Moothien Pillay y colaboradores (2006) obtuvieron un menor número de haplotipos en *Pavona cactus* y *Pavona decussata* (13 y 25 respectivamente) al Sur de África en comparación a los trabajos mencionados anteriormente. Para las dos especies de *Pavona* encontraron altos valores de diversidad haplotípica y valores relativamente bajos de diversidad nucleotídica, similares a los reportados por Saavedra-Sotelo (2007) para *P. gigantea* en el Pacífico mexicano. A diferencia de Moothien Pillay y colaboradores, Saavedra-Sotelo obtuvo un mayor número de haplotipos (51), de los cuales el 80% fueron privados.

Tabla XV. Niveles de variabilidad de las regiones ITS (ADNr) en algunas especies coralinas.

Especie	Escala (km)	n	H	h	π	locus	Referencia
<i>Pocillopora verrucosa</i>	1400	197	35	0.69	0.009	ITS2	Este trabajo
<i>Pavona gigantea</i>	1800	97	51	0.94	0.009	ITS1-5.8-ITS2	Saavedra-Sotelo, 2007
<i>P. cactus</i>	200	60	13	0.73	0.007	ITS1-5.8-ITS2	Moothien Pillay <i>et al.</i> , 2006
<i>P. decusata</i>	200	60	25	0.93	0.01	ITS1-5.8-ITS2	Moothien Pillay <i>et al.</i> , 2006
<i>Plesiastrea versipora</i>	4150	40	36	NA	NA	ITS1 e ITS2	Rodríguez-Lanetty y Hoeg-Guldberg, 2002
<i>Stylophora pistillata</i>	7000	122	26	NA	NA	ITS1	Takabayashi <i>et al.</i> , 2003

H = número de haplotipos, h = diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica y NA=no analizados.

En este trabajo se encontró que las diferencias nucleotídicas del ITS2 resultaron en 35 haplotipos, de los cuales el 60% fueron privados. Asimismo, se presentó una diversidad haplotípica de media a relativamente alta en las comunidades arrecifales (0.52 – 0.82) y valores bajos de diversidad nucleotídica (0.003 – 0.016). A pesar de ser especies diferentes, se puede observar que existe una cierta similitud entre este trabajo y lo reportado para las otras especies coralinas con este locus. La ligera diferencia entre las especies se puede atribuir a: 1) las características biológicas de cada especie, 2) los tamaños de muestra y escala geográfica analizada, 3) el tamaño de las secuencias de las regiones analizadas en cada especie y 4) el análisis de sólo una o de las dos regiones del ITS (ITS1 o ITS2).

Para especies de *Pocillopora* se han encontrado tanto altos como bajos valores de diversidad genética, lo que ha sido atribuido principalmente a los modos reproductivos dominantes de las especies en cada región. Benzie y colaboradores (1995) encontraron mediante electroforesis de aloenzimas una heterocigosidad (H) relativamente alta en *P. damicornis* dentro de cada población coralina ($H=0.212-0.504$) en la Isla One Tree al sur de la Gran Barrera Arrecifal Australiana (GBR), esta diversidad fue asociada principalmente a la reproducción sexual de esta especie en esta región. Por el contrario, al sur de Japón se encontró una menor diversidad genética en seis poblaciones de *P. damicornis* también mediante electroforesis de aloenzimas ($H=0.24-0.36$), teniendo que en esta región el principal modo reproductivo es asexual (Adjeroud y Tsuchiya, 1999). De igual manera, Ayre y Hughes (2004) encontraron una baja diversidad genética de *P. damicornis* en altas latitudes de la GBA (electroforesis de aloenzimas: 0.19-0.25). Por otra parte, Ridgway y colaboradores (2001) encontraron una heterocigosidad aloenzimática de 0.11 a 0.19 en *P. verrucosa* en seis arrecifes coralinos del sur de África. Para *P. meandrina* se reportaron, mediante el uso de microsatélites, valores de diversidad genética de 0.57 a 0.77 en siete poblaciones coralinas de Polinesia, encontrando que la reproducción sexual de esta especie no estuvo restringida a cortas distancias (Magalon *et al.*, 2005).

En cuanto a la diversidad genética que se ha reportado para las tres especies coralinas que se han estudiado en el Pacífico mexicano, Chávez-Romo y colaboradores (2008) y Paz-García (2009) encontraron una diversidad genética relativamente baja en la mayoría de las poblaciones de *P. damicornis* ($H=0.15-0.38$) y *Porites panamensis* ($H=0.11-0.26$) respectivamente (en tres loci aloenzimáticos). Por otra parte, para *Pavona gigantea* se reportó una alta diversidad genética (en un sólo locus) en todas las poblaciones, teniendo que Isla San Benedicto fue la localidad que presentó la mayor diversidad genética (Saavedra-Sotelo, 2007). Esto podría explicarse si se toma en cuenta que esta isla pertenece a las Islas Revillagigedo, las cuales representan a la localidad con la mayor diversidad de especies coralinas del Pacífico mexicano (Reyes-Bonilla *et al.*, 2005; Calderón-Aguilera *et al.*, 2009). Las diferencias en la diversidad genética de estas especies se deben a diversos factores, tales como sus modos reproductivos, la diferencia en las tasas de mortalidad por distintos factores naturales y antropogénicos y el grado de conectividad demográfica que presentan. Por otra parte, en las tres especies coralinas, se ha encontrado una mayor cantidad de haplotipos y

genotipos privados en las poblaciones más norteñas y sureñas, lo que concuerda con el mayor porcentaje de haplotipos privados de *P. verrucosa* encontrados en Ixtapa, que fue la localidad más sureña en este trabajo.

VIII.3. Diferenciación genética

A pesar de que el valor del índice de fijación de las secuencias del ADNr fue pequeño, éste refleja la existencia de estructura genética significativamente distinta de cero entre las localidades de *P. verrucosa* en el Pacífico mexicano ($\Phi_{ST}=0.02$, $p=0.04$). Esto coincide con la estructura genética que se ha encontrado en otras especies coralinas en el Pacífico mexicano así como con lo reportado para otras especies de *Pocillopora* en otras regiones del mundo (Tabla XVI). A pesar de que la historia geográfica de cada región genera distintos patrones de diferenciación genética (Rodríguez- Lanetty et al. 2001), *P. damicornis* generalmente ha presentado estructura genética, con valores del índice de fijación entre 0.045 y 0.266 ($p < 0.05$). Estos resultados se han obtenido a distintas escalas geográficas (10 – 1800 km), en sitios diferentes, con tamaños de muestras de 36 a 200 colonias y empleando aloenzimas como marcadores (Stoddart, 1984; Benzie *et al.*, 1995; Ayre *et al.*, 1997; Adjeroud y Tsuchiya, 1999; Ayre y Hughes, 2000; Ayre and Hughes, 2004; Miller y Ayre, 2004; Chavéz-Romo *et al.*, 2008). La electroforesis de aloenzimas ha sido utilizada ampliamente para estudios genéticos en corales. Sin embargo en las últimas décadas se han utilizado otros marcadores ya que una de las principales desventajas del uso de aloenzimas (y de algunos marcadores de ADN) es que pueden estar sujetos a selección natural, lo cual esencialmente podría impedir la aplicación de modelos neutrales que permitan predecir la dirección y magnitud del flujo genético (Ridgway, 2002; Ayres y Hughes, 2004). En otra especie de *Pocillopora* (*P. meandrina*), Magalon y colaboradores (2005) encontraron una mayor diferenciación genética a escala local que a gran escala (utilizando microsátélites), que atribuyeron a la huella de un posible evento de destrucción a gran escala (evento de blanqueamiento) seguido por una reciente restauración de las poblaciones por nuevas colonias.

Tabla XVI. Diferenciación genética (índice de fijación) encontrada en estudios de especies de *Pocillopora* y otros géneros de corales.

Especie	Marcador	N	Índice de fijación	Localidad	Escala (km)	Referencia
<i>Pocillopora</i>						
<i>P. verrucosa</i>	ITS2 ADNr	197	0.02*	PM	1400	Este trabajo
<i>P. verrucosa</i>	Aloenzimas	267	0.00	SA	70	Ridgway <i>et al.</i> , 2001
<i>P. meandrina</i>	Microsatelites	135	0.09*	PS	2000	Magalon <i>et al.</i> , 2005
<i>P. damicornis</i>	Aloenzimas	407	0.28 *	GBR	1200	Ayre y Hughes, 2000 Ayre <i>et al.</i> , 1997
<i>P. damicornis</i>	Aloenzimas	160	0.153*	GBR y LH	1700	Ayre and Hughes, 2004
<i>P. damicornis</i>	Aloenzimas	200	0.101*	LH	25	Miller y Ayre, 2004
<i>P. damicornis</i>	Aloenzimas	36	0.266*	SOA	400	Stoddart, 1984
<i>P. damicornis</i>	Aloenzimas	48	0.056*	SJ	650	Adjeroud y Tsuchiya, 1999
<i>P. damicornis</i>	Aloenzimas	50	0.045*	SGBR	10	Benzie <i>et al.</i> , 1995
<i>P. damicornis</i>	Aloenzimas	198	0.153*	PM	1800	Chavéz-Romo <i>et al.</i> , 2008
<i>Pavona gigantea</i>	ITS ADNr	97	0.159*	PM	1800	Saavedra-Sotelo, 2007
<i>Porites</i>	Aloenzimas	139	0.104*	PM	1800	Paz-García, 2009
<i>Panamensis</i>						

* Valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$). PM= Pacífico mexicano, SA=sur de África, PS=Pacífico sur, GBR= Gran Barrera Arrecifal de Australia, LH= Isla Lord Howe, SOA= suroeste de Australia, SJ= sur de Japón.

De acuerdo con los niveles de diferenciación genética de las pocas especies coralinas que se han estudiado en el Pacífico mexicano, el presente trabajo fue el que mostró el menor valor de índice de fijación global (0.02) ya que para las otras especies coralinas los valores del índice de fijación oscilaron de 0.10 a 0.16 (Saavedra-Sotelo, 2007; Chavéz-Romo *et al.*, 2008; Paz-García, 2009). Esto sugiere que *P. verrucosa* es la menos diferenciada genéticamente de las cuatro especies coralinas más abundantes en el Pacífico mexicano.

Varios grupos de invertebrados marinos y peces en las costas del Pacífico mexicano han mostrado una clara subdivisión poblacional y bajos niveles de flujo genético. Esto ha sido atribuido a diversos factores físicos y biológicos tales como las características biológicas de cada especie, la distancia geográfica, la discontinuidad del hábitat, las diferencias en condiciones ambientales y la dirección de corrientes. Teniendo que estos factores pueden ocasionar distintas historias evolutivas entre las poblaciones de cada especie (Medina y Walsh, 2000; Riginos y Nachman, 2001; Valles-Jimenez *et al.*, 2005; Gutiérrez-Flores, 2007; Licona-Chávez *et al.*, 2007),

En cuanto a los patrones de diferenciación genética de especies coralinas entre localidades del Pacífico mexicano, para *P. gigantea* se encontró que La Paz, BCS y

Carrizales, Colima fueron las localidades más diferenciadas genéticamente ($\Phi_{ST}=0.344$) entre cinco localidades analizadas (Saaverda-Sotelo, 2007). Por otra parte, para *P. damicornis* encontraron que de seis localidades, La Entrega, Oaxaca e Isla Redonda, Nayarit fueron las localidades más diferenciadas ($F_{ST}=0.420$) (Chavéz-Romo *et al.*, 2008). Esto coincide con lo reportado para *P. panamensis*, donde las mayores diferenciaciones genéticas se presentaron entre Oaxaca y Bahía de La Ventana, BCS ($F_{ST}=0.124$) y entre Oaxaca y Bahía de Banderas, Nayarit ($F_{ST}=0.118$) de seis localidades estudiadas (Paz-García, 2009). En la presente investigación (antes de la corrección secuencial de Bonferroni) se observó que para *P. verrucosa* la mayor diferenciación se presentó entre La Paz e Isla Isabel ($\Phi_{ST}=0.07$). Esto coincide en cierta forma con los patrones de diferenciación mencionados anteriormente, ya que las localidades más diferenciadas no representan las más lejanas geográficamente sino localidades norteñas o sureñas que se diferenciaron con localidades del centro del Pacífico mexicano.

Es importante mencionar que después de la corrección de Bonferroni, no se encontró ninguna diferencia significativa entre pares de localidades en este trabajo, lo cual indica que los niveles de diferenciación interdémica fueron insuficientes para mantener la significancia de pruebas pareadas para todas ellas después de aplicar una corrección tan conservativa como la secuencial de Bonferroni. Esto es congruente con el nivel de diferenciación encontrados en la prueba global ($\Phi_{ST}=0.02$), cuyo poder estadístico es mayor que el de las pruebas pareadas y que sugiere que si bien hay muy altos niveles de flujo genético entre las localidades, hay una desviación significativa del estado de panmixia. Sin embargo, se debe de tomar en cuenta que existe la posibilidad de que los resultados después de la corrección de Bonferroni sean verdaderos y que en el Φ_{ST} de la prueba global se esté cometiendo un error Tipo I (rechazar hipótesis nula siendo ésta verdadera), en cuyo caso *P. verrucosa* estaría conformada por una población homogénea genéticamente a lo largo del Pacífico mexicano.

Esto parecería sorprendente tomando en cuenta que los corales son organismos sésiles, aunado a que en la mayoría de los trabajos genéticos en corales han encontrado una marcada estructura genética. No obstante, es importante destacar que un migrante por generación entre poblaciones (N_e constante) es suficiente para evitar la fijación de alelos solamente por deriva genética (Avice, 2004; Hartl y Clark, 1997). En algunas especies coralinas han encontrado homogeneidad genética tanto a pequeña como a gran escala. Ridgway y

colaboradores (2001) no encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de *P. verrucosa* en seis arrecifes coralinos al sur de África a través del análisis de aloenzimas, concluyendo que esta especie forma una población panmíctica en esta región, a una escala local de aproximadamente 70 km. Por otra parte, Takabayashi y colaboradores (2003) encontraron que existía panmixia entre ocho poblaciones de *Stylophora pistillata* en Japón, Malasia y el norte y sur de la Gran Barrera Arrecifal (7000 km). Ellos obtuvieron estos resultados a partir del análisis filogenético y del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de la región del ITS1, donde encontraron que el 12.06% de la varianza ocurrió entre poblaciones. Ellos concluyeron que sus resultados sugerían altos niveles de conectividad a través de la distribución latitudinal de la especie en el Pacífico occidental, infiriendo que el flujo genético entre poblaciones coralinas separadas por miles de kilómetros es suficiente para prevenir la acumulación de un número sustancial de diferencias genéticas, especialmente sobre escalas de tiempo generacionales (años a décadas). Sin embargo es relevante destacar que estos autores hicieron inferencias sin reportar resultados importantes de algunos análisis (valores de significancia), por lo cual sería interesante rehacer los análisis para saber si realmente *S. pistillata* forma una población panmíctica en esta región del Pacífico occidental.

En varios organismos invertebrados, incluyendo corales hermatípicos, han encontrado que el grado de diferenciación genética no está relacionada con la distancia geográfica, de tal forma que algunas poblaciones presentan un alto grado de diferenciación genética aún en regiones donde tienen el potencial para que ocurra una dispersión en cortas distancias (Hoftman, 1986; Ayre *et al.*, 1997; Ayre y Dufty, 1994), por otra parte algunas poblaciones presentan una baja diferenciación genética y altos niveles de conectividad entre poblaciones separadas por cientos o miles de kilómetros (Benzie *et al.*, 1995; Doherty *et al.*, 1995; Shulman y Bermingham 1995; Williams y Benzie, 1996).

VIII.4. Conectividad demográfica de *P. verrucosa* en el Pacífico mexicano

Para poder comprender los patrones de conectividad demográfica de *P. verrucosa* en el Pacífico mexicano, además de estimar el número de migrantes efectivos por generación también es importante relacionar estos valores con las características biológicas de la especie y las características oceanográficas de su hábitat.

VIII.4.1. Estrategia reproductiva dominante

En este trabajo se obtuvo un alto nivel de flujo genético de *P. verrucosa* entre las comunidades coralinas. El alto nivel de flujo genético aunado a los valores relativamente altos de diversidad haplotípica podrían ser un indicador de que la reproducción sexual es el principal modo reproductivo de la especie en esta región. Sin embargo, esto resulta improbable dadas las características biológicas reportadas para la especie y a los estudios de la biología reproductiva de otra especie del género *Pocillopora* en distintas localidades del Pacífico oriental. En el Pacífico mexicano se ha podido observar que los modos reproductivos del género *Pocillopora* pueden ser tanto sexuales (desarrollo simultáneo de gametos) como asexuales (fragmentación) y que varían según la posición geográfica a lo largo del Pacífico mexicano (Chávez-Romo y Reyes-Bonilla, 2007). Vizcaíno-Ochoa (2003), Chávez-Romo (2004) y Rodríguez-Troncoso (2004) señalan que no se ha podido observar la producción de plánulas de *P. damicornis* en algunas comunidades arrecifales del Pacífico mexicano. Lo anterior sugiere que posiblemente la reproducción sexual no ha sido exitosa en esta región, teniendo así que el modo reproductivo de esta especie es esencialmente asexual (principalmente por fragmentación). Las especies del género *Pocillopora* forman colonias masivas de forma ramosa que presentan varias divisiones menores, lo cual favorece el desprendimiento o fragmentación de las ramas. Después de disturbios naturales, como huracanes, se ha podido observar que en algunas comunidades arrecifales del Pacífico mexicano los fragmentos de algunas especies de *Pocillopora* se fijan al sustrato y colonizan fácilmente sustratos blandos continuando así su desarrollo. Sin embargo la relación entre la tasa de disturbio y la diversidad genética de colonias clonales no es clara, ni ha sido estudiada en los ecosistemas arrecifales coralinos.

La reproducción asexual por fragmentación podría explicar la alta frecuencia con la que se presentó el haplotipo IT-3 (0.42-0.69) en cada localidad. A pesar de que con un solo

locus no se puede inferir que se tratan de colonias clonales, de acuerdo a las características físicas de la especie, se puede suponer que la alta frecuencia del haplotipo IT-3 es el reflejo de la obtención de un alto número de clones. Tomando en cuenta que los fragmentos de *P. verrucosa* pueden ser removidos fácilmente por la hidrodinámica local, la distancia considerada para la toma de muestras en este trabajo (3 metros de distancia como mínimo entre cada una) posiblemente fue insuficiente para evitar la obtención de colonias clonales. Por otra parte, en algunas especies coralinas se ha observado que la presencia dominante de reproducción asexual contribuye sustancialmente en la estructura genética así como en el mantenimiento y estabilidad poblacional de las especies (Stoddart, 1984; Adjeroud y Tsuchiya, 1999; Miller y Ayre, 2004; Chávez-Romo *et al.*, 2008). En este trabajo, la reproducción asexual podría estar limitando la capacidad de dispersión de los organismos, siendo uno de los principales factores que estén influyendo en la diferenciación genética de *P. verrucosa* entre las comunidades del Pacífico mexicano. Esto coincide con lo reportado para *P. damicornis* en el Pacífico mexicano, ya que Chávez-Romo y colaboradores (2008) mencionan que la diferenciación genética observada entre las poblaciones pudo haber sido debido a las diferencias en los modos reproductivos de esta especie, ya que aunque en la mayoría de las comunidades arrecifales del Pacífico mexicano se ha reportado que la fragmentación es el principal modo reproductivo de *P. damicornis*, se han encontrado evidencias de reproducción sexual en una localidad de Baja California Sur (Chávez-Romo, 2004).

Tomando en cuenta que la dispersión larvaria es el principal mecanismo de flujo genético en los corales, la probabilidad de que efectivamente la reproducción sexual sea exitosa en algunas localidades de Baja California Sur podría explicar el hecho de que en este trabajo se haya encontrado que dos localidades de esta región (Loreto-Cabo Pulmo) fueron las que compartieron el mayor número de haplotipos (7) y que presentaron uno de los mayores números de migrantes efectivos por generación (infinito).

VIII.4.2. Flujo larvario

Tomando en cuenta que los corales son organismos sésiles, el flujo larvario (plánulas) representa uno de los principales factores que determinan la conectividad demográfica entre poblaciones. El éxito de la dispersión larvaria depende de las

características oceanográficas, la sincronización en la expulsión de gametos y la capacidad de fases larvianas para sobrevivir y alcanzar sitios de asentamiento. En algunas especies coralinas se ha encontrado que el tipo de fecundación (interna o externa) así como el tamaño de las plánulas proveen ventajas adaptativas. Por ejemplo, en *P. damicronis* las plánulas expulsadas son generalmente más grandes (1.5 a 2 mm de longitud) en comparación con otras especies coralinas (0.4 mm como máximo) lo cual les proporciona una ventaja competitiva. Por otra parte, las larvas formadas por fecundación externa tardan de 1 a 2 días en asentarse, mientras que los gametos que primero son fecundados tardan de 5 a 7 días, lo que se podría traducir en una mayor dispersión. Aunado a esto, varias especies coralinas tienen la capacidad de mantenerse en su fase planctónica retrasando el asentamiento y la metamorfosis por algunas semanas si no existe un sitio de reclutamiento adecuado (Harrison y Wallace 1990; Hodgson, 1990; Harii et al., 2002). Es importante destacar que el flujo larvario resulta relevante si la transferencia de larvas ocurre sobre un número determinado de generaciones (Palumbi, 1995). Si las condiciones son favorables para la dispersión de fases planctónicas, los individuos de una región se pueden mezclar genéticamente con los de otras, formando a través del tiempo una población homogénea genéticamente. Es relevante mencionar que en organismos sésiles como los corales, la conectividad genética no solo depende de la dispersión larvaria sino que también puede ocurrir por dispersión de propágulos meroplanctónicos (Palumbi, 1997; Hellberg *et al.*, 2002; Ayre y Hughes, 2004).

En general, en este trabajo se encontraron altos niveles de flujo genético de *P. verrucosa* en todas las localidades del Pacífico mexicano, lo que podría indicar éxito en el flujo larvario. Sin embargo como se mencionó anteriormente, en el Pacífico mexicano no se han observado plánulas de *Pocillopora*, por lo que el flujo genético no puede ser totalmente atribuido a los niveles actuales de migración (flujo larvario) sino a la transferencia o intercambio ocurrido a lo largo de muchas generaciones. Es importante resaltar que estos resultados deben de tomarse con cautela debido a que el análisis utilizado para estimar el Nm es un estimador dependiente de los valores del Φ_{ST} , y por otra parte los resultados obtenidos a partir de las simulaciones MCMC no fueron consistentes en todas las simulaciones.

VIII.4.3. Rutas de dispersión de acuerdo a los patrones de circulación oceanográfica

Las características oceanográficas (corrientes oceánicas) tienen un papel importante en el transporte larvario, facilitando el flujo de organismos marinos a través de miles de kilómetros (Palumbi, 1995; Harii *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos estudios sobre la dispersión de invertebrados sésiles marinos han mostrado que la capacidad de transferencia de larvas a grandes distancias geográficas no necesariamente equivale a un flujo genético exitoso (Vermeij, 1987). Tomando en cuenta los altos valores de flujo genético encontrados en este trabajo, se podría inferir que *P. verrucosa* tiene un gran éxito en el flujo larvario en esta región del Pacífico. Esto podría ser cierto si las larvas tuvieran condiciones fisiológicas que les permitieran transportarse en largas distancias geográficas y si los patrones de corrientes oceanográficas beneficiaran este transporte. En experimentos realizados en laboratorio se ha observado que las plánulas de *P. damicornis* pueden llegar a vivir hasta 212 días, además de que pueden pasar por el proceso de metamorfosis después de 103 días y que incluso ésta puede ocurrir antes del asentamiento, permitiéndoles desplazarse distancias mayores (Richmond, 1987; Harii *et al.*, 2002). Aunado a esto, algunos modelos de la hidrodinámica de arrecifes coralinos sugieren que las larvas pueden ser transportadas a través de grandes distancias (aproximadamente 300km) (Roberts 1998) si se toma en cuenta la velocidad típica de las corrientes superficiales (0.25 a 0.5m/seg) y el tiempo de vida de las plánulas (en *Pocillopora* hasta 212 días).

A pesar de que algunos trabajos sugieren que la dirección del flujo genético frecuentemente no concuerda con los patrones oceanográficos locales (Takabayashi *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 1999), en este trabajo se pudo observar una cierta concordancia entre los patrones de flujo genético de *P. verrucosa* y la hidrodinámica del Pacífico mexicano.

Una posible ruta de dispersión es generada por la Corriente de Costa Rica (dirección sur-norte) la cual ocasiona el transporte de propágulos coralinos desde Centroamérica hasta Oaxaca, de igual forma la dispersión podría ocurrir desde Oaxaca hasta el Golfo de California (Carriquiry y Reyes-Bonilla, 1997; Reyes-Bonilla y López-Pérez, 1998; Glynn y Ault, 2000). Sin embargo, es probable que no todas las especies puedan realizar una dispersión o colonización mediante esta trayectoria debido a que existen frentes oceánicos al sur de Bahía de Banderas y en la entrada del Golfo de California (Cano-Pérez, 1991). A pesar de que en este trabajo no se logró obtener información de las muestras provenientes de

Oaxaca, lo mencionado anteriormente podría explicar el mayor porcentaje de haplotipos privados encontrados en la localidad más sureña (Ixtapa). Asimismo, explicaría el motivo por el cual se presentaron los mayores valores de flujo de Ixtapa con dirección hacia Islas Marías y Cabo Pulmo, así como de Islas Marietas hacia La Paz.

Por otra parte, las altas diversidades haplotípicas observadas en las localidades de Baja California Sur podrían estar relacionadas con dispersión larvaria proveniente de las Islas Revillagigedo. Una de las hipótesis más aceptadas sobre el origen biogeográfico de los corales del Pacífico oriental es la dispersión a larga distancia proveniente de las islas del Pacífico central, teniendo que las comunidades del Pacífico oriental están compuestas fundamentalmente por especies inmigrantes del Pacífico central (Dana, 1975). Las posibilidades de dispersión desde el Indo-Pacífico se atribuyen a la Contracorriente Ecuatorial del Norte, la cual se divide en dos partes durante el verano, una que se dirige hacia Centroamérica y la otra hacia el Atolón Clipperton, las Islas Revillagigedo y México (Reyes-Bonilla y López-Pérez, 1998). Aunado a esto, es posible que esta ruta de dispersión larvaria se vea incrementada cuando se presenta la Oscilación Sureña de El Niño (ENSO) debido al movimiento de grandes volúmenes de agua en dirección Oeste-Este (Dana, 1975; Richmond y Hunter, 1990).

En varias de las simulaciones MCMC se pudo observar una tendencia de altas tasas de migración de Loreto hacia otras localidades, principalmente hacia Cabo Pulmo y hacia el complejo de Islas (Apéndice 4). Esto es posible si se considera otra ruta de dispersión desde el Golfo de California hacia Bahía de Banderas (Reyes-Bonilla y López-Pérez, 1998). Esta ruta puede ser posible por la corriente superficial que fluye hacia el sur por el extremo occidental del golfo durante el invierno y hacia el norte por el verano, así como por los giros ciclónicos y anticiclónicos que ocurren en la entrada del Golfo de California (Álvarez-Borrego, 2002).

Tomando en cuenta que la fragmentación puede ser el principal modo reproductivo de *P. verrucosa* en el Pacífico mexicano, de acuerdo a los resultados encontrados en este trabajo (frecuencias haplotípicas) y a la biología reproductiva reportada para esta especie, resulta difícil explicar el alto flujo genético por dispersión de fragmentos. A pesar de que no se han realizado muchos trabajos sobre la diversidad y capacidad de dispersión de organismos clonales, Stoddart (1984) observó que la dispersión de clones sólo fue efectiva a

través de distancias geográficas muy cortas, lo cual no coincidiría con lo encontrado en el presente trabajo.

VIII.5. Aislamiento por distancia y patrones filogeográficos

En el presente trabajo las diferencias genéticas entre las comunidades de *P. verrucosa* en el Pacífico mexicano no se ajustaron a un modelo de aislamiento por distancia ($r = 0.02$, $p > 0.05$), ya que no se encontró una correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas. Esto coincide con lo reportado para *Pavona gigantea* en la misma zona de estudio, para la cual las diferencias genéticas tampoco se ajustaron al modelo de aislamiento por distancia ($r = -0.11$, $p > 0.05$), (Saavedra-Sotelo, 2007). Por el contrario, Paz-García (2009) encontró en *Porites panamensis* una correlación entre el F_{ST} y la distancia geográfica lo que representa un aislamiento por distancia, teniendo que las poblaciones más lejanas fueron las más diferenciadas genéticamente ($r^2 = 0.50$, $p < 0.05$).

En cuanto a los patrones filogeográficos de especies coralinas en el Pacífico oriental, se ha encontrado que *P. damicornis* y *P. panamensis* presenta grandes diferencias entre las poblaciones norteñas (Golfo de California) y las poblaciones sureñas (Oaxaca), esto a través de análisis de agrupamiento basados en las distancias genéticas (Chávez-Romo et al., 2008; Paz-García, 2009). Por otra parte Saavedra-Sotelo (2007) no observó la presencia de un patrón entre la filogenia de los haplotipos y la ubicación de las comunidades arrecifales (método Neighbor- Joining). Esto coincide con lo encontrado en este trabajo para *P. verrucosa*, ya que debido a la baja divergencia entre los haplotipos no se obtuvo la suficiente resolución para identificar patrones filogeográficos (método Neighbor-Joining y Máxima Parsimonia). La baja divergencia encontrada entre los haplotipos en este trabajo se puede explicar por lo reportado por algunos autores, que han encontrado que para algunas especies coralinas las regiones ITS del ADNr son útiles para establecer patrones de estructura y filogeografía a nivel interespecífico, sin embargo para relaciones intraespecíficas podría resultar poco útil (Ridgway, 2002; Álvarez y Wendel, 2003; Vollmer y Palumbi, 2007; Flot et al., 2008).

VIII.6. Demografía histórica

El análisis de la distribución de diferencias interhaplotípicas mostró dos patrones de comportamiento histórico entre las comunidades arrecifales del Pacífico mexicano. Por una parte, se encontró que Ixtapa e Islas Marías no se ajustaron al modelo de expansión repentina, lo que indica que posiblemente estas comunidades han permanecido estables a través del tiempo o bien que si han sufrido fluctuaciones demográficas, la señal se ha visto diluida por otros procesos evolutivos como la migración. Para el caso de estas dos localidades, la posible dispersión de propágulos coralinos desde Centroamérica hacia las comunidades arrecifales más sureñas de México (Reyes-Bonilla y López-Pérez, 1998) podría representar uno de los factores que contribuyeron a la estabilidad genética a través del tiempo de estas localidades. Esto debido a que si una comunidad coralina tiene una mayor capacidad de ser recolonizada, ésta podría ser menos susceptible a los cambios en su ambiente y presentar una mayor capacidad de recuperación después de un disturbio.

En Ixtapa fue donde se presentó el mayor número de haplotipos (15), el mayor porcentaje de haplotipos privados (53%), una de las mayores diversidades genéticas y las mayores tasas de flujo genético con dirección sur-norte. Tomando en cuenta que estas características pueden generar una mayor capacidad de resistencia y resiliencia de *P. verrucosa* a condiciones de deterioro, estos pudieron ser los factores que ocasionaron que esta especie haya permanecido estable genéticamente a través del tiempo en esta comunidad coralina. En el caso de Islas Marías, fue donde se presentó el menor número de haplotipos (4) y la diversidad genética más baja. Una posible explicación a este resultado podría ser el hecho de que los menores niveles de diversidad genética encontrados no representan la realidad de los patrones de diversidad en esta región, sino que se encuentran subestimados por el análisis de un menor tamaño de muestra (n=16) en comparación con los demás (n=20-38). Por otra parte, el que se haya presentado una de las mayores tasas de flujo genético de Ixtapa hacia Islas Marías, podría indicar que Islas Marías ha permanecido estable genéticamente debido principalmente a la influencia por flujo genético de localidades estables como Ixtapa.

Por otra parte, se encontró que para *P. verrucosa* las localidades de Baja California Sur, Isla Isabel e Islas Marietas aún conservan señales de una expansión demográfica. Esta expansión puede ser el resultado de la recuperación de estas comunidades arrecifales

después de eventos de mortandad, lo cual resulta consistente si se toma en cuenta que en el Pacífico mexicano las comunidades arrecifales se ven afectadas principalmente por la presencia de huracanes y por el evento de la alteración del sistema global océano-atmósfera denominado Oscilación del Sur El Niño (ENSO), éste ocasiona un incremento en la temperatura del agua del Pacífico oriental debido al desplazamiento de aguas cálidas desde el oeste hacia el este, teniendo un gran impacto sobre los sistemas arrecifales (Thomson *et al.*, 2003; Ware, 1995). Estos eventos naturales pueden tener un impacto distinto en cada una de las comunidades arrecifales del Pacífico mexicano, lo cual podría asociarse a la presencia de dos patrones de demografía histórica entre las localidades.

Los análisis de demografía histórica sugieren que el crecimiento poblacional en Baja California Sur e Islas Marietas ha sido pequeño ($\theta_1/\theta_0 = 3.65 \times 10^5$) en comparación con el incremento poblacional ocurrido en Isla Isabel ($\theta_1/\theta_0 = 9.99 \times 10^9$). La diferencia en los crecimientos poblacionales se debe principalmente a las capacidades de recuperación que presenta cada sistema. Existen diversos factores que pueden influir en la capacidad de recuperación de una comunidad arrecifal:

- 1) La presencia de condiciones oceanográficas adecuadas para la recuperación, ya que de acuerdo a Ulloa-López (2004), las condiciones oceanográficas del Pacífico oriental son cercanas a las ideales para *P. verrucosa*.

- 2) La diversidad genética y los niveles de conectividad demográfica de los corales entre las localidades, ya que las tasas de reclutamiento varían en espacio y tiempo, especialmente después de disturbios (Connell *et al.*, 1997).

- 3) La diversidad de los simbiontes, ya que diversos estudios han encontrado que la diversidad de las zooxantelas juegan un papel clave en la resistencia y resiliencia de los corales a eventos de blanqueamiento, debido a que los corales tienen el potencial de asociarse con uno o varios tipos de zooxantelas que presenten una mayor tolerancia a cambios en la temperatura (Herre *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2001; West y Salm, 2003; van Oppen, 2007). En el Pacífico se ha encontrado que los clados de zooxantelas (*Symbiodinium*) más abundantes son el C y D (Knowlton y Rohwer, 2003), asimismo Iglesias-Prieto y colaboradores (2004) encontraron que *P. verrucosa* generalmente presenta zooxantelas del clado D, el cual ha mostrado ser uno de los clados más termotolerantes.

VIII.7. Posibles explicaciones de los resultados obtenidos con el ITS2

Tomando en cuenta todas las características biológicas de *P. verrucosa*, los resultados encontrados en cuanto a la genética poblacional en otras especies coralinas, las características oceanográficas del Pacífico oriental y los resultados de estudios genéticos que han utilizado las regiones ITS del ADNr que se mencionaron anteriormente, se pueden inferir tres posibles escenarios para explicar los resultados obtenidos en este trabajo:

1) Que efectivamente exista una homogeneidad genética entre las comunidades de *P. verrucosa* en el Pacífico mexicano.

Los resultados obtenidos para las comparaciones pareadas, después de la corrección secuencial de Bonferroni, con el locus ITS2 sugieren que *P. verrucosa* forma una población homogénea genéticamente a lo largo del Pacífico mexicano, lo que es sustentado por los altos valores de flujo genético y la baja divergencia observada entre los haplotipos en los árboles filogenéticos. El aceptar esta inferencia, implica que en la prueba global se está cometiendo un error de tipo I (rechazar una H_0 verdadera), lo cual podría haber ocurrido por la probabilidad existente de elegir una muestra externa al azar que haya caído dentro de la región de rechazo de la distribución de probabilidad del Φ_{ST} .

A pesar de que los corales son organismos sésiles y que la conectividad demográfica depende esencialmente del flujo larvario, en algunos organismos invertebrados marinos se ha encontrado homogeneidad genética y un alto grado de conectividad entre poblaciones separadas por cientos o miles de kilómetros (Benzie *et al.*, 1995; Doherty *et al.*, 1995; Shulman y Bermingham 1995; Williams y Benzie, 1996; Ridgway *et al.*, 2001; Takabayashi *et al.*, 2003). Si se toma en cuenta que las características fisiológicas de las plánulas de algunas especies de *Pocillopora* tienen la capacidad para poder desplazarse grandes distancias geográficas (cientos de kilómetros) y sobrevivir (Richmond, 1987; Harrison y Wallace 1990; Harii *et al.*, 2002) aunado a que en este trabajo se observó que los patrones de flujo genético de *P. verrucosa* concordaban en cierta forma con la hidrodinámica del Pacífico mexicano, existe la posibilidad de que se haya dado una dispersión larvaria durante algunas generaciones que produjera la homogeneidad genética observada, ya que el flujo de un migrante por generación es suficiente para impedir la fijación de alelos por deriva genética entre poblaciones (Avise, 2004).

No obstante, en el Pacífico mexicano no se han podido observar la formación de plánulas de especies de *Pocillopora* lo cual es el principal problema para aceptar esta explicación de los resultados. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que el hecho de que no se hayan observado plánulas en campo no significa estrictamente que no exista reproducción sexual, pero suponiendo que realmente la reproducción sexual no fuera efectiva para esta especie en esta región, existen otras posibilidades de intercambio genético que podrían explicar la homogeneidad encontrada y que no necesariamente involucra la dispersión larvaria. Dadas las características físicas de *P. verrucosa* es muy fácil que las ramificaciones de una colonia se puedan fragmentar, si estas se pudieran adherir a sustratos que posteriormente son removidos por las corrientes oceanográficas, estos propágulos podrían transportarse hacia otras regiones geográficas por rafting o balseo. Jokiel (1990) encontró colonias de especies de *Pocillopora* adheridas a material flotante y a instrumentos de pesca, concluyendo a partir del cálculo de las tasas de crecimiento que estas colonias podrían desplazarse por distancias de 20, 000 a 40, 000 km durante su ciclo de vida. Por lo mencionado anteriormente, existe la posibilidad de que *P. verrucosa* forme una sola población genéticamente homogénea a lo largo del Pacífico mexicano.

2) Que sí existe heterogenidad genética entre las comunidades de *P. verrucosa* en el Pacífico mexicano (no hay panmixia) y que la homogeneidad genética encontrada al hacer las comparaciones pareadas es el resultado de haber analizado una gran cantidad de colonias clonales.

El análisis global del índice de fijación reveló la existencia de estructura genética entre las comunidades de *P. verrucosa* del Pacífico mexicano. A pesar de que la historia geográfica de cada región, así como las características biológicas de cada especie generan distintos patrones de diferenciación genética, la mayoría de los trabajos realizados en otras especies coralinas y en otros invertebrados marinos, han encontrado un alto grado de diferenciación genética aún entre poblaciones cercanas geográficamente (Stoddart, 1984; Hoftman, 1986; Ayre y Dufty, 1994; Benzie *et al.*, 1995; Ayre *et al.*, 1997; Adjeroud y Tsuchiya, 1999; Ayre y Hughes, 2000; Ayre y Hughes, 2004; Miller y Ayre, 2004; Magalon *et al.*, 2005). En cuanto los patrones de diferenciación genética en las costas en el Pacífico mexicano, en varios grupos de peces, invertebrados marinos y en los tres trabajos realizados

en corales se ha encontrado una clara subdivisión poblacional y bajos niveles de flujo genético (Medina y Walsh, 2000; Riginos y Nachman, 2001; Valles-Jimenez *et al.*, 2005; Licona-Chávez *et al.*, 2007).

En el presente trabajo se obtuvo un mayor porcentaje de haplotipos privados, no obstante, la frecuencia de los haplotipos compartidos fue mucho mayor que la de los privados, principalmente la del haplotipo IT-3 el cual representó más del 0.5 de la frecuencia de todos los haplotipos. A pesar de que sólo se analizó un locus, la alta frecuencia de los haplotipos compartidos puede ser atribuida a la toma de muestras de colonias clonales, ya que de acuerdo a las características físicas de *P. verrucosa* y a las altas frecuencias encontradas en algunos haplotipos, se puede inferir que la reproducción asexual por fragmentación es la principal estrategia reproductiva de esta especie. Es importante destacar que para las tres especies coralinas que se han estudiado en el Pacífico mexicano las frecuencias entre los haplotipos o alelos (tanto privados como compartidos) de cada especie por localidad fueron relativamente homogéneas. Sin embargo, en *P. verrucosa* la frecuencia de un sólo haplotipo (IT-3) fue mayor a las frecuencias de los demás haplotipos por localidad (Saavedra-Sotelo, 2007; Chavéz-Romo *et al.*, 2008; Paz-García, 2009).

Asumiendo que se hayan analizado una gran proporción de colonias clonales, los resultados de las comparaciones pareadas del índice de fijación (después de la corrección de Bonferroni) se pudieron haber visto afectados por la alta frecuencia que presentó un haplotipo y no necesariamente estén reflejando la presencia de altos niveles de conectividad demográfica. Algunos estudios sobre la dispersión de invertebrados sésiles marinos han mostrado que la capacidad de transferencia de larvas a grandes distancias geográficas no siempre es exitosa, aunado a que algunos trabajos sugieren que la dirección del flujo genético frecuentemente no concuerda con los patrones oceanográficos locales (Vermeij, 1987; Benzie *et al.*, 1995; Takabayashi *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 1999). Por otra parte, tomando en cuenta que la fragmentación es el principal modo reproductivo en esta zona del Pacífico, la dispersión de propágulos vegetativos puede ser efectiva sólo a distancias geográficamente cortas, ya que a grandes distancias podría resultar no efectiva.

3) Que la aparente homogeneidad genética y alta conectividad demográfica sean el resultado de un insuficiente polimorfismo (baja tasa mutacional) de la región ITS2 (ADNr) para detectar diferencias genéticas entre las distintas comunidades coralinas.

Uno de los principales problemas en los estudios de genética poblacional es la selección de marcadores moleculares, ya que en muchas ocasiones los loci seleccionados pueden presentar una baja resolución para realizar análisis intrapoblacionales (Awise, 1994). A pesar de que las regiones ITS (ADNr) han sido ampliamente utilizadas para estudios de genética inter e intrapoblacional poblacional en varios organismos, en las últimas décadas la utilidad de estos loci ha sido cuestionada por diversos autores (Vollmer y Palumbi, 2004; Wei *et al.*, 2006; Álvarez y Wendel, 2003; Ridgway, 2002).

Uno de los principales problemas que se ha encontrado al utilizar estas regiones en especies coralinas y principalmente en especies del género *Pocillopora* es la presencia de múltiples bandas por organismo (Chen *et al.*, 2004; Magalon *et al.*, 2004; Combosch *et al.*, 2008; Flot *et al.*, 2008). Quijada y colaboradores (1997) mencionan que a pesar de que estas regiones pueden presentar codominancia mendeliana, es muy difícil poder determinar si los individuos son homocigotos o heterocigotos debido al efecto de la evolución coordinada, esto explica el hecho de que en este trabajo se hayan obtenido múltiples bandas por colonia en el ITS1 y en algunas colonias del ITS2.

Es importante mencionar que la utilidad de las regiones ITS pueden variar entre las especies, teniendo que se pueden presentar altos o bajos niveles de polimorfismo entre diferentes linajes coralinos (Hillis y Dixon, 1991; Vollmer y Palumbi, 2004). Para el caso específico de *P. verrucosa*, los estudios realizados con las regiones ITS muestran que éstas son útiles, principalmente a nivel interespecífico. Ridgway (2002) encontró que la región del ITS1 no fue útil para establecer patrones de flujo de esta especie al Sur de África. En trabajos recientes realizados con varias especies de *Pocillopora*, utilizando tanto el ITS1 como el ITS2, pudieron identificar patrones de estructura genética y filogeográficos sugiriendo que estos loci son útiles para estudios interespecíficos (Combosch *et al.*, 2008; Flot *et al.*, 2008).

En el presente trabajo se encontró la presencia de microsatélites en el ITS1 e ITS2, lo cual se ha reportado para varias especies de *Pocillopora* en las que las repeticiones

nucleotídicas puede ocasionar complicaciones para el análisis de secuencias (Chen *et al.*, 2004; Magalon *et al.*, 2004; Combosch *et al.*, 2008; Flot *et al.*, 2008).

Por lo mencionado anteriormente, es posible que para la región del ITS2 de *P. verrucosa* todavía no haya transcurrido el tiempo suficiente para que las comunidades hayan divergido una de otra en el Pacífico mexicano.

IX. Conclusiones y perspectivas sobre la investigación

El locus ITS2 mostró un nivel significativo de estructura genética entre las localidades de *Pocillopora verrucosa* del Pacífico Mexicano, sin embargo los niveles de diferenciación interdémica fueron insuficientes para mantener la significancia de todas ellas después de aplicar la corrección de pruebas múltiples. A pesar de que se presentaron altos niveles de flujo genético y una cierta concordancia con los patrones de la hidrodinámica del Pacífico mexicano, de acuerdo al índice de fijación global existe una desviación significativa del estado de panmixia. Es importante mencionar que las inferencias hechas a partir de las secuencias del ADNr de este trabajo constituyen una primera aproximación, ya que el análisis de un sólo gen puede ser insuficiente para evaluar los patrones y procesos que determinan la conectividad de *P. verrucosa* a lo largo del Pacífico mexicano.

Para poder esclarecer los patrones de conectividad demográfica de *P. verrucosa* en el Pacífico mexicano y con esto poder definir los patrones de divergencia del ITS2 se requiere un estudio comparativo con otros marcadores, ya que entre más genes se estudien las interpretaciones sobre la conectividad demográfica serán más claras. Asimismo, es necesario obtener información sobre la diversidad genética y conectividad demográfica de *P. verrucosa* en otras localidades importantes en la distribución de esta especie en el Pacífico mexicano, como Oaxaca e Islas Revillagigedo. Por otra parte, es indispensable homogeneizar el tamaño de muestras de cada localidad, ya que esto disminuye el sesgo. Finalmente, a pesar de que la predominancia de un haplotipo apoya la hipótesis de que la reproducción asexual por fragmentación es la principal estrategia reproductiva para el mantenimiento de las comunidades de especies de *Pocillopora* en el Pacífico mexicano, es necesario realizar más estudios sobre la biología reproductiva de *P. verrucosa* en esta región del Pacífico, para verificar si realmente no hay producción de plánulas en esta especie.

X. Literatura citada

- Adjeroud, M. y M. Tsuchiya. 1999. Genetic variation and clonal structure in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* in the Ryukyu Archipelago, southern Japan. *Marine Biology*. 134:753-760.
- Alvarez-Borrego, S. 2002. Physical oceanography. En: Case T., M. Cody y E. Ezcurra (eds.). *Island Biogeography of the Sea of Cortés*. Oxford University Press, Oxford, 41–59 p.
- Álvarez, I. y J. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 29:417-434.
- Avise, J. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sinauer Associates Inc. Second Edition. Massachusetts. 684 pp.
- Ayre, D. y S. Dufty. 1994. Evidence for restricted gene flow in the viviparous coral *Seriatopora hystrix* on Australia's Great Barrier Reef. *Evolution*. 48:1183–1201.
- Ayre, D., T. Hughes y R. Standdish. 1997. Genetic differentiation, reproductive mode, and gene flow in the brooding coral *Pocillopora damicornis* along the Great Barrier Reef, Australia. *Marine Ecology Progress Series*. 159:175-187.
- Ayre, D. y T. Hughes. 2000. Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning along The Great Barrier Reef, Australia. *Evolution*. 54(5):1590-1605.
- Ayre, D. y T. Hughes. 2004. Climate change, genotypic diversity and gene flow in reef-building corals. *Ecology Letters*. 7(4):273-278.
- Benzie, J., A. Haskell y H. Lehman. 1995. Variation in the genetic composition of coral (*Pocillopora damicornis* and *Acropora palifera*) populations from different reef habitats. *Marine Biology*. 121:731-739.
- Berli, P. 2004. MIGRATE Version 2.0: Migrate documentation. <http://popgen.csit.fsu.edu/migrate/download.html>. Julio 2009.
- Bohonak, A. 2002. IBD (Isolation By Distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*. 93:153-154.
- Brown, W., C. George y A. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 76:1967-1971
- Calderón-Aguilera, L., H. Reyes-Bonilla, R. López-Pérez, A. Cupul-Magaña, M. Herrero-Perezrul, J. Carriquiry y P. Medina-Rosas. 2009. Fauna asociada a arrecifes coralinos del Pacífico mexicano. *Ciencia y Desarrollo*. 35 (230):39-45.

- Carlson, D. 1999. The evolution of mating systems in tropical reef corals. *Trends in Ecology and Evolution*. 12: 459-495.
- Carriquiry, J. y H. Reyes-Bonilla. 1997. Estructura de la comunidad y distribución geográfica de los arrecifes coralinos de Nayarit, Pacífico de México. *Ciencias Marinas*. 23(2):227-248.
- Cano-Pérez, F. 1991. Golfo de California: Oceanografía física. En: G. Lanza-Espino, (ed.). Oceanografía de mares mexicanos. AGT Editor. México. 453-495 p.
- Chadwick-Furman, N. 1996. Reef coral diversity and global change. *Global Change Biology*. 2(6):559-568.
- Chávez-Romo, H. 2004. Biología reproductiva de *Pocillopora damicornis* en Punta Gaviotas, Bahía de la Paz, Baja California Sur, México. Tesis de Licenciatura. UABCS. 72 pp.
- Chávez-Romo, H. y H. Reyes-Bonilla. 2007. Reproducción sexual del coral *Pocillopora damicornis* al sur del Golfo de California, México. *Ciencias Marinas*. 33(4):495-501.
- Chávez-Romo, H., F. Correa-Sandoval, D. Paz-García, H. Reyes-Bonilla, R. López-Pérez, P. Medina-Rosas y M. Hernández-Cortés. 2008. Genetic structure of the scleractinian coral, *Pocillopora damicornis*, from the Mexican Pacific. *Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium*. 6 pp.
- Chen, C., C. Chang, N. Wei, Y. Lein, H. Lin, C. Dai y C. Wallace. 2004. Secondary structure and phylogenetic utility of the ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) in Scleractinian Corals. *Zoological Studies*. 43(4):759-771.
- Combosch, D., H. Guzman, H. Schuhmacher y S. Vollmer. 2008. Interspecific hybridization and restricted trans-Pacific gene flow in the Tropical Eastern Pacific *Pocillopora*. *Molecular Ecology*. 17:1304-1312.
- Concepcion, G., M. Medina y R. Toonen. 2006. Noncoding mitochondrial loci for corals. *Molecular Ecology Notes*. 6:1208-1211.
- Connell, J., T. Hughes y C. Wallace. 1997. A 30-year study of coral abundance, recruitment and disturbance at several scales in space and time: influence of disturbance & recruitment on abundance, at several scales in space and time. *Ecological Monographs*. 67:461-488.
- Dai, C., T. Fan y J. Yu. 2000. Reproductive isolation and genetic differentiation of a scleractinian coral *Mycedium elephantotus*. *Marine Ecology Progress Series*. 201:179-187.
- Dana, T. 1975. Development of contemporary eastern Pacific coral reefs. *Marine Biology*. 33:355-374.

- Dayton, P., S. Thrush, M. Agardy y R. Hofman. 1995. Environmental effects of marine fishing. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 5 (3):205-232.
- Doherty, P., S. Planes y P. Mather. 1995. Gene flow and larval duration in seven species of fish from the Great Barrier Reef. *Ecology*. 76:2373-2391.
- Doyle, J. y J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*. 19:11-15.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2006. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1: 47-50.
- Fautin, D. 2002. Reproduction of Cnidaria. *Canadian Journal of Zoology*. 80: 1735-1754.
- Flot, J. y S. Tillier. 2007. The mitochondrial genome of *Pocillopora* (Cnidaria: Scleractinia) contains two variable regions: The putative D-loop and a novel ORF of unknown function. *Gene*. 401(1): 80-87.
- Flot, J., H. Magalon, C. Cruaud, A. Couloux y S. Tillier. 2008. Patterns of genetic structure among Hawaiian corals of the genus *Pocillopora* yield clusters of individuals that are compatible with morphology. *Comptes Rendus Biologies*. 331:239-247.
- Fukami, H., A. Budd, G. Paulay, A. Sole-Cava, C. Chen, K. Iwao y N. Knowlton. 2004. Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals. *Letters Nature*. 427:832-835.
- Gay, S. y J. Andrews. 1994. The effects of recruitment strategies on coral larvae settlement distributions at Helix Reef. En: P. Sammarco y M. Heron. Coastal and estuarine studies: The Bio-Physics of marine larval dispersal. American geophysical Union. USA. 352 pp.
- Glynn, P. 1991. Coral reef bleaching in the 1980's and possible connections with global warming. *Trends in Ecology and Evolution*. 6:175-179.
- Glynn, P. 1996. Coral reef bleaching: facts, hypothesis and implications. *Global Change Biology*. 2:495-509.
- Glynn, P., N. Gassman, C. Eakin, J. Cortes, D. Smith y H. Guzman. 1991. Reef coral reproduction in the eastern Pacific: Costa Rica, Panama, and Galapagos Islands (Ecuador). Pocilloporidae. *Marine Biology*. 109:355-368.
- Glynn, P. W. y J. S. Ault. 2000. A biogeographic analysis and review of the far eastern Pacific coral reef region. *Coral Reefs*. 19:1-23.

- Golbuu, Y., S. Victor, L. Penland, D. Idip, C. Emaurois, K. Okaji, H. Yukihiro, A. Iwase y R. van Woesik. 2007. Palau's coral reefs show differential habitat recovery following the 1998-bleaching event. *Coral Reefs*. 26:319–332.
- Gutiérrez-Flores, C. 2007. Estructura genética poblacional de la sardina del Pacífico Nororiental *Sardinops sagax caeruleus*. Tesis de Maestría. CICESE. 102p.
- Guzman, H., y J. Cortés. 2007. Reef recovery 20 years after the 1982–1983 El Niño massive mortality. *Marine Biology*. 151:401–411.
- Harii, S., H. Kayanne, H. Takigawa, T. Hayashibara y M. Yamamoto. 2002. Larval survivorship, competency periods and settlement of two brooding corals, *Heliopora coerulea* and *Pocillopora damicornis*. *Marine Biology*. 141:39–46.
- Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*. 66(4):591-600.
- Harrison, P. y C. Wallace. 1990. Reproduction, dispersal and recruitment of scleractinian corals. En: Z. Dubinsky (ed.). *Ecosystems of the World: Coral reefs*. Elsevier. 133-207 p.
- Hartl, D. y A. Clark. 1997. *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Sunderland. Tercera edición. Massachusetts. 542 pp.
- Hawkins, J., R. Callum, T. Hof, K. De Meyer, J. Tratalos y C. Aldam. 1999. Effects of Recreational Scuba Diving on Caribbean Coral and Fish Communities. *Conservation Biology*. 13(4):888-897.
- Hedrick, P. 2000. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers. Boston. 545 pp.
- Hellberg, M. 2006. No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *Evolutionary Biology*. 6: 24-28.
- Hellberg, M. 2007. Footprints on water: the genetic wake of dispersal among reefs. *Coral Reefs*. 26:463–473.
- Hellberg, M., R. Burton, J. Neigel y S. Palumbi. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*. 70(1):273-290.
- Herre, E., N. Knowlton, U. Mueller y S. Rehner. 1999. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends in Ecology and Evolution*. 14(2):49-53.
- Hillis, D. y M. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*. 66:411–453.

- Hodgson, G. 1990. Sediment and the settlement of larvae of the reef coral *Pocillopora damicornis*. *Coral Reefs*. 9:41-43.
- Hoffmann, R. J. 1986. Variation in the contributions of asexual reproduction to the genetic structure of populations of the sea anemone *Metridium senile*. *Evolution*. 40:357-365.
- Hughes, T., D. Ayre y J. Connell. 1992. The evolutionary ecology of corals. *Trends in Ecology and Evolution*. 7(9):292-295.
- Hughes, T. y J. Connell. 1999. Multiple stressors on coral reefs: A long-term perspective. *Limnology Oceanographic* 44:932-940.
- Hughes, T., A. Baird, D. Bellwood, M. Card, S. Conolly, C. Folke, R. Grosberg, O. Hoegh-Guldberg, J. Jackson, J. Kleypas, J. Lough, P. Marshall, M. Nyström, S. Palumbi y J. Pandolfi. 2003. Climate change, humans impacts, and the resilience of coral reefs. *Science*. 301:929-933.
- Iglesias-Prieto, R., V. Beltran, T. LaJeunesse, H. Reyes-Bonilla y P. Thome. 2004. Different algal symbionts explain the vertical distribution of dominant reef corals in the eastern Pacific. *Proceedings of the Royal Society of London Series Biological Sciences*. 271(1549):1757-1763.
- Jimenez, C. y J. Cortés. 2003. Coral cover change associated to El Niño, eastern Pacific, Costa Rica, 1992-2001. *Marine Ecology*. 24(3):179-192.
- Jokiel, P. 1990. Long-distance dispersal by rafting: re-emergence of an old hypothesis. *Endeavour*. 14:66-73.
- Jordan, D. 1993. Atlas de los arrecifes coralinos del caribe mexicano. Parte I. El sistema continental. Instituto de ciencias del Mar y Limnología. UNAM. México. 110 pp.
- Kessler, W.S. 2006. The circulation of the eastern tropical Pacific: A review. *Progress in Oceanography*. 69:181-217.
- Knowlton, N. 2001a. Who are the players on coral reefs and does it matter? The importance of coral taxonomy for coral reef management. *Bulletin of Marine Science*. 69(2):305-308.
- Knowlton, N. 2001b. The future of coral reefs. *PNAS*. 98(10):5419-5425.
- Knowlton, N. y F. Rohwer. 2003. Multispecies microbial mutualisms on coral reefs: the host as habitat. *The American Naturalist*. 162:51-62.
- Kumar, S., K. Tamura y M. Nei. 2004. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequences alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 5:150-163.

- Liao, D. 1999. Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *The American Journal of Human Genetics*. 64:24-30.
- Licona-Chávez, A., F. Correa-Sandoval, J. de la Rosa-Vélez y F. Camarena-Rosales. 2007. Análisis genético y morfométrico de *Chione californiensis* y *C. subimbricata* (Bivalvia: Veneridae) del Pacífico oriental mexicano y el Golfo de California. *Ciencias Marinas*. 33(2):149–171.
- Lopez, J. y N. Knowlton. 1997. Discrimination of species in the *Montrastraea annularis* complex using multiple genetic loci. *Proc. 8th International Coral Reef Symposium*. 2:1613-1618.
- Magalon, H., S. Samadi, M. Adjeroud y M. Veuille. 2004. Development of coral and zooxanthella-specific microsatellites in three species of *Pocillopora* (Cnidaria, Scleractinia) from French Polynesia. *Molecular Ecology*. 4:206-208.
- Magalon, H., M. Adjeroud y M. Veuille. 2005. Patterns of genetic variation do not correlate with geographical distance in the reef-building coral *Pocillopora meandrina* in the South Pacific. *Molecular Ecology*. 14:1861-1868.
- Medina-Rosas, P. 2000. Reclutamiento de corales pétreos (Scleractinia) en los arrecifes coralinos de Jalisco y Nayarit, México. Tesis de Maestría. UABC. 58 pp.
- Medina, M. y P. Walsh. 2000. Comparison of four Mendelian loci of the California Sea Hare (*Aplysia californica*) from populations of the coast of California and the Sea of Cortez. *Marine Biotechnology*. 2:449-455.
- Miller, K. y D. Ayre. 2004. The role of sexual and asexual reproduction in structuring high latitude populations of the reef coral *Pocillopora damicornis*. *Heredity* 92:557-568.
- Moothien Pillay, K., T. Asahida, A. Chen, H. Terashima y H. Ida. 2006. ITS Ribosomal DNA Distinctions and the Genetic Structures of Populations of Two Sympatric Species of *Pavona* (Cnidaria: Scleractinia) from Mauritius. *Zoological Studies*. 45(1):132-144.
- Muller, W., F. Brummer, R. Batel, I. Muller y H. Schroder. 2003. Molecular biodiversity. Case study: Porifera (sponges). *Naturwissenschaften*. 90:103-120.
- Muscatine, L. 1990. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. En: Z. Dubinsky (ed.). *Coral Reefs: Ecosystems of the World*. Elsevier. Amsterdam. 75-87 p.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York. 512 pp.

- Palumbi, S. 1995. Using genetics as an indirect estimator of larval dispersal. En: L. McEdward (ed.). Ecology of marine invertebrate larvae. CRC Marine Science Series. New York. 369-388 p.
- Palumbi, S. 1997. Molecular biogeography of the Pacific. *Coral Reefs*. 16:S47-S52.
- Paz-García, D. 2009. Variación genética del coral *Porites panamensis* verrill, 1866 (Anthozoa: Scleractinia) en el Pacífico mexicano. Tesis de Maestría. UABC. 78 pp.
- Posada, D. y K. Crandall. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note*. 14(9):817-818.
- Quijada, A., A. Liston, W. Robinson y E. Alvarez-Buyalla. 1997. The ribosomal ITS región as a marker to detect hybridisation in pines. *Molecular Ecology*. 6:995-996.
- Reyes-Bonilla, H. y A. López-Pérez. 1998. Biogeografía de los corales pétreos (Scleractinia) del Pacífico de México. *Ciencias Marinas* 24: 211-224.
- Reyes-Bonilla, H., J. Carriquiry, G. Leyte-Morales y A. Cupul-Magana. 2002. Effects of the El Niño-Southern Oscillation and the anti-El Niño event (1997-1999) on coral reefs of the western coast of Mexico. *Coral Reefs*. 21(4):368-372.
- Reyes-Bonilla, H., L. Calderón-Aguilera, G. Cruz, P. Medina, R. López, M. Herrero, G. Leyte, A. Cupul y J. Carriquiry. 2005. Atlas de corales pétreos (Anthozoa: Scleractinia) del Pacífico mexicano. CICESE, CONABIO, CONACYT, UABCS, UMAR. México. 124 pp.
- Rice, W. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43(1):223-225.
- Richmond, R. 1987. Energetic relationships and biogeographical differences among fecundity, growth and reproduction in the reef coral *Pocillopora damicornis*. *Bulletin of Marine Science*. 42: 594-604.
- Richmond, R. y C. Hunter. 1990. Reproduction and recruitment of corals: comparisons among the Caribbean, the tropical Pacific and the Red Sea. *Marine Ecology Progress Series*. 60:185-203.
- Ridgway, T., O. Hoegh-Guldberg y D. Ayre. 2001. Panmixia in *Pocillopora verrucosa* from South Africa. *Marine Biology*. 139:175-181.
- Ridgway, T. 2002. Testing the applicability of molecular genetics markers to population analyses of Scleractinian corals. *Symbiosis*. 33:243-261.
- Riginos, C. y M. Nachman. 2001. Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Molecular Ecology*. 10:1439-1453.

- Roberts, C. 1998. Connectivity and management of Caribbean coral reefs. *Science*. 278:1454–1457.
- Rodríguez-Troncoso, A. 2004. Caracterización del ciclo reproductivo de *Pocillopora damicornis* en el arrecife de La Entrega, Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura. UMAR. 62 pp.
- Rodriguez-Lanetty, M., W. Loh, D. Carter y O. Hoegh-Guldberg. 2001. Latitudinal variability in symbiont specificity within the widespread scleractinian coral *Plesiastrea versipora*. *Marine Biology*. 138(6):1175–1182.
- Rodriguez-Lanetty, M. y O. Hoegh-Guldberg. 2002. The phylogeography and connectivity of the latitudinally widespread scleractinian coral *Plesiastrea versipora* in the Western Pacific. *Molecular Ecology*. 11:1177–1189.
- Rogers, A. R. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*. 49(4): 608-615.
- Rogers, A. y H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*. 9(3):552-569.
- Rozas, J., J. Sánchez-DelBarrio, X. Messeguer y R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
- Ruppert, E. y R. Barnes. 1996. Zoología de los invertebrados (Capítulo 4: Cnidarios y ctenóforos). Mc. Graw Hill Interamericana. México. 1114 pp.
- Saavedra-Sotelo, N. 2007. Estructura y flujo genético de *Pavona gigantea* (Anthozoa: Scleractinia) en las costas del pacífico mexicano. Tesis de Maestría. CICESE. 77 pp.
- Sánchez, J., J. Cadena, A. Grajales y I. Porto. 2005. ¿Por qué están muriendo los corales? Blanqueamiento coralino: causas, consecuencias e hipótesis. *Apuntes Científicos Uniandinos*. 5:13-22.
- Sandoval-Castillo, J. 2005. Estructura genética en poblaciones de batoideos dentro del Golfo de California y la costa del Pacífico de la península de Baja California. Tesis de Maestría. CICESE. 75 pp.
- Santos, S., D. Taylor y M. Coffroth. 2001. Genetic comparisons of freshly isolated versus cultured symbiotic dinoflagellates: implications for extrapolating to the intact symbiosis. *Journal of Phycology*. 37:900-912.
- Schlotterer, C., M. Hauser, A. von Haeseler y D. Tautz. 1994. Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*. 11:513-522.

- SEMARNAT-CONACYT. 2006. Convocatoria 2006/01. DEMANDAS ESPECÍFICAS DEL SECTOR. Tema general: Cambio global: análisis de las implicaciones socioambientales en México.
- Shearer, T., M. van Oppen, S. Romano y G. Rheide. 2002. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology*. 11:2475-2487.
- Shulman, M. y E. Bermingham. 1995. Early life histories, ocean currents, and the population genetics of Caribbean reef fishes. *Evolution*. 49:897-910.
- Sier, C. y P. Olive. 1994. Reproduction and reproductive variability in the coral *Pocillopora verrucosa* from the Republic of Maldives. *Marine Biology*. 118: 713-722.
- Slatkin, M. y R. Hudson. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*. 129:555- 562.
- Stoddart, J. 1984. Genetic Differentiation Amongst Populations of the coral *Pocillopora damicornis* off Southwestern Australia. *Coral Reefs*. 3:149-156.
- Swofford, D.L. 1998. PAUP Phylogenetic analysis using parsimony (and others Methods) Version 4. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Takabayashi, M., D. Carter, J. Lopez y O. Hoegh-Guldberg. 2003. Genetic variation of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*, from western Pacific reefs. *Coral Reefs*. 22:17-22.
- Takabayashi, M., D. Carter, S. Ward y O. Hoegh-Guldberg. 2006. Inter- and Intra-Specific Variability in Ribosomal DNA Sequence in the Internal Transcribed Spacer Region of Corals. *Proceedings of the Australian Coral Reef Society. 75th Anniversary Conferenc.* School of Marine Science. 241-248 p.
- Tilot, V., W. Leujak, R. Ormond, J. Ashworth y A. Mabrouk. 2008. Monitoring of South Sinai coral reefs: influence of natural and anthropogenic factors. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. 18(7):1109-1126.
- Thomson, A., R. Brown, N. Rosenberg, C. Izaurralde, D. Legler y R. Srinivasan. 2003. Simulated impacts of El Niño southern oscillation on United States water resources. *Journal of American Water Resources Association*. 39(1):137-148.
- Ulloa-López, C. 2004. Análisis del nicho de los corales zooxantelados del Pacífico mexicano. Tesis de Licenciatura. UNAM. 86 pp.
- Valles-Jimenez, R., P. Cruz y R. Perez-Enriquez. 2005. Population genetic structure of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from Mexico to Panama: microsatellite DNA variation. *Marine Biotechnology*. 6:475-484.

- Van Oppen, M. 2007. Perspective: Hidden diversity in coral endosymbionts unveiled. *Molecular Ecology*. 6(16):1125-1127.
- Vermeij, G. 1987. The dispersal barrier in the tropical Pacific: implications for molluscan speciation and extinction. *Evolution*. 41:1046–1058
- Veron, J. 2000. Corals of the World. Australian Institute of Marine Sciences. 463 pp.
- Vizcaíno-Ochoa, V. 2003. Biología reproductiva de tres especies de corales formadores de arrecifes en Bahía de Banderas, México. Tesis de Maestría. UABC. 73 pp.
- Vollmer, S. y S. Palumbi. 2004. Testing the utility of internally transcribed spacer sequences in coral phylogenetics. *Molecular Ecology*. 13:2763–2772.
- Vollmer, S. y S. Palumbi. 2007. Restricted Gene Flow in the Caribbean Staghorn Coral *Acropora cervicornis*: Implications for the Recovery of Endangered Reefs. *Journal of Heredity*. 98(1):40–50.
- Wei, N., C. Wallace, C. Dai, K. Moothien-Pillay y C. Chen. 2006. Analyses of the ribosomal internal transcribed spacers (ITS) and the 5.8s gene indicate that extremely high rDNA heterogeneity is a unique feature in the scleractinian coral genus *Acropora* (Scleractinia; Acroporidae). *Zoological Studies*. 45:404–418.
- Waller, R. y P. Tyler. 2005. The reproductive biology of two deep-water, reef-building scleractinians from the NE Atlantic Ocean. *Coral Reefs*. 24:514–522.
- Ware, D. 1995. A century and a half of change in the climate of the NE Pacific. *Fisheries Oceanography*. 4(4):267-277.
- West, J. y R. Salm. 2003. Resistance and resilience to coral bleaching: implications for coral reef conservation and management. *Conservation Biology*. 17(4):956-967.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, W.J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: M. Gelfand, D. Snninsky y T. White (eds.). PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press. San Diego. 315-322 p.
- Wilkinson, C. 2002. Status of coral reefs of the World: 2002. Australian Institute of Marine Science. Australia. 114 pp.
- Williams, S. y J. Benzie. 1996. Genetic uniformity of widely separated populations of the coral reef starfish *Linckia laevigata* from the East Indian and West Pacific Oceans, revealed by allozyme electrophoresis. *Marine Biology*. 126:99-107.
- Wilson, E. 1988. The hermatypic coral *Pocillopora* at Cabo San Lucas, México. *Bulletin Souther California Academic Science*. 87(2):79-83.

Wood, R. 2001. Biodiversity and the history of reefs. *Geological Journal*. 36(3):251-263.

Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. *Annals of Eugenics*. 15:323-354.

Yu, J., H. Wang, S. Lee y C. Dai. 1999. Genetic structure of a scleractinian coral, *Mycedium elephantotus*, in Taiwan. *Marine Biology*. 133(1):21-28.

XI. Apéndice

1. Sitios polimórficos en los 35 haplotipos del ITS2 de *Pocillopora verrucosa*, encontrados en las comunidades arrecifales del Pacífico mexicano. Los números representan la posición de la base en la secuencia de los haplotipos (5'→3').

Haplotipo	Posición del Nucleótido																		
	23	29	45	61	151-170	174	177	178	179	189	278	279	285	287	316	356	361	378	387
IT-1	T	G	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-2	T	C	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	G	A	G	G	A	A
IT-3	T	G	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-4	T	C	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-5	T	G	G	C	*	G	-	-	-	T	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-6	T	G	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-7	T	G	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-8	T	G	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	G	A	G	G	A	A
IT-9	C	G	G	C	*	G	-	-	-	C	G	A	C	A	T	G	G	A	A
IT-10	C	G	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-11	T	G	G	C	*	G	-	-	-	A	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-12	C	G	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-13	C	G	G	C	*	T	G	G	T	C	G	A	T	A	T	G	G	A	A
IT-14	C	G	G	T	*	G	-	-	-	T	G	A	T	A	T	G	G	A	A
IT-15	T	C	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-16	C	G	G	T	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	T	G	G	A	A
IT-17	C	G	G	C	*	G	G	G	T	C	G	A	T	A	A	G	G	G	A
IT-18	C	G	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	G	G	A
IT-19	T	C	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	A	A	A
IT-20	T	G	G	C	*	T	G	G	T	C	G	A	T	A	A	G	G	G	A
IT-21	C	G	G	T	*	G	-	-	-	C	G	A	T	A	T	G	G	A	A
IT-22	T	G	G	C	*	G	-	-	-	A	T	G	C	G	A	A	A	A	A
IT-23	T	G	G	T	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-24	C	G	G	C	*	T	G	G	T	C	G	A	T	A	A	G	G	A	A
IT-25	T	G	G	T	*	G	-	-	-	A	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-26	C	G	G	C	*	G	-	-	-	T	T	G	C	A	A	G	G	G	A
IT-27	T	G	G	T	*	G	G	T	G	A	T	G	C	A	A	A	A	A	A
IT-28	T	G	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	G	A	G	G	A	-
IT-29	T	G	G	T	*	G	-	-	-	C	G	A	T	A	T	G	G	A	A
IT-30	C	G	A	T	*	G	-	-	-	C	G	A	T	A	T	G	G	A	A
IT-31	T	G	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	G	A	A
IT-32	T	G	G	C	*	G	G	T	G	A	T	G	C	A	A	A	G	A	A
IT-33	T	G	G	C	*	G	G	T	G	A	T	G	C	A	A	A	G	A	A
IT-34	C	G	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	G	A	G	G	A	A
IT-35	T	G	G	C	*	G	-	-	-	C	T	G	C	A	A	G	G	A	-

* Región de repeticiones tetranucleotídicas (microsatélite).

2. Caracterización y análisis de la región del microsatélite compuesto en el ITS2.

Número de repeticiones tetranucleotídicas por cada alelo y número de organismos que presentaron cada alelo.

Alelo	No. de repeticiones	No. org
A1	(TAGC) ₂ (CAGC) ₁	151
A2	(TAGC) ₃ (CAGC) ₂	1
A3	(TAGC) ₃ (CAGC) ₁	1
A4	(TAGC) ₃ (CAGC) ₀	1
A5	(TAGC) ₂ (CAGC) ₀	2
A6	(TAGC) ₁ (CAGC) ₁	18
A7	(TAGC) ₁ (CAGC) ₂	23

Porcentajes de variación de los componentes de variancia e índice de fijación (F_{ST}) obtenidos con el AMOVA del microsatélite compuesto del ITS2.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la variancia	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	6	2.271	0.00677	3.43
Dentro de poblaciones	190	36.176	0.19040	96.57
<i>Total</i>	<i>196</i>	<i>38.447</i>	<i>0.19716</i>	

Índice de fijación $F_{ST} = 0.034$ ($p = 0.025$)

Valores de F_{ST} de las comparaciones pareadas entre localidades (bajo la diagonal) y sus valores de p (sobre la diagonal) del microsatélite compuesto del ITS2.

	LOR	LPA	CPU	IIS	IMA	IMR	IXT
LOR		0.495	0.094	0.682	0.029^{NS}	0.515	0.404
LPA	-0.0105		0.436	0.342	0.219	0.276	0.248
CPU	0.0688	-0.0073		0.061	0.999	0.092	0.064
IIS	-0.0153	0.0007	0.0758		0.013^{NS}	0.129	0.715
IMA	0.0959	0.0175	-0.0413	0.0930		0.006^{NS}	0.033^{NS}
IMR	-0.0114	0.0044	0.0943	0.0276	0.1453		0.051
IXT	-0.0034	0.0152	0.0883	-0.0190	0.0966	0.0627	

(NS) valores de p no significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni.

3. Resultados del índice de fijación del ITS2 sin la región del microsatélite compuesto.

Porcentajes de variación de los componentes de variancia e índice de fijación (Φ_{ST}) obtenidos con el AMOVA del microsatélite compuesto del ITS2.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	6	0.014	0.00001	0.78
Dentro de poblaciones	190	0.355	0.00187	99.22
<i>Total</i>	<i>196</i>	<i>0.368</i>	<i>0.00188</i>	

Índice de fijación $\Phi_{ST} = 0.008$ ($p = 0.192$)

4. Resultados de los niveles de flujo genético (Nm) estimado en las 12 simulaciones de MCMC con el programa Migrate 2.1.3 (Beerli, 2004).

Los histogramas representan las tasas de migración ($M=m/\mu$) entre pares de localidades obtenidas a partir de las 12 simulaciones de MCMC. Se presentan dos histogramas por simulación, el primero indica el número de migrantes por generación de la localidad i a la j ($i-j$) y el segundo indica el flujo de j a i ($j-i$). Las barras de error representan el intervalo de confianza de 95%.

