



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

RETENCIÓN LARVARIA EN ABULÓN AZUL *Haliotis fulgens* MEDIANTE ANÁLISIS DE PARENTESCO EN  
B.C.S., MÉXICO

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación Biología Marina)

Presenta

**Adriana Max Aguilar**

La Paz, Baja California Sur, Febrero de 2014

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:30 horas del día 17 del Mes de Febrero del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Retención larvaria en abulón azul *Haliotis fulgens* mediante análisis de parentesco en B.C.S., México"**

Presentada por el alumno:

**Adriana Max Aguilar**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biología Marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

  
DR. RICARDO PÉREZ ENRÍQUEZ  
DIRECTOR DE TESIS

  
DR. SERGIO A. GUZMÁN DEL PRÍO  
CO-TUTOR

  
DR. NOÉ DÍAZ VILORIA  
CO-TUTOR

  
DRA. ELISA SERMIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **CONFORMACIÓN DE COMITÉS**

### **Comité Tutorial**

Dr. Ricardo Pérez Enríquez

Dr. Sergio Antonio Guzmán del Prío

Dr. Noé Díaz Viloría

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Ricardo Pérez Enríquez

Dr. Sergio Antonio Guzmán del Prío

Dr. Noé Díaz Viloría

### **Jurado de Examen**

Dr. Ricardo Pérez Enríquez

Dr. Noé Díaz Viloría

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dra. Elisa Serviere Zaragoza (Suplente)

## RESUMEN

El abulón azul (*Haliotis fulgens*) es un molusco gasterópodo de importancia comercial en México. Es un recurso de alto valor comercial (70 M en 2011) debido a su gran demanda a nivel internacional; su pesquería constituye una de las actividades más importantes que se desarrollan en la costa occidental de la península de Baja California. Esta pesquería ha sufrido de manera histórica una disminución significativa, por lo que es necesario reforzar y continuar los programas de investigación y manejo actual para garantizar la recuperación de los bancos abuloneros. Un aspecto crucial en el manejo y administración de las pesquerías, es el claro entendimiento del concepto de unidad de stock, el cual requiere un mejor conocimiento del reclutamiento en función de la dinámica larvaria y la conectividad entre bancos (dados por los niveles de retención y dispersión), lo que ampliaría la precisión de las estrategias de manejo actuales. En el caso del abulón se han propuesto dos modelos de conectividad: (1) Las larvas son transportadas a grandes distancias de sus padres y llegan a sustentar otros bancos; y (2) el intercambio larvario entre bancos es limitado y cada banco es un pequeño stock que es autosustentable. En cualquier caso, es necesario determinar si en un banco lo que ocurre preponderantemente es el auto-reclutamiento, o si por el contrario, las larvas provienen principalmente de otros sitios. El objetivo del presente trabajo fue estimar el índice de retención larvaria del abulón azul *Haliotis fulgens* en dos sitios de la costa occidental de Baja California Sur, mediante el uso de marcadores genéticos tipo microsatélite en análisis de parentesco. Se estandarizaron y caracterizaron nuevos loci microsatélites específicos para *H. fulgens* con los cuales se determinó el índice de retención larvaria a través de la asignación genética de juveniles a progenitores que se encontraran en el mismo sitio de muestreo mediante análisis de paternidad con el programa CERVUS 3.0. Se obtuvieron 24 loci microsatélites potenciales para utilizarlos en análisis genéticos, de los cuales se caracterizaron 12 loci polimórficos. Se determinó que 11 de ellos son factibles de utilizar en análisis de parentesco por su alto polimorfismo (Número de alelos: de 5-17;  $H_E$  de 0.69-0.92; PIC de 0.64-0.90) y presentar Equilibrio de Hardy-Weinberg. Las asignaciones padre-hijo consideradas en el índice de retención larvaria tuvieron valores de LOD ( $\ln$  de la probabilidad de asignación) del 3.59-6.99 con niveles de confianza del 90% y 95%. El índice de retención larvaria encontrado en los sitios de estudio

fue del 3.7%-12.5% en escalas de decenas a centenas de metros (30-120 m). Por lo tanto, en la escala de decenas de metros analizada en este trabajo, el auto-reclutamiento ocurre en menor proporción respecto al reclutamiento proveniente de sitios fuera del área de muestreo. El auto-reclutamiento se presenta tanto en bancos de la zona sublitoral como de la zona mesolitoral. Las larvas producidas por adultos en la zona sublitoral pueden encontrar un sitio adecuado para su asentamiento en la zona mesolitoral. Resulta factible usar loci microsatélites en análisis de paternidad como herramienta para evaluar de manera directa si existe retención larvaria en un banco específico e incluso determinar en qué escalas ocurre el auto-reclutamiento.

Palabras clave: Retención larvaria, microsatélites, auto-reclutamiento.

**ABSTRACT**

The green abalone (*Haliotis fulgens*) is a marine gastropod mollusk in Mexico with a high commercial value (70 M in 2011) because of its high demand in the international market. Its fishery is an important commercial activity in the west coast of Baja California Sur, and has historically suffered a significant decline in its captures. Thus it is necessary to continue research and current management programs to ensure the recovery of abalone in reef systems. A crucial consideration in management and administration of this fishery is a clear understanding of the concept of a stock unit, which requires a better understanding of recruitment on defined spatial scales, depending on the larval dynamics and connectivity among reefs (given by the levels of retention and dispersal). This knowledge will extend the accuracy of current management strategies. Two different models on connectivity have been proposed for abalone: (1) the larvae can be transported for long distances from their parent's reef and supply other distant reefs; and (2) larval exchange between reefs is limited, and each one is a small self-replenishing bank. In any case, it is necessary to determine whether a reef is mainly maintained by self-recruitment, or if larvae come mainly from other sites. The objective of this work was estimate the proportion of green abalone *Haliotis fulgens* larval retention in two sites on the western coast of Baja California Sur, using microsatellite markers in paternity analysis. New microsatellite markers in *H. fulgens* were standardized and characterized. The larval retention was estimated by the proportion of juveniles genetically assigned to the possible parents in the same site by paternity analysis using CERVUS 3.0. Twenty-four microsatellite loci potentially useful in genetic analysis were obtained, from which 12 polymorphic loci were characterized. From these, 11 were useful in paternity analysis due to their high polymorphism (number of alleles: 5-17;  $H_E$ : 0.69-0.92; PIC: 0.64-0.90) and because they were in Hardy-Weinberg equilibrium. The parent-offspring pairs in the larval retention index had LOD value (natural log of the likelihood ratio) from 3.59-6.99 with 90% and 95% confidence levels. The larval retention was 3.7-12.5% in the scale from tens to hundreds of meters (30-120 m). Thus, at this scale self-recruitment occurs in a lower proportion compared to the recruitment from outside the collection area. Self-recruitment occurred both on reefs in the sublittoral and intertidal zones. Larvae produced from adults in the sublittoral zone can settle in the intertidal zone.

The use of microsatellite markers is feasible in paternity analysis as an implement to evaluate whether larval retention exists in a specific reef and also to determine in what scales self-recruitment happened.

**Key words:** Larval retention, microsatellite markers, self-recruitment.

## DEDICATORIA

A mi familia, en especial a las mujeres de mi familia que me han enseñado con su ejemplo y sus palabras a ser fuerte y siempre salir adelante: a mi abuela Ramona (Q.E.P.D.), quien luchó y salió adelante a pesar de las circunstancias de la vida, siempre estás presente en mi corazón. A mi hermana Wendy por ser un ejemplo a seguir como profesionalista que ama lo que hace y va más allá de sólo cumplir con el trabajo. A mi mamá por ser un ejemplo a seguir como ser humano, un ejemplo de paciencia, tolerancia y amor incondicional.

A mi papá, quien a su manera me ha enseñado a nunca ser conformista y siempre buscar ser mejor.

A mis tíos Ana y Enrique gracias por brindarme su cariño y cuidarme a pesar de la distancia.

A Manuel, gracias por tu apoyo incondicional en esta etapa y por seguir brindándome tu amistad a pesar de todo.

*Ayúdame a encontrar la fortaleza del viejo roble, para que ningún triunfo me envanezca;*

*la alegría de la Naturaleza, para que ninguna soledad me abata;*

*la libertad del ave, para elegir mi camino;*

*y la voluntad para seguir siempre adelante y servir.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Posgrado y al CONACYT por la beca de Maestría otorgada con número de registro 260440.

Agradezco sinceramente al Dr. Ricardo Pérez Enríquez por aceptarme como su estudiante, por su invaluable apoyo durante la realización de este trabajo y por brindarme su confianza y atención en todo momento.

Al Dr. Sergio A. Guzmán del Próo por permitirnos el uso de las muestras de Clam Bay. Gracias por haber aceptado ser parte del comité tutorial y por su importante aportación al trabajo.

Al Dr. Noé Díaz Viloría por sus asesorías, observaciones y su apoyo moral, gracias por todo.

Al Dr. Pedro Cruz Hernández por aceptar ser parte del jurado de examen, gracias por su apoyo.

Un especial agradecimiento al Dr. Adrián Munguía Vega por permitirnos el uso de los microsátélites que obtuvo, los cuales fueron estandarizados y caracterizados en el presente trabajo.

A la Cooperativa pesquera “Progreso”, a los buzos y personal del Laboratorio por su apoyo en el trabajo de campo, en especial al Oc. Daniel Aguilar por todas las atenciones brindadas.

Al M.C. Horacio Bervera León y al Tec. Juan José Ramírez Rosas por su apoyo en la realización de los muestreos en La Bocana, así como al Sr. Enrique Calvillo por apoyarme en la preparación del material de muestreo.

A la M. C. Susana Ávila Álvarez por sus asesorías y apoyo en el trabajo de laboratorio, así como a mis compañeros del laboratorio de Genética Acuícola.

A Roxana B. Inohuye del Laboratorio de Diagnóstico Parasitológico por la asesoría otorgada en la medición y toma de fotografías de juveniles.

Al personal de la Biblioteca y del Laboratorio de Computo, Ana María Talamantes, Susana Luna García, María Esther Ojeda y Horacio Sandoval por su trato amable y atención en todo momento.

A todo el personal de la Dirección de estudios de Posgrado, por el apoyo otorgado en todos los trámites administrativos.

A la maestra Diana Dorantes por su asesoría en la edición de la traducción del resumen al inglés.

Y por último, y no por menos, a mis amigos del “Canal Cultural”, gracias por ofrecerme su sincera amistad (aunque algunos ya anden lejos), por compartir conmigo tanto los buenos momentos, como los momentos de estrés, por apoyarme y hacerme reír, gracias por todo.

**CONTENIDO**

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 La pesquería de abulón en México.....	1
1.2 Biología y Ecología.....	3
2. ANTECEDENTES .....	5
2.1 Estudios ecológicos de dispersión y retención larvaria.....	5
2.2 Estudios genéticos de conectividad y retención larvaria.....	6
3. JUSTIFICACIÓN .....	9
4. HIPÓTESIS .....	10
5. OBJETIVOS .....	10
5.1. Objetivo general .....	10
5.2. Objetivos específicos .....	10
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	11
6.1 Área de estudio.....	11
6.2 Estandarización y caracterización de loci microsatélites .....	12
6.2.1. Obtención de microsatélites .....	12
6.2.2 Optimización de condiciones de amplificación.....	12
6.2.3 Caracterización de loci microsatélites .....	14
6.3 Análisis de retención larvaria.....	15
6.3.1 Colecta de muestras .....	15
6.3.2 Extracción de ADN .....	18
6.3.3 Amplificación y visualización de loci microsatélites .....	18
6.3.4 Análisis de parentesco .....	18

6.3.4.1	Análisis de paternidad para asignar ambos posibles padres .....	20
6.3.4.2	Análisis de paternidad para asignar un posible padre .....	20
6.3.5	Índice de retención larvaria .....	21
7.	RESULTADOS .....	22
7.1	Estandarización y caracterización de loci microsatélites .....	22
7.2	Análisis de retención larvaria.....	28
7.2.1.	Colecta de muestras .....	28
7.2.2	Análisis de muestras .....	28
7.2.3	Análisis de parentesco .....	29
7.2.3.1	Análisis de paternidad para asignar ambos posibles padres .....	30
7.2.3.2	Análisis de paternidad para asignar un posible padre.....	31
7.2.4	Índice de retención larvaria .....	34
8.	DISCUSIÓN .....	35
8.1	Caracterización de loci microsatélites.....	35
8.2	Análisis de parentesco.....	36
8.2.1	Análisis de paternidad para asignar ambos posibles padres .....	36
8.2.2	Análisis de paternidad para asignar un posible padre .....	37
8.3	Índice de retención larvaria .....	38
9.	CONCLUSIONES .....	41
10.	RECOMENDACIONES.....	42
11.	LITERATURA CITADA .....	43
12.	ANEXOS .....	53
	Anexo 1 Obtención de loci microsatélites mediante pirosecuenciación 454.....	53

Anexo 2 Relación de loci microsatélites amplificados en <i>Haliotis fulgens</i> .....	55
Anexo 3 Talla de organismos colectados .....	59
Anexo 4 Genotipos de juveniles y adultos asignados mediante análisis de paternidad con 100 padres candidatos .....	64

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1. Tendencia histórica de la captura de abulón de 1990-2012 en la península de Baja California, México. Fuente: datos obtenidos del Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca. ....	2
Figura 2. Localización de sitios de estudio. (a) tomada de León-Carballo y Muciño-Díaz (1996).....	11
Figura 3. Estaciones de muestreo en Clam Bay, Bahía Tortugas. ....	15
Figura 4. Esquema de cuadrante realizado en la zona sublitoral de La Bocana. ....	17
Figura 5. Sitios de colecta en La Bocana. Cuadrante sublitoral y cuadrante La Puntita .....	17
Figura 6. Preparación de ADN y emulsión de PCR (Mardis, 2008) .....	53

## LISTA DE TABLAS

Tabla I. Loci microsatélites seleccionados como potenciales a utilizar en análisis genéticos de <i>Haliotis fulgens</i> . .....	22
Tabla II. Condiciones de amplificación de loci microsatélites seleccionados como potenciales a utilizar en análisis genéticos de <i>Haliotis fulgens</i> . Ta, temperatura de acoplamiento; N <sub>A</sub> , número de alelos; pb, número de pares de bases. ....	23
Tabla III. Caracterización de loci microsatélites con individuos de Clam Bay. * Desviación significativa del Equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0.00416$ ); n, número de individuos analizados; N <sub>A</sub> , número de alelos; H <sub>O</sub> , Heterocigosidad observada; H <sub>E</sub> , Heterocigosidad esperada; P, probabilidad del EHW; PIC, Contenido de Información Polimórfica; F (nulos), frecuencia de alelos nulos. ....	25
Tabla IV. Caracterización de loci microsatélites con individuos de la zona sublitoral de La Bocana. * Desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0.00454$ ); n, número de individuos analizados; N <sub>A</sub> , número de alelos; H <sub>O</sub> , Heterocigosidad observada; H <sub>E</sub> , Heterocigosidad esperada; P, probabilidad de EHW; PIC, Contenido de Información Polimórfica; F (nulos), frecuencia de alelos nulos. ....	26
Tabla V. Caracterización de loci microsatélites con individuos de la zona mesolitoral de La Puntita en La Bocana. * Desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0.00416$ ); n, número de individuos analizados; N <sub>A</sub> , número de alelos; H <sub>O</sub> , Heterocigosidad observada; H <sub>E</sub> , Heterocigosidad esperada; P, probabilidad del EHW; PIC, Contenido de Información Polimórfica; F (nulos), frecuencia de alelos nulos. ....	27
Tabla VI. Total de organismos colectados en tres sitios de muestreo: Clam Bay en Bahía Tortugas, zona sublitoral y mesolitoral de La Bocana (La Puntita). ....	28
Tabla VII. Total de asignaciones padre-hijo obtenidas en los análisis de paternidad al variar los parámetros de simulación. #P.C., número de padres candidatos. ....	30

Tabla VIII. Valores críticos de LOD significativos para los análisis de paternidad. ....	32
Tabla IX. Juveniles de Clam Bay asignados a un posible padre. ID, nombre o número de identificación del organismo; LOD, Log de la probabilidad de asignación. ....	32
Tabla X. Juveniles de la zona sublitoral de La Bocana asignados a un posible padre. ID, nombre o número de identificación del organismo; LOD, Log de la probabilidad de asignación. ....	33
Tabla XI. Juveniles de la zona mesolitoral de La Puntita asignados a un posible padre. ID, nombre o número de identificación del organismo; LOD, Log de la probabilidad de asignación. ....	33
Tabla XII. Loci microsatélites amplificados en <i>H. fulgens</i> . Ta, Temperatura de acoplamiento. ....	55
Tabla XIII. Talla de organismos colectados en Clam Bay, Bahía Tortugas. ID, nombre o número de identificación del organismo. ....	59
Tabla XIV. Talla de organismos colectados en la zona sublitoral de La Bocana. ID, nombre o número de identificación del organismo. ....	61
Tabla XV. Talla de organismos colectados en la zona mesolitoral de La Bocana (La Puntita). ID, nombre o número de identificación del organismo. ....	62
Tabla XVI. Genotipos de juveniles y de su padre asignado cuando se utilizaron 100 padres candidatos en Clam Bay. Se resaltan alelos compartidos. ....	64
Tabla XVII. Genotipos de juveniles y de su padre asignado cuando se utilizaron 100 padres candidatos en la zona sublitoral de La Bocana. Se resaltan alelos compartidos. ....	64
Tabla XVIII. Genotipos de juveniles y de su padre asignado cuando se utilizaron 100 padres candidatos en la zona mesolitoral de La Bocana (La Puntita). Se resaltan alelos compartidos. ....	65



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 La pesquería de abulón en México

El abulón es un molusco gasterópodo de importancia comercial. En México, en la costa occidental de la península de Baja California, se encuentran siete especies de abulón, de las cuales *Haliotis corrugata* (abulón amarillo) y *H. fulgens* (abulón azul), contribuyen con el 100% de la captura total de la pesquería, siendo *H. fulgens* el de mayor aportación (70-80%) (Sierra-Rodríguez *et al.*, 2006). Las poblaciones de abulón azul en el país se distribuyen y explotan desde Isla Coronados, B.C. hasta la punta sur de Isla Margarita, B.C.S. (Ortiz-Quintanilla y León-Carballo, 1988), con la mayor abundancia desde Isla Cedros hasta Punta Abreojos. Se distribución vertical va desde la zona intermareal hasta los 24 m de profundidad, con mayor abundancia entre los 1.5-9 m. (Vega *et al.*, 1994).

La pesquería de abulón ha sufrido de manera histórica una disminución significativa. El volumen máximo de producción fue en 1950 con 5,993 t (Sierra-Rodríguez *et al.*, 2006); en años subsecuentes existió una disminución en la captura, con una severa declinación de 1970 a 1985 con 400 t en este último año. En 1981, cuando el colapso de la pesquería comenzó a ser evidente, se cambiaron las épocas de veda y las tallas mínimas de captura de acuerdo a la zona de pesca, esto con base en la información biológica disponible de crecimiento y talla de madurez sexual (Gúzman-del Próo, 1992). De 1989-1992 se observó una producción aparentemente constante con una producción promedio de 979.5 t (Sierra-Rodríguez *et al.*, 2006). Hasta 1990 se aplicaron las primeras cuotas de captura como medida reglamentaria para poner un límite máximo a la producción y controlar de manera indirecta el esfuerzo pesquero (León-Carballo y Muciño-Díaz, 1995). De 1993 a 1999 continuó el descenso de los volúmenes de captura (Fig. 1). En 1996 se aplicaron de manera oficial nuevos criterios para la asignación de cuotas de captura, basadas principalmente en el reclutamiento por especie, por zona y en estimaciones de densidad promedio y biomasa (Sierra-Rodríguez *et al.*, 2006). De 2000-2012 el volumen de captura promedio se mantuvo en alrededor de las 600 t de peso vivo.

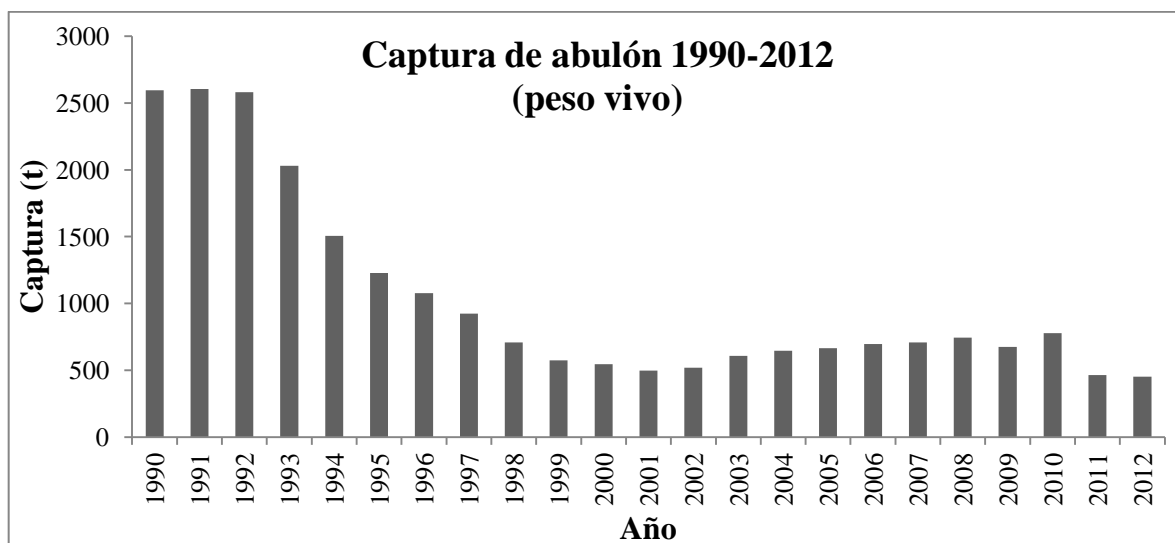


Figura 1. Tendencia histórica de la captura de abulón de 1990-2012 en la península de Baja California, México. Fuente: datos obtenidos del Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca.

La pesquería de abulón en México está regulada por la NOM-005-PESC-1993 donde se definen cuatro zonas administrativas, especies y tallas mínimas y por la NOM-009-PESC-1993 que establece el procedimiento para determinar las épocas y zonas de veda. Actualmente las estrategias de manejo implementadas son en orden de importancia, según la Carta Nacional Pesquera 2012 (SAGARPA, 2012): (1) cuotas de captura, (2) talla mínima legal por especie y (3) época de veda por zona.

Es necesario reforzar y continuar los programas de investigación y manejo actual para garantizar la recuperación de los bancos abuloneros. Para el otorgamiento de cuotas se deben considerar los bancos como stocks poblacionales en polígonos bien definidos, con estrategias de manejo en función del estado poblacional de cada banco (SAGARPA, 2012) para ello es importante realizar estudios acerca de la dinámica larvaria ya que contribuirían a una mejor definición de los bancos y a un manejo más específico en función de cómo ocurre ésta.

## 1.2 Biología y Ecología

El abulón es una especie de vida bentónica y se encuentra en sustratos rocosos asociados a mantos de macroalgas y pastos marinos (León-Carballo y Muciño-Díaz, 1996; Sierra-Rodríguez *et al.*, 2006; Leighton, 2000).

La producción de gametos es primordialmente anual, con un desarrollo gonádico homogéneo y expulsión total de los gametos al finalizar la temporada de desove (Giorgi y DeMartini, 1977; Belmar-Pérez y Gúzman-del Prío, 1992), pueden presentar dos o tres desoves por año dependiendo la especie, localidad y características ambientales (Vega *et al.*, 1994). El período de máxima madurez y desove ocurre hacia finales del verano con mayor énfasis entre otoño e invierno (Ortiz-Quintanilla *et al.*, 1990, Muciño-Díaz *et al.*, 1995).

Son desovadores externos, liberando sus gametos al agua donde ocurre la fertilización. Después de 24-30 hrs., las larvas veliger nadan generalmente en la capa superficial arriba de los 10 m (Leighton, 2000). El tiempo de desarrollo larvario depende principalmente de la temperatura, de manera que las larvas de *H. fulgens* pueden ser competentes para el asentamiento en 3.5 días a 24°C o extenderse hasta 12 días a 15°C (Leighton, 1974; Leighton *et al.*, 1981); después de este periodo las larvas inician el asentamiento al entrar en contacto con el sustrato adecuado. En su estadio adulto y juvenil sus movimientos son limitados y principalmente nocturnos; se ha reportado en juveniles de abulón amarillo que se desplazan hasta 5 m en una noche (Leighton, 2000) y en el caso de adultos, existen reportes en abulón azul de un desplazamiento de hasta 14 m en un año (Shepherd *et al.*, 1991). En abulón amarillo, estudios sobre el desplazamiento en adultos (Coates *et al.*, 2013), describen que sus movimientos son dentro de áreas locales discretas (183 m<sup>2</sup> aproximadamente) y realizan incursiones alejándose de esta área principalmente a 5-10 m e incluso más pero regresan a su área original posteriormente.

Entre la mayoría de las especies marinas y en especial en organismos bentónicos, la conectividad entre poblaciones es alcanzada a través de la dispersión larvaria planctónica.

Sin embargo, esta es usualmente difícil de medir, ya que son organismos pequeños, tienen alta mortalidad y se distribuyen en grandes volúmenes de agua (Hedgecock, 2010).

La conectividad implica un flujo genético entre las poblaciones, el cual puede ser medido a través de análisis genéticos, que pueden ser de dos tipos: métodos indirectos y directos. Los métodos indirectos estiman el flujo genético mediante las diferencias genéticas (e.g. frecuencias alélicas) entre las poblaciones, mientras que los métodos directos se enfocan en la asignación de individuos a su población de origen o a sus padres específicos (Hedgecock *et al.*, 2007).

En el caso del abulón se han propuesto dos modelos de conectividad o transporte larvario: (1) Las larvas son transportadas a grandes distancias de sus padres y llegan a sustentar otros bancos (Forster *et al.*, 1982); y (2) el intercambio larvario entre bancos es limitado y cada banco es un pequeño stock que es autosustentable (Prince *et al.*, 1988). En cualquier caso, es necesario determinar si en un banco lo que ocurre preponderantemente es el auto-reclutamiento, o si por el contrario, las larvas provienen principalmente de otros sitios.

El presente trabajo aborda esta problemática a través de la aplicación de marcadores genéticos como método directo para la estimación de la proporción de retención larvaria.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Estudios ecológicos de dispersión y retención larvaria

Existen diversos estudios ecológicos que han abordado con distintos enfoques la dispersión y retención larvaria en abulón. En general, han deducido que la dispersión puede ocurrir en distancias desde decenas de metros hasta pocos kilómetros e incluso llegan a considerar la posibilidad del asentamiento de las larvas en el mismo banco de sus progenitores o cerca de ellos (Prince *et al.*, 1987; Prince *et al.*, 1988; McShane *et al.*, 1988; Shepherd *et al.*, 1992).

Dentro de los primeros trabajos está el de Tegner y Butler (1985) los cuales utilizaron “tubos de deriva” para determinar la distribución potencial de larvas de abulón azul en California, E.U.A. Mencionaron que es poco común la recolonización de un sitio por larvas provenientes de lugares externos, ya que la dispersión local fue dominante (80-97%) y principalmente dentro del área de liberación de los “tubos de deriva” hasta a 1 km de la misma.

Prince *et al.* (1987), Prince *et al.* (1988) y McShane *et al.* (1988) mencionaron que las larvas de *Haliotis rubra* pueden asentarse en el mismo arrecife que sus padres, con una dispersión limitada a decenas de metros (0-50 m) y que este reclutamiento se encuentra asociado a la densidad de los reproductores presentes.

Sin embargo, Shepherd *et al.* (1992) concluyeron que el asentamiento de juveniles no está relacionado a las densidades de adultos, sino a la topografía de la costa. Deduce que las larvas de abulón *Haliotis levigata* son transportadas a distancias de al menos cientos de metros.

McShane (1992) mencionó que las larvas de abulón pueden ser retenidas a áreas discretas por las corrientes, giros o por la protección de la topografía local del arrecife y completar su ciclo de vida larvario cerca de su sitio natal. Las larvas que entren a mar abierto probablemente pueden no encontrar un hábitat adecuado para su asentamiento, aun así, las pocas que lo hacen, contribuyen al flujo genético entre poblaciones.

Sasaki y Shepherd (1995) examinaron la relación del transporte larvario de *Haliotis discus hannai* a la presencia de tormentas. Encontraron que después de un tifón las larvas pueden ser dispersadas hasta tres kilómetros de la costa y que después de tormentas menores se dispersan localmente de decenas hasta centenas de metros.

Otros estudios mencionan que el transporte de las larvas puede ser mayor con el potencial de sustentar otros bancos (Forster *et al.*, 1982; Miyake *et al.*, 2011). Guzmán-del Próo *et al.* (2000) a partir del estudio de las condiciones hidrodinámicas en Bahía Tortugas, México, concluyeron que la dispersión larvaria puede llegar a ser limitada y restringida (3-5 km) en bancos cuya morfología de la costa y relieve sublitoral son complejos, sin embargo no descartan la existencia de transporte a mayores distancias. Miyake *et al.* (2009) realizaron estudios de rastreabilidad de partículas y modelos hidrodinámicos, enfocándose principalmente en tres especies (*Haliotis discus discus*, *H. gigantea* y *H. madaka*), encontraron una dispersión máxima similar (2.9-5.9 km) así como reclutamiento potencial a escalas locales bajo condiciones oceánicas tranquilas en Sagami Bay, Japón.

Miyake *et al.* (2011) determinaron una dispersión potencial a mayores distancias que los trabajos anteriores, con una dispersión promedio menor a 40 km en *Haliotis discus hannai*. Encontraron que el auto-reclutamiento es usualmente mayor a la conectividad en la mayoría de los sitios que estudiaron, sin embargo encontraron poco auto-reclutamiento en otros (7-8% de partículas retenidas).

## **2.2 Estudios genéticos de conectividad y retención larvaria**

Se han llevado a cabo un amplio número de trabajos de conectividad genética en distintas especies de abulón mediante métodos indirectos, los cuales han tenido diferentes resultados.

Un ejemplo son los trabajos en *Haliotis cracherodii* (Hamm y Burton, 2000; Chambers *et al.*, 2006; Gruenthal y Burton, 2008) y en *H. rubra* (Huang *et al.*, 2000) en donde se han encontrado diferencias genéticas entre poblaciones a distintas escalas (desde decenas a

centenas de km). Incluso en escalas menores (de cientos de metros a 1 km) en *H. rubra* (Temby *et al.*, 2007) y *H. laevigata* (Brown y Murray, 1992). Estos trabajos han sugerido que predomina el reclutamiento a escala local.

En otras especies como *Haliotis iris*, Will *et al.* (2011) reportaron ligeras diferencias genéticas en escalas de cientos de km. De igual manera, ocurre en *H. rufescens* (Gruenthal *et al.*, 2007) a lo largo de 1300 km. Sin embargo, Burton y Tegner (2000) en esta misma especie, no encontraron evidencia de divergencia genética en escalas menores (decenas de km).

En México, los estudios de conectividad genética en las poblaciones de abulón azul (Zuñiga *et al.*, 2000; Gutiérrez-González *et al.*, 2007) y de abulón amarillo (Díaz-Viloria *et al.*, 2009) a lo largo de la península de Baja California han mostrado que existe homogeneidad genética, por lo que existe un flujo genético a distancias de cientos de kilómetros. Según Díaz-Viloria *et al.* (2009) este flujo genético podría ser consecuencia de eventos de intercambio persistente de larvas entre poblaciones adyacentes o de eventos esporádicos de intercambio larvario a grandes distancias.

Hay que subrayar que la estimación de la conectividad mediante métodos indirectos, reflejan el flujo genético en escalas evolutivas y no necesariamente lo que ocurre en una o pocas generaciones, mientras que el uso de métodos directos, pueden determinarla en escalas a corto plazo, estimando la conectividad o retención en una o pocas generaciones (Hedgecock *et al.*, 2007).

Mediante el uso de marcadores moleculares tipo microsatélite se ha logrado estimar el grado de auto-reclutamiento, así como medir la distancia y dirección de la dispersión larvaria, principalmente en distintas especies de peces, tanto con análisis de paternidad (Jones *et al.*, 2005; Planes *et al.*, 2009; Christie *et al.*, 2010; Berumen *et al.*, 2012; D' Aloia *et al.*, 2013) como con pruebas de asignación (Carreras-Carbonell *et al.*, 2007).

Jones *et al.* (2005) en el pez payaso *Amphiprion polymnus*, determinaron que un tercio de los juveniles se asentaron en su área natal, con muchos asentamientos a menos de 100 m

del sitio donde se encontraron sus padres. En el pez payaso *Amphiprion percula*, Planes *et al.* (2009) determinaron un porcentaje mayor de auto-reclutamiento (40%) que de dispersión a otras localidades (10%). Carreras-Carbonell *et al.* (2007) en una población de *Tripterygion delaisi* estimaron un auto-reclutamiento promedio del 66.4% a lo largo de tres años. Christie *et al.* (2010) concluyeron en su trabajo que en una población de peces damisela (*Stegastes partitus*) el auto-reclutamiento es predominante. Berumen *et al.* (2012) realizaron un estudio con dos especies de peces arrecifales encontrando un auto-reclutamiento del 60% en *Amphiprion percula* y de 40% en *Chaetodon vagabundus*. D'Aloia *et al.* (2013) reportaron un 4.6% de auto-reclutamiento en un escala espacial menor a 1 km en una población de *Elacatinus lori*.

Finalmente, Díaz-Viloria *et al.* (2013) encontraron mediante análisis de paternidad que el 4% de los juveniles de abulón amarillo *Haliotis corrugata* fueron resultado de una agregación de adultos reproductores ubicados en la misma área.



### 3. JUSTIFICACIÓN

Un aspecto crucial en el manejo y administración de las pesquerías, es el claro entendimiento del concepto de unidad de stock (Shepherd y Brown, 1993) y esto requiere un mejor conocimiento del reclutamiento de nuevos organismos a la población sobre escalas espaciales definidas, en función de la dinámica, retención y dispersión larvaria, conocimiento que ampliaría la precisión de las estrategias de manejo actuales.

Mientras mayor información se tenga de cómo ocurre la magnitud del auto-reclutamiento en subpoblaciones o bancos, más específico sería el manejo de stocks, con base en las características propias de cada banco. Es decir, si deben manejarse como pequeños stocks autosustentables o por el contrario considerar diversos bancos a lo largo de la costa como una sola unidad de manejo.

La pesquería de abulón constituye una de las actividades más importantes que se desarrollan en la costa occidental de la península de Baja California. Es un producto de alto valor comercial (70 M en 2011) encontrándose por su valor en el lugar 26 de la producción pesquera en el país. Tiene una gran demanda a nivel internacional y se encuentra en el lugar 15 de las especies pesqueras exportadas según el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2011 (CONAPESCA, 2011).

Actualmente se le considera una pesquería en deterioro con tendencia a la recuperación (Sierra-Rodríguez *et al.*, 2006), razón por la cual se deben reforzar y continuar los programas de investigación y manejo actual para garantizar la recuperación de los bancos (SAGARPA, 2012). Este trabajo puede contribuir a cumplir dicho objetivo.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si la etapa larvaria en *Haliotis fulgens* es relativamente corta y si las condiciones hidrodinámicas de un banco o sitio determinado pueden propiciar retención larvaria, entonces se esperaría encontrar una mayor proporción de auto-reclutamiento, respecto a la dispersión de larvas provenientes de sitios externos.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo general**

Estimar la proporción de retención larvaria en el abulón azul *Haliotis fulgens* en dos sitios de la costa occidental de Baja California Sur, mediante el uso de marcadores genéticos tipo microsatélite en análisis de parentesco.

##### **5.2. Objetivos específicos**

- Estandarizar, caracterizar y seleccionar nuevos loci microsatélites específicos para *Haliotis fulgens* con potencial aplicación en análisis de parentesco.
- Asignar genéticamente juveniles a progenitores que se encuentren en el mismo sitio de muestreo mediante análisis de paternidad.
- Estimar la proporción de retención larvaria en cada sitio de colecta.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Área de estudio

El trabajo se llevó a cabo en dos localidades de la costa occidental de la península de Baja California: Clam Bay en Bahía Tortugas, B.C.S ( $27^{\circ} 37' N$  y  $114^{\circ} 50' W$ ) y La Bocana, B.C.S ( $26^{\circ} 44' N$  y  $113^{\circ} 38' W$ ) (Fig. 2), en esta última localidad se realizaron dos muestreos en sitios distintos: (1) en la zona sublitoral y (2) en la zona mesolitoral del lugar conocido como “La Puntita”.

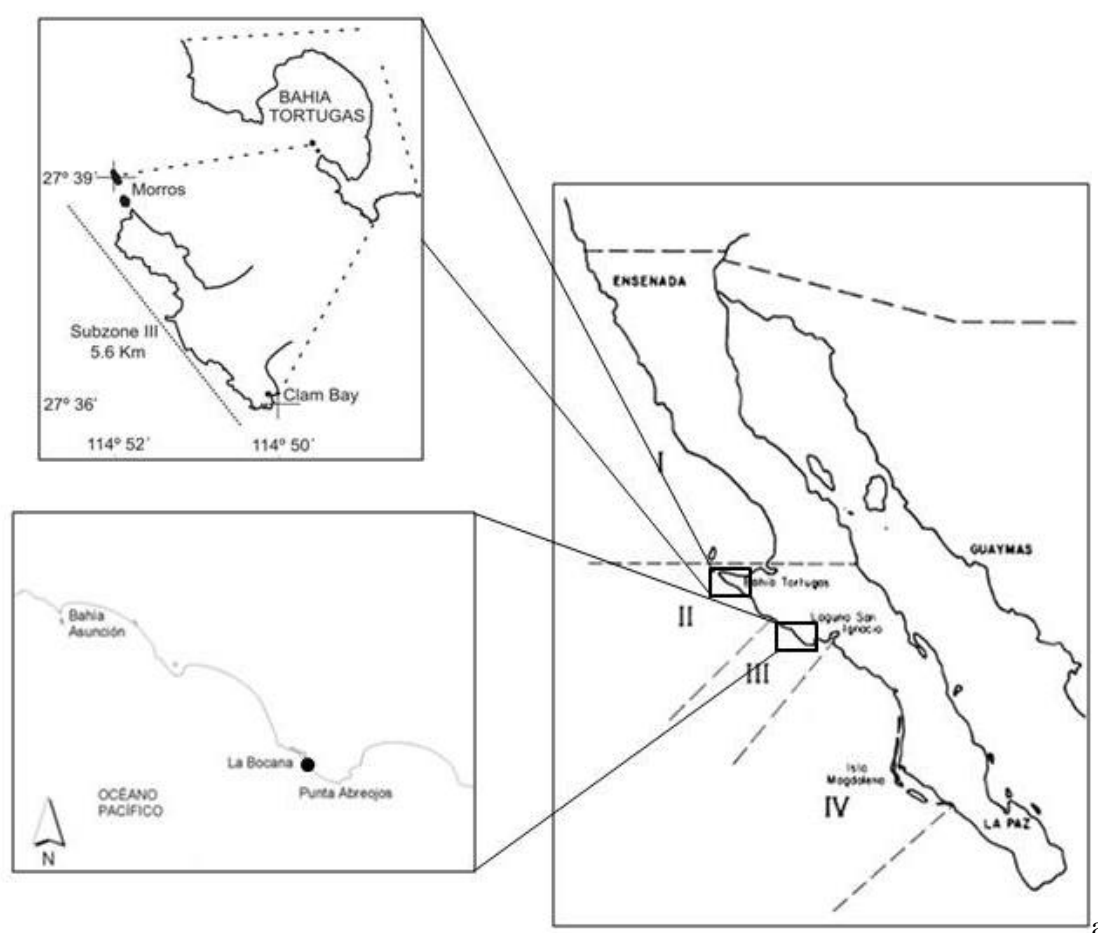


Figura 2. Localización de sitios de estudio. (a) tomada de León-Carballo y Muciño-Díaz (1996)

## **6.2 Estandarización y caracterización de loci microsatélites**

### **6.2.1. Obtención de microsatélites**

Se evaluaron 80 nuevos loci microsatélites los cuales fueron diseñados y proporcionados por el Dr. Adrián Munguía Vega (datos no publicados) obtenidos mediante pirosecuenciación (Anexo 1). El diseño se basó en el uso del software QDD (Megléc *et al.*, 2010), que implementa CLUSTAL W 2 (Larkin *et al.*, 2007), BLAST (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/blast/executables/>) y PRIMER 3 (Rozen y Skaletsky 2000), a partir de lo cual se identificaron zonas microsatélites dentro del genoma de *Halotis fulgens* que tuvieran un motivo de repetición perfecto de cuatro pares de bases (tetranucleotidos) y mínimo ocho repeticiones. Las secuencias de los iniciadores fueron diseñadas basadas en lecturas únicas y secuencias consenso ( $\geq 95\%$  de similaridad en regiones flanqueantes), evitando iniciadores en regiones flanqueantes con motivos de repetición cortos. Este método es considerado una manera conservadora de eliminar alelos nulos, redundancias y loci problemáticos en la amplificación de los microsatélites (Megléc *et al.*, 2010).

### **6.2.2 Optimización de condiciones de amplificación**

Se extrajo ADN genómico de muestras de tejido de adultos de abulón azul mediante el kit Wizard SV 96 Genomic DNA purification System, las cuales provenían de las dos áreas de estudio (ver sección 6.1). Para iniciar con la estandarización de los loci microsatélites se utilizó el ADN genómico de ocho individuos seleccionados al azar (cuatro de Clam Bay y cuatro de La Bocana).

La amplificación de los loci microsatélites se realizó mediante PCR en un termociclador C1000 (Bio-Rad). Las condiciones de amplificación utilizadas para cada locus microsatélite fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 2 min., posteriormente 35 ciclos de 94°C (30 s), temperatura de acoplamiento de los iniciadores (30 s) y 72°C (45 s), y una extensión final a 72°C durante 10 min.

Para determinar la temperatura de acoplamiento de los iniciadores para cada loci microsatélite se utilizó la fórmula propuesta por Hillis *et al.* (1996) (Ecuación 1):

$$T_a = 4(G + C) + 2(A + T) - 5 \quad (1)$$

En la anterior se utiliza el número de Guaninas (G), Citosinas (C), Adeninas (A) y Timinas (T) que forman el iniciador, esto se realiza tanto para el iniciador en un sentido o “forward” como para el antisentido o “reverse”. En los casos en que la temperatura de los iniciadores no fue la misma se usó la menor.

Se utilizó una mezcla de reacción de 12µl de volumen final que contenía: 1µl de ADN, Buffer 1x para Taq, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM de dNTP's, 0.48µM de cada iniciador, 0.025 U/µl de Taq polimerasa y agua MilliQ.

De los loci microsatélites que amplificaron, aquellos que presentaron amplificaciones inespecíficas, se aumentó la temperatura de acoplamiento en la PCR hasta que se eliminaran las bandas inespecíficas. En los casos en que un locus tuviera “stutters” (varias bandas de diferentes tamaños debido a copias incompletas de un alelo durante la amplificación) que dificultaran la lectura de los genotipos, se realizó su amplificación mediante el método modificado de Yoshida y Awaji (2000), el cual consiste en una amplificación en dos pasos y una reducción del número de ciclos: 94°C de desnaturalización inicial durante 2 min, seguido de 5 ciclos a 94°C (5 s), temperatura de acoplamiento (1 min) y 72°C (1 min), seguidos de 20 ciclos a 94°C (1 s), temperatura de acoplamiento (1 min) y 72°C (1 min), y una extensión final a 72°C (10 min).

La separación de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% y 7.5 M de urea en una cámara de secuenciación (Thermo Scientific) bajo las siguientes condiciones: 2000 V, 70 W y 70 mA. Para visualizar los alelos se colocó sobre el gel de poliacrilamida una capa de agarosa al 1% con la tinción Sybr Gold (Invitrogen) a 0.1 X y se colocó en un escáner FM BIO III (Hitachi) donde se obtuvo la imagen del gel revelado. Para determinar el tamaño de los alelos se utilizó una escalera de 10pb (10pb DNA Ladder de Invitrogen) como referencia.

### 6.2.3 Caracterización de loci microsatélites

Para la caracterización de los loci microsatélites se utilizaron los genotipos de 58 adultos de Clam Bay, 42 adultos de la zona sublitoral de La Bocana y 59 adultos de la zona mesolitoral de La Bocana (La Puntita).

Para caracterizar cada locus microsatélite se estimaron las frecuencias alélicas y se determinó el Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), el número de alelos por locus ( $N_A$ ), la Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y la Heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) mediante el programa Arlequín 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005), además del Contenido de Información Polimórfica (PIC) y la frecuencia de alelos nulos mediante el programa CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007). El  $N_A$ , la  $H_E$  y el PIC son medidas de la variabilidad de un locus, en el caso de los dos últimos CERVUS recomienda no utilizar loci con valores menores de 0.5 en los análisis de parentesco. Los alelos nulos son aquellos que no se amplifican durante la PCR, debido a mutaciones en los sitios de reconocimiento de los iniciadores (Pemberton *et al.*, 1995; Dakin y Avise, 2004; Wagner *et al.*, 2006).

Para comprobar si existe una desviación significativa del Equilibrio de Hardy-Weinberg, el programa realizó una prueba exacta análoga a la prueba exacta de Fisher, la cual se hizo locus por locus usando una versión modificada de cadena de Markov con 1,000,000 pasos y 10,000 pasos de desmemorización. Posteriormente, se utilizó la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989) para determinar qué valores fueron significativos de todos los loci evaluados simultáneamente.

Además se realizó una prueba de desequilibrio de ligamiento con Arlequin 3.5 para determinar si existía asociación entre todos los pares de loci, la cual se realizó con pruebas de probabilidad (likelihood) con 1,000 permutaciones. De igual manera se usó el ajuste secuencial de Bonferroni para determinar valores significativos.

De estos análisis se determinaron loci microsatélites candidatos a utilizarse en los análisis de parentesco correspondientes a los estudios de retención larvaria descritos en la sección 6.3.

### 6.3 Análisis de retención larvaria

#### 6.3.1 Colecta de muestras

Las muestras provenientes de Clam Bay fueron tomadas en junio de 2010 por Guzmán del Prío *et al.* (datos no publicados). La colecta de adultos y juveniles de *Haliotis fulgens* se realizó en nueve estaciones de muestreo preestablecidas en un área de aproximadamente 9000 m<sup>2</sup> que van desde la zona mesolitoral a la zona sublitoral (Fig. 3), colectando organismos de diferentes tallas de entre 5 a 192 mm de longitud total. Se determinaron los grupos de edad con base en curvas de crecimiento. Las tallas de los organismos adultos fueron de 110-192 mm y los juveniles de 5-95 mm. En los juveniles, los grupos de edad se definieron con el comportamiento de las modas de tallas y la tasa de crecimiento reportada en juveniles de abulón azul por Guzmán del Prío *et al.* (2004), quienes utilizaron el modelo de crecimiento de Gompertz (Ricker, 1975; Rawlings, 1988). Se tomaron muestras de tejido preservándolas en etanol al 80%.

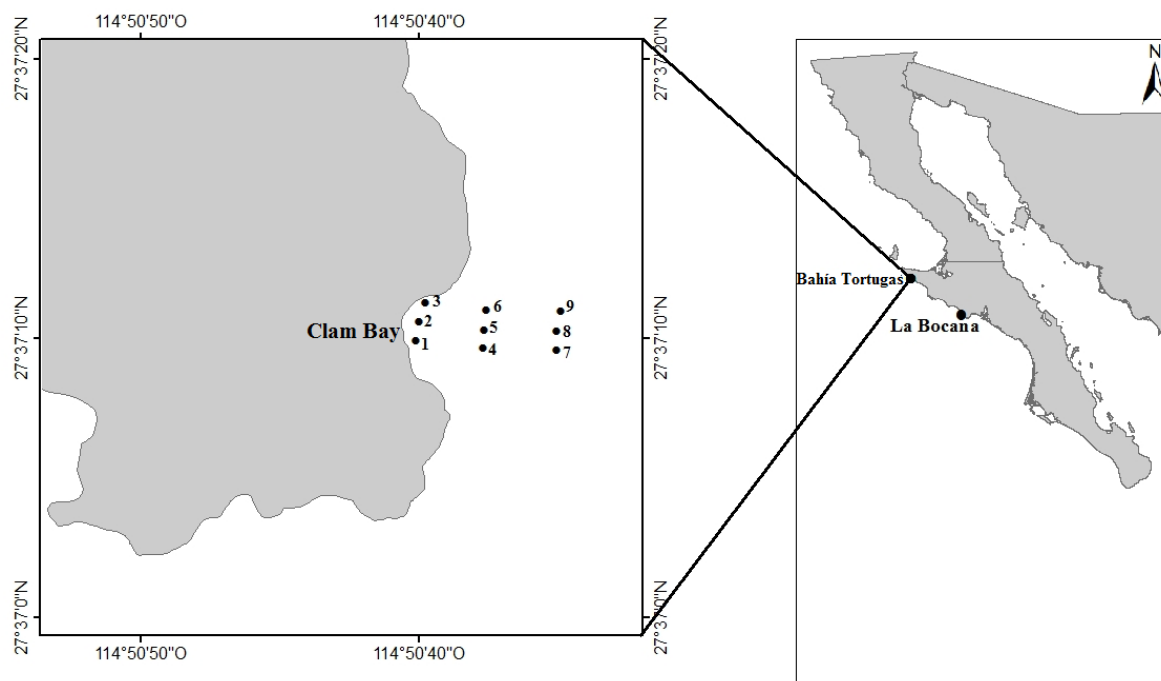


Figura 3. Estaciones de muestreo en Clam Bay, Bahía Tortugas.

El muestreo de la zona sublitoral en La Bocana se realizó en abril del 2012 en un sitio ubicado en las coordenadas  $26^{\circ} 46' 11.8''$  N y  $113^{\circ} 42' 38.9''$  W a una profundidad de 6 m. Se colocó un cuadrante de 20 x 10 m, el cual a su vez se dividió en 8 cuadrantes de 25 m<sup>2</sup> (Fig. 4). En cada uno de estos, presumiblemente se colectaron a todos los abulones adultos de talla comercial ( $\geq 12$  cm) así como juveniles de edad 0+ ( $\leq 2$  cm), mediante buceo autónomo y buceo tipo hooka, bajo la premisa que los juveniles podrían ser resultado de la última temporada de reproducción de los adultos recolectados. De cada individuo se registró su longitud total.

En el mismo cuadrante, se recolectaron rocas de aproximadamente 10-30 cm de longitud para la búsqueda de juveniles que no se observaron a simple vista y que pudieron ser resultado de los últimos desoves; las rocas se introdujeron inmediatamente en bolsas de plástico con cierre hermético (Ziploc) para evitar la pérdida de ejemplares durante el traslado a la embarcación. La colecta fue mediante el método anestésico, que consistió en sumergir las rocas en tinas con etanol al 80% durante 10 minutos aproximadamente, para posteriormente desprender todo el material y organismos con un cepillo de cerdas suaves, pasándolo por un tamiz con luz de malla de 1 mm<sup>2</sup>. Todos los organismos retenidos por el tamiz se conservaron en etanol al 80%, revisándolos con un microscopio estereoscópico (Olympus) en busca de juveniles de abulón.

En noviembre del 2012, se realizó una nueva búsqueda de juveniles de edad 1+ ( $\geq 3$  cm.) dentro del cuadrante anteriormente mencionado. Adicionalmente se colocaron transectos de 30 m. hacia los cuatro puntos cardinales de éste (Fig. 4), colectando los juveniles que se encontraron a lo largo de cada eje. De todos los especímenes, se tomaron muestras de tejido (branquia en adultos y tentáculo epipodial en juveniles), las cuales se conservaron en etanol al 80%. En el caso de los juveniles colectados, estos se regresaron al sitio donde se encontraron.



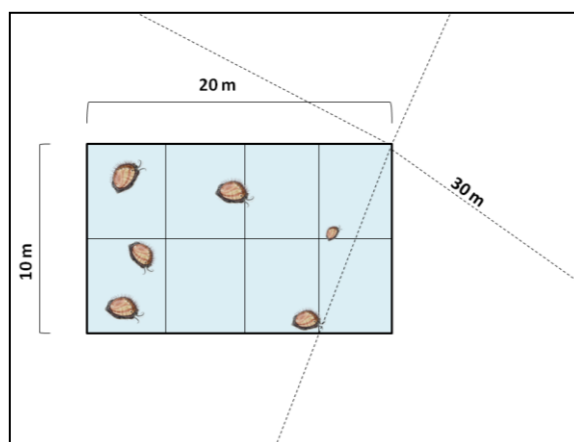


Figura 4. Esquema de cuadrante realizado en la zona sublitoral de La Bocana.

En la misma fecha (noviembre del 2012), en el sitio denominado “La Puntita”, en La Bocana, se colocaron dos cuadrantes de 200m<sup>2</sup> en la zona mesolitoral (Fig. 5) en donde se hicieron muestreos de adultos y juveniles 1+ (tomando muestras de tejido de tentáculo epipodial) y regresando a los organismos al sitio donde se encontraban. Se tomaron muestras de rocas para coleccionar juveniles recién asentados mediante el método anestésico; en esta ocasión, los raspados se tamizaron con una luz de malla de 180µm ya que se esperaba encontrar juveniles más pequeños.

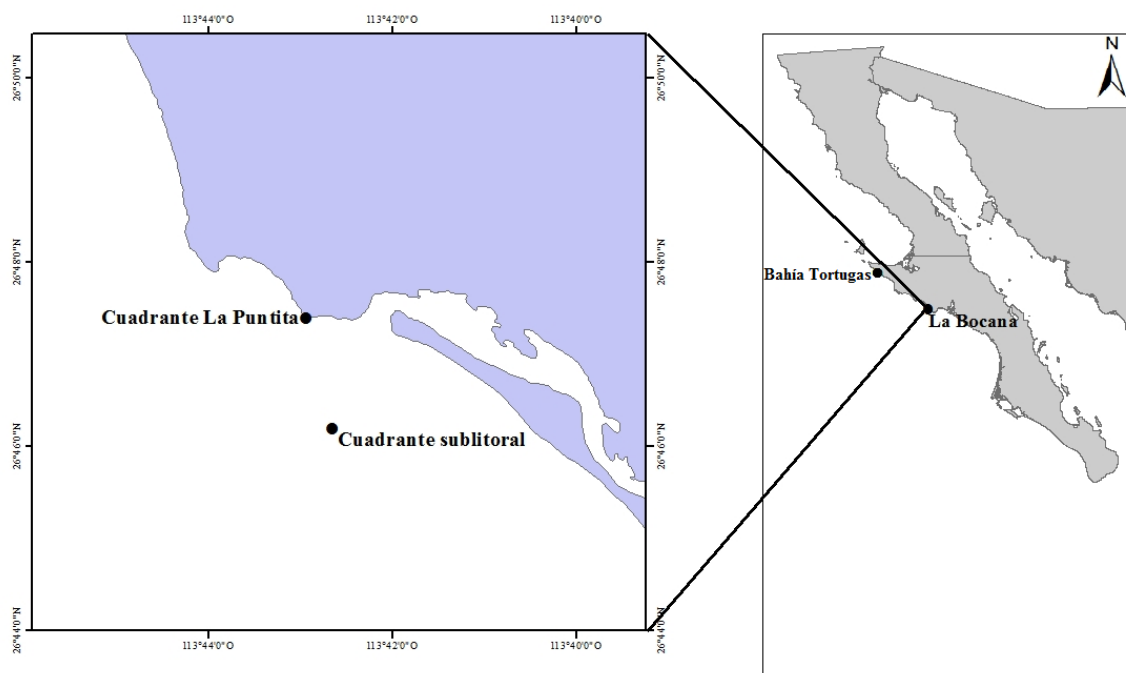


Figura 5. Sitios de colecta en La Bocana. Cuadrante sublitoral y cuadrante La Puntita

### **6.3.2 Extracción de ADN**

Para extraer el ADN genómico de las muestras de tejido se utilizaron dos kits comerciales: DNeasy Blood y Tissue (QIAGEN) y el kit Wizard SV 96 Genomic DNA purification System (Promega). Cuando las muestras fueron de tentáculo epipodial y se tenía poco tejido, se utilizó el kit de QIAGEN y el ADN se eluyó con 100µl de agua MilliQ para mejorar la concentración final. Se cuantificó la concentración de ADN obtenida en un nanodrop (Thermo Scientific).

El ADN obtenido se visualizó en geles de agarosa al 1% con tinción de Gel Red (Biotium) a 3X para observar su integridad.

### **6.3.3 Amplificación y visualización de loci microsatélites**

Se realizó la amplificación de 12 loci microsatélites en todos los individuos de los tres sitios de muestreo. Estos loci fueron: Fulgens10, Fulgens13, Fulgens19, Fulgens24, Fulgens29, Fulgens32, Fulgens36, Fulgens38, Fulgens43, Fulgens48, Fulgens63, Fulgens64. Las condiciones de amplificación utilizadas se presentan como parte de los resultados en la sección 7.1.

Para la visualización de los loci microsatélites se llevó a cabo el mismo procedimiento que se describió el último párrafo de la sección 6.2.2. y se obtuvieron los genotipos de cada organismo para cada locus.

### **6.3.4 Análisis de parentesco**

Los análisis de parentesco se realizaron con los datos de genotipos de adultos y juveniles de cada sitio de colecta mediante el programa CERVUS 3.0 (Kalinowski *et al.*, 2007) el cual utilizó cálculos de probabilidad (Likelihood) para realizar las asignaciones padre-hijo. Para ello primero calculó las frecuencias alélicas en cada locus y con base a estas realizó una simulación de los genotipos de 100,000 descendientes tomando en cuenta distintos parámetros, con los que se estimaron los valores críticos de LOD (“Log-likelihood ratio” o

Log de la proporción de probabilidad) para dos niveles de confianza: estricto (95%) y relajado (90%).

LOD es el logaritmo natural de la proporción de la probabilidad de que el padre asignado sea el padre verdadero en relación a la probabilidad de que el padre que asignó no es el padre verdadero (Ecuación 2). Para identificar a los progenitores más probables CERVUS calculó un valor o puntuación de LOD para cada asignación padre-hijo, el cual se comparó con los valores críticos de LOD obtenidos en la simulación para los dos niveles de confianza.

$$L(H_1, H_2 | D) = \frac{P(D | H_1)}{P(D | H_2)} \quad (2)$$

donde  $P(D | H)$ , es la probabilidad de obtener el dato  $D$  bajo una hipótesis  $H$  (Slate *et al.*, 2000).

Mientras mayor sea el valor de LOD obtenido es más probable que el padre asignado sea el padre verdadero a que lo sea otro adulto tomado al azar. Además para cada asignación padre-hijo CERVUS calculó su probabilidad de no exclusión, la cual es la probabilidad de no excluir a un padre falso, es decir que esta asignación haya ocurrido por azar y no porque estén emparentados, por lo que mientras menor sea este valor, la asignación tiene mayor certidumbre.

Los parámetros clave utilizados para la simulación fueron el número de padres candidatos, la proporción de padres muestreados y el error de genotipificación el cual se utilizó también como error en los cálculos de probabilidad (Likelihood). Estos parámetros son determinados por el investigador por las observaciones en el campo en el caso de los dos primeros. El error de genotipificación utilizado fue del 1%.

Para el número de padres candidatos, CERVUS menciona que debe ser el número de posibles padres presentes al momento de la reproducción. Debido a que en una población silvestre difícilmente es posible saber el número de padres candidatos, se realizaron diversos análisis de paternidad/maternidad cambiando este valor y se evaluó cómo afectaba en los resultados y cuál podría ser el más adecuado en nuestro caso. Se utilizaron 2700,

1800, 900, 600, 400, 300, 200, 150 y 100 padres candidatos. Los dos valores máximos se basaron en el número aproximado de adultos presentes en un área de 9000 m<sup>2</sup> (esta área se seleccionó bajo la premisa de que la retención larvaria puede ocurrir en escalas de decenas a centenas de metros) con una densidad de 0.2 y 0.3 abulones/m<sup>2</sup>. Estas densidades coinciden con las que se encontraron en los sitios de colecta de La Bocana (aproximadamente 50 abulones para un área de 200 m<sup>2</sup>).

La proporción de padres muestreados que se utilizó estuvo en función del número de padres candidatos y el número de adultos colectados en cada sitio. Por ejemplo, cuando el número de padres candidatos fue de 600, la proporción de padres muestreados para Clam Bay fue de 0.096 debido a que se colectaron 58 adultos en este sitio.

Se realizaron dos tipos de análisis de paternidad: (1) para asignar ambos posibles padres a un juvenil y (2) análisis de paternidad/maternidad para asignar un posible padre.

#### **6.3.4.1 Análisis de paternidad para asignar ambos posibles padres**

Los análisis de paternidad para realizar asignaciones ambos padres-hijo fueron con la indicación de que se desconocía el sexo de los adultos y se utilizaron los parámetros de simulación mencionados en la sección 6.3.4.

#### **6.3.4.2 Análisis de paternidad para asignar un posible padre**

En los análisis de paternidad para realizar asignaciones padre/madre-hijo se utilizaron los genotipos de todos los adultos colectados en cada sitio con los parámetros de simulación descritos en la sección 6.3.4.

### 6.3.5 Índice de retención larvaria

Para determinar la magnitud de la retención larvaria en cada sitio de colecta se propuso el uso de la siguiente fórmula como Índice de Retención Larvaria, el resultado se expresó en porcentaje:

$$IRL = \frac{N_{ja}}{N_{jc}} \times 100 \quad (3)$$

donde  $N_{ja}$  es el número de juveniles asignados,  $N_{jc}$  es el número total de juveniles colectados.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Estandarización y caracterización de loci microsatélites

Se probaron 80 loci microsatélites de los cuales 55 amplificaron (Anexo 2) y de éstos se seleccionaron 24 por ser los más polimórficos con lecturas legibles y confiables (Tabla I).

Tabla I. Loci microsatélites seleccionados como potenciales a utilizar en análisis genéticos de *Haliotis fulgens*.

<b>Locus</b>	<b>Motivo de repetición</b>	<b>Secuencia de iniciadores</b>
Fulgens10	(tacc) <sub>16</sub>	F: CACGTCTGTACCGGTGGTAA R: CCCACGTTGTACATATCAGG
Fulgens13	(tatt) <sub>14</sub>	F: GTCCACGGCCTGTTTACTGT R: TGTTGTCGCGACTAATCACC
Fulgens19	(tgta) <sub>12</sub>	F: ATGGCAACTACTCCGTGTGG R: ATCGGAACAACGTCTCCATT
Fulgens24	(actc) <sub>12</sub>	F: GGCTCATCGACAGTGTCTCA R: CGAAAGATCGAGGAAACTGG
Fulgens26	(ctca) <sub>12</sub>	F: GCTGATACAAAGCTGCTGAAAA R: TTGTAGGTGCGAGTGCTTGA
Fulgens29	(ctca) <sub>11</sub>	F: CGGGAATTCCTCCCATT R: AAAAACAACAAAACATAACTCAGATT
Fulgens32	(aatg) <sub>11</sub>	F: CAATCAGATCATTCTTCAAATTTTC R: CTTTTGTCATCCAGCCATCA
Fulgens36	(atgg) <sub>11</sub>	F: TCTGCTCCAGAAATGCAATG R: TGGCCATGAGCATCAATAAG
Fulgens38	(tcac) <sub>11</sub>	F: GTCAGTGGTTCAGTCCCCAG R: GGCATACAGCATGGACACAG
Fulgens40	(gttt) <sub>10</sub>	F: CTCCACCTGCCATTCAAGAT R: GCCATCATAACCTGGAACA
Fulgens42	(agtg) <sub>10</sub>	F: CTAGGCTATCCAGCTGCTCC R: CCCTCCCATGATATGGTTTG
Fulgens43	(gtga) <sub>10</sub>	F: AAATTACGAGGCTCTTGAATGAA R: AAGGCAGAATAGCTAGGCC
Fulgens44	(agtg) <sub>10</sub>	F: GTCGCCAACCATGTATGATG R: GCCACTATGATGTTTGCTG
Fulgens45	(actc) <sub>10</sub>	F: GGCTGTAAAATTGCCGATGT R: CCCCTGACCTTTAGGGTCTT
Fulgens46	(tttg) <sub>10</sub>	F: CCAGGGTCATCTTGGATACG

		R: AGTCAATGCCAATGTTACAG
Fulgens48	(aac) <sub>10</sub>	F: TTACAGGCCGCTGTGACATA R: CCGTGTGCTCAATACTGGA
Fulgens57	(cact) <sub>10</sub>	F: ATAATTTTCGACGTCCCCCTT R: GGTGAGTGAATCTTGAGTGGG
Fulgens58	(tgag) <sub>10</sub>	F: CACCGTTCCACAAAGTCAAA R: CCCACATCAAGCTGACATA
Fulgens60	(tgag) <sub>9</sub>	F: GGCAATTGGGATACGATGAC R: CGCTTAAGACGCCAGGTTAG
Fulgens63	(agtg) <sub>9</sub>	F: GGATAAACTAACGGGATAATTGC R: ATAGCCCATTCTGGTGTCC
Fulgens64	(gtat) <sub>9</sub>	F: AAAGCCTGCGACGTAAAGA R: CAAGTGTGCATGCAAAAAGAA
Fulgens68	(agtg) <sub>9</sub>	F: ACCTTTTTCCATTCTGCAA R: TTGCCTGGCCTAACATTTC
Fulgens69	(gtga) <sub>9</sub>	F: TGGAGTGGCGTCAACTTACA R: CAACTCATTGCTGATTATGGC
Fulgens70	(tcac) <sub>9</sub>	F: ATGCGTAAAGCCCATTCTG R: GATCACTTTGAGGACCTGGG

Las condiciones de amplificación para cada loci microsatélite fueron similares. Se utilizaron temperaturas de acoplamiento parecidas o iguales en varios loci, de tal manera que pudieran amplificarse al mismo tiempo en un mismo termociclador. En la Tabla II se indican las temperaturas de acoplamiento, número de alelos y tamaños alélicos del análisis de ocho individuos.

De los protocolos utilizados, en la mayoría de los casos se obtuvieron mejores resultados con el protocolo de Yoshida y Awaji (2000).

Los loci microsatélites seleccionados sobre una muestra de ocho individuos, presentaron de 5-9 alelos. Se descartaron aquellos que tuvieron un número de alelos menor considerándolos poco polimórficos.

Tabla II. Condiciones de amplificación de loci microsatélites seleccionados como potenciales a utilizar en análisis genéticos de *Halotis fulgens*. Ta, temperatura de acoplamiento; N<sub>A</sub>, número de alelos; pb, número de pares de bases.

<b>Locus</b>	<b>Ta</b>	<b>N<sub>A</sub></b>	<b>Tamaño de alelos (pb)</b>
Fulgens10 <sup>b</sup>	57°C	9	102-154
Fulgens13 <sup>ab</sup>	55°C	6	210-262
Fulgens19 <sup>ab</sup>	53°C	9	213-261
Fulgens24 <sup>ab</sup>	55°C	6	184-216
Fulgens26 <sup>a</sup>	55°C	8	186-234
Fulgens29 <sup>ab</sup>	53°C	6	139-159
Fulgens32 <sup>b</sup>	53°C	6	95-127
Fulgens36 <sup>ab</sup>	53°C	5	161-177
Fulgens38 <sup>ab</sup>	58°C	8	223-263
Fulgens40 <sup>a</sup>	57°C	5	150-170
Fulgens42 <sup>ab</sup>	57°C	8	149-293
Fulgens43 <sup>a</sup>	57°C	5	155-171
Fulgens44 <sup>a</sup>	55°C	7	174-198
Fulgens45 <sup>a</sup>	55°C	6	120-140
Fulgens46 <sup>a</sup>	55°C	7	162-190
Fulgens48 <sup>b</sup>	55°C	6	125-149
Fulgens57 <sup>a</sup>	57°C	6	165-188
Fulgens58	53°C	9	252-296
Fulgens60 <sup>a</sup>	57°C	7	210-250
Fulgens63 <sup>b</sup>	57°C	6	179-199
Fulgens64 <sup>ab</sup>	53°C	7	107-143
Fulgens68	51°C	5	89-105
Fulgens69 <sup>a</sup>	55°C	9	128-198
Fulgens70 <sup>a</sup>	57°C	8	154-174

<sup>a</sup> Amplificación con protocolo Yoshida y Awaji (2000); <sup>b</sup> Loci caracterizados y empleados en análisis posteriores.

Se caracterizaron 12 loci microsatélites de los 24 potenciales a utilizar (Tabla II). Se seleccionaron aquellos que tuvieran más de 6 alelos y que potencialmente fueran más polimórficos al incrementar el tamaño de muestra, para esto se buscó que el intervalo entre alelos (en pares de bases) fuera amplio. Esta caracterización se realizó con individuos de tres sitios de colecta: (1) Clam Bay en Bahía Tortugas, (2) zona sublitoral de La Bocana y (3) zona mesolitoral de La Bocana (La Puntita).

En general, los 12 loci fueron los suficientemente informativos para utilizarse en análisis genéticos con un número de alelos de 5-17. Los loci presentaron valores de  $H_E$  de 0.699-0.921 en los tres sitios de colecta, así como un PIC de 0.648-0.906. El locus Fulgens19 se



consideró el más polimórfico con los valores de  $H_E$  y PIC más altos, así como con el mayor  $N_A$  en La Bocana y La Puntita.

Todos los loci estuvieron en Equilibrio de Hardy-Weinberg, después del ajuste secuencial de Bonferroni ( $P < 0.00416$ ), excepto el locus Fulgens13 en La Bocana ( $P = 0.001$ ). La mayoría de los loci presentaron frecuencias de alelos nulos menores a 0.05 (Tablas III, IV y V).

En la caracterización de Clam Bay (Tabla III) se encontró que los loci Fulgens29 y Fulgens48 presentaron frecuencias de alelos nulos mayores a 0.05, que se consideran altas para utilizarse en análisis genéticos. Esto coincidió con un déficit de heterocigotos en la  $H_o$ , en comparación a lo esperado en EHW ( $H_E$ ), aunque el déficit de heterocigotos no fue tan alto como para que provocara una desviación significativa del Equilibrio de Hardy-Weinberg después de la corrección secuencial de Bonferroni.

Tabla III. Caracterización de loci microsatélites con individuos de Clam Bay. \* Desviación significativa del Equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0.00416$ ); n, número de individuos analizados;  $N_A$ , número de alelos;  $H_o$ , Heterocigosidad observada;  $H_E$ , Heterocigosidad esperada;  $P$ , probabilidad del EHW; PIC, Contenido de Información Polimórfica; F (nulos), frecuencia de alelos nulos.

<b>Locus</b>	<b>n</b>	<b><math>N_A</math></b>	<b>Intervalo de tallas (pb)</b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_E</math></b>	<b><math>P</math></b>	<b>PIC</b>	<b>F (nulos)</b>
Fulgens10	58	17	110-174	0.931	0.886	0.569	0.867	-0.0317
Fulgens13	58	15	202-270	0.862	0.876	0.154	0.856	+0.0033
Fulgens19	58	14	213-277	0.931	0.921	0.485	0.906	-0.0100
Fulgens24	58	11	176-224	0.845	0.829	0.322	0.801	-0.0120
Fulgens29	58	9	135-171	0.672	0.783	0.056	0.744	+0.0731
Fulgens32	58	8	95-147	0.707	0.699	0.611	0.659	-0.0149
Fulgens36	58	5	161-181	0.690	0.748	0.219	0.700	+0.0354
Fulgens38	58	16	223-291	0.897	0.860	0.868	0.837	-0.0235
Fulgens43	58	10	147-179	0.759	0.789	0.889	0.753	+0.0203
Fulgens48	58	8	125-153	0.517	0.703	0.022	0.648	+0.1535
Fulgens63	58	6	179-207	0.793	0.783	0.343	0.742	-0.0130
Fulgens64	58	9	107-147	0.862	0.867	0.453	0.843	-0.0007

Al realizar la caracterización de los loci de la muestra de la zona sublitoral de La Bocana (Tabla IV), el locus Fulgens13 presentó desviación significativa del EHW con déficit de heterocigotos y frecuencia alta de alelos nulos; se observó que había individuos homocigotos de alelos poco frecuentes (datos no presentados) lo que provocó este desequilibrio. Además el locus Fulgens48 presentó nuevamente una frecuencia alta de alelos nulos, pero sin desviación del EHW después del ajuste secuencial de Bonferroni.

Tabla IV. Caracterización de loci microsatélites con individuos de la zona sublitoral de La Bocana. \* Desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0.00454$ );  $n$ , número de individuos analizados;  $N_A$ , número de alelos;  $H_O$ , Heterocigosidad observada;  $H_E$ , Heterocigosidad esperada;  $P$ , probabilidad de EHW; PIC, Contenido de Información Polimórfica;  $F$  (nulos), frecuencia de alelos nulos.

Locus	n	$N_A$	Intervalo de tallas (pb)	$H_O$	$H_E$	$P$	PIC	$F$ (nulos)
Fulgens10	42	14	102-162	0.833	0.904	0.745	0.884	+0.0345
Fulgens13	42	12	202-266	0.643	0.865	0.001*	0.840	+0.1469
Fulgens19	41	17	161-273	0.976	0.918	0.807	0.900	-0.0376
Fulgens24	42	12	172-224	0.833	0.862	0.438	0.837	+0.0081
Fulgens29	42	7	135-159	0.786	0.773	0.340	0.728	-0.0201
Fulgens32	42	8	95-131	0.810	0.733	0.932	0.700	-0.0791
Fulgens36	42	8	157-185	0.738	0.736	0.537	0.689	-0.0046
Fulgens38	42	13	219-291	0.952	0.886	0.864	0.863	-0.0423
Fulgens43	42	12	143-175	0.786	0.808	0.297	0.773	+0.0004
Fulgens48	42	7	125-153	0.595	0.725	0.009	0.671	+0.0901
Fulgens63	42	6	179-199	0.833	0.803	0.891	0.765	-0.0262
Fulgens64	42	12	107-151	0.905	0.869	0.423	0.843	-0.0233

La muestra de la zona mesolitoral de La Puntita (Tabla V), mostró nuevamente al locus Fulgens48 con frecuencia alta de alelos nulos y deficiencia de heterocigotos. El locus Fulgens36 también presentó en ésta muestra una frecuencia de alelos nulos marginalmente alta.

Tabla V. Caracterización de loci microsatélites con individuos de la zona mesolitoral de La Puntita en La Bocana. \* Desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0.00416$ ); n, número de individuos analizados;  $N_A$ , número de alelos;  $H_O$ , Heterocigosidad observada;  $H_E$ , Heterocigosidad esperada;  $P$ , probabilidad del EHW; PIC, Contenido de Información Polimórfica; F (nulos), frecuencia de alelos nulos.

<b>Locus</b>	<b>n</b>	<b><math>N_A</math></b>	<b>Intervalo de tallas (pb)</b>	<b><math>H_O</math></b>	<b><math>H_E</math></b>	<b><math>P</math></b>	<b>PIC</b>	<b>F (nulos)</b>
Fulgens10	59	15	114-170	0.831	0.898	0.278	0.880	+0.0348
Fulgens13	59	16	206-270	0.898	0.886	0.111	0.867	-0.0127
Fulgens19	57	16	213-281	0.877	0.912	0.041	0.896	+0.0148
Fulgens24	59	12	176-224	0.814	0.806	0.501	0.778	-0.0077
Fulgens29	59	8	135-163	0.780	0.784	0.850	0.745	-0.0033
Fulgens32	59	10	95-143	0.814	0.794	0.253	0.763	-0.0171
Fulgens36	59	7	157-181	0.644	0.741	0.053	0.693	+0.0534
Fulgens38	59	14	223-287	0.831	0.851	0.090	0.827	+0.0107
Fulgens43	59	9	147-187	0.712	0.735	0.431	0.693	+0.0190
Fulgens48	59	7	125-149	0.644	0.744	0.028	0.702	+0.0803
Fulgens63	59	6	179-199	0.746	0.782	0.640	0.741	+0.0214
Fulgens64	59	11	107-147	0.898	0.881	0.577	0.860	-0.0158

En el locus Fulgens19 un organismo de la zona sublitoral de La Bocana y dos de La Puntita presentaron tres alelos. Al ser individuos silvestres se descartó la probabilidad de que sean triploides y se verificaron las muestras para eliminar la posibilidad de contaminación. Los individuos con esta característica en este locus no se incluyeron en el análisis de caracterización.

En la prueba de equilibrio de ligamiento no se encontraron valores significativos entre todos los posibles pares de loci, después del ajuste secuencial de Bonferroni, lo que descartó que existiera desequilibrio de ligamiento entre ellos.

## 7.2 Análisis de retención larvaria

### 7.2.1. Colecta de muestras

Como resultado de la búsqueda de juveniles recién asentados (0+) mediante el método anestésico, en la zona sublitoral de La Bocana no se encontraron juveniles de abulón, lo cual pudo deberse a que se utilizó una luz de malla de 1mm<sup>2</sup> y los juveniles presentes no fueron retenidos por tener medidas menores de ancho y/o largo. En el caso de la zona mesolitoral de La Puntita se encontraron 15 juveniles recién asentados, los cuales tuvieron de 1-2 mm de longitud. En Clam Bay, no se realizó colecta de juveniles mediante el método anestésico. En la Tabla VI se presenta el número de individuos colectados para cada sitio de muestreo, incluyendo juveniles de distintas clases de edad. En el Anexo 3 se incluyen las tallas de los organismos colectados en los tres sitios así como su grupo de edad.

Tabla VI. Total de organismos colectados en tres sitios de muestreo: Clam Bay en Bahía Tortugas, zona sublitoral y mesolitoral de La Bocana (La Puntita).

Sitio de muestreo	N° de individuos colectados			Total
	Adultos	Juveniles		
		Colecta directa	Método anestésico	
Clam Bay	58	65	N.R.	123
La Bocana	42	16	0	58
La Puntita	59	15	15	89

N.R. No Realizado.

### 7.2.2 Análisis de muestras

Se extrajo ADN de buena calidad de los organismos de las zonas sublitoral y mesolitoral de La Bocana. Mientras que el ADN de las muestras de Clam Bay se encontró en parte degradado, principalmente en 10 de las muestras.

Cuando se realizó la extracción de ADN de los juveniles recién asentados de La Puntita se obtuvieron concentraciones bajas de 1.3-19.6 ng/ $\mu$ l debido a la pequeña cantidad de tejido que tenían, esto a pesar de realizar las eluciones en 100 $\mu$ l de agua MilliQ.

Se amplificaron 12 loci microsatélites (Tabla II, sección 7.1.) en todos los individuos de los tres sitios de muestreo.

No amplificaron los loci microsatélites con el ADN de cinco juveniles de Clam Bay, debido a que este se encontraba muy degradado. En tres juveniles de La Puntita no amplificaron todos los loci, probablemente por las bajas concentraciones de ADN obtenidas. Estos tres juveniles se descartaron de análisis subsecuentes.

Del total de organismos analizados, 10 individuos presentaron tres alelos en el locus Fulgens19, en estos casos no se utilizó este locus en el análisis de dichos organismos.

### **7.2.3 Análisis de parentesco**

Para realizar los análisis de paternidad se utilizaron 11 loci microsatélites de los 12 amplificados, se descartó el locus Fulgens48 debido a la alta frecuencia de alelos nulos y déficit de heterocigotos que presentó de manera consistente en los tres sitios de colecta (sección 7.1.2). A pesar de que el locus Fulgens13 presentó desviación del EHW se utilizó en los análisis debido a que sólo ocurrió en la muestra de la zona sublitoral de La Bocana.

Los resultados obtenidos en los análisis de paternidad fueron altamente dependientes del número de padres candidatos utilizado en la simulación. El mayor número de asignaciones se obtuvo cuando el número de padres candidatos fue menor (100 candidatos). Conforme aumentó el número de padres candidatos y disminuyó la proporción de padres muestreados, el número de asignaciones disminuyó hasta 0, lo cual ocurrió primero en Clam Bay cuando se utilizaron 400 padres candidatos mientras que en La Bocana y La Puntita cuando se utilizaron 900 padres candidatos (Tabla VII).

Se observó que el análisis de paternidad se volvió más estricto conforme el número de padres candidatos aumentó, por lo que el tomar valores muy altos puede eliminar asignaciones verdaderas (Falsos negativos o error tipo II) o en el caso contrario subestimar este valor podría permitir asignaciones incorrectas (Falsos positivos o error tipo I).

Para no descartar posibles asignaciones verdaderas en los análisis definitivos, en las secciones siguientes se presentan los resultados obtenidos más detalladamente con el análisis menos estricto (100 padres candidatos) para asignar ambos padres así como un solo padre y a partir de éste análisis se revisaron de manera particular los posibles falsos positivos.

Tabla VII. Total de asignaciones padre-hijo obtenidas en los análisis de paternidad al variar los parámetros de simulación. #P.C., número de padres candidatos.

Sitio de colecta	Número de asignaciones padre-hijo								
	# P.C. 100	# P.C. 150	# P.C. 200	# P.C. 300	# P.C. 400	# P.C. 600	# P.C. 900	# P.C. 1800	# P.C. 2700
Clam Bay	7	4	2	1	0	0	0	0	0
La Bocana	2	2	2	2	2	1	0	0	0
La Puntita	3	2	1	1	1	1	0	0	0

### 7.2.3.1 Análisis de paternidad para asignar ambos posibles padres

No se obtuvieron asignaciones de un juvenil a una pareja de padres con niveles significativos en ninguno de los tres sitios de colecta. Este resultado puede deberse a la dificultad de coleccionar ambos progenitores, ya que son poblaciones abiertas y la probabilidad de coleccionar a ambos padres puede ser baja.

### **7.2.3.2 Análisis de paternidad para asignar un posible padre**

Las asignaciones padre-hijo obtenidas en cada sitio de colecta se cotejaron revisando los genotipos del juvenil y su posible padre (los genotipos se presentan en el Anexo 4).

Cuando el análisis de paternidad se realizó con 100 padres candidatos se observó que varias asignaciones presentaron una no-coincidencia en los genotipos de padres e hijos de Clam Bay y La Puntita, por lo que se procedió a utilizar un valor más estricto de padres candidatos.

Cuando se realizó con 150 padres candidatos, se eliminaron parte de estas asignaciones que tenían no-coincidencias (aquellas que presentaron valores de LOD más bajos), pero se conservaron otras que presentaron posibles alelos nulos ya que uno de los individuos fue homocigoto, y el alelo faltante pudo ser un alelo nulo, por lo que se conservaron estas asignaciones.

Cuando se incrementó el número de padres candidatos a 200 se eliminó una asignación que presentó posibles alelos nulos en el locus Fulgens64, así que para los análisis finales y obtención de valores de LOD se utilizó un valor conservador de 150 padres candidatos y se eliminaron aquellas asignaciones que presentaron una no-coincidencia que no fuera justificable por la presencia de alelos nulos.

Los valores críticos de LOD significativos en dos niveles de confianza para cada sitio de colecta se presentan en la Tabla VIII. Estos valores fueron similares en los tres sitios, ya que los parámetros de la simulación fueron los mismos y el número de adultos analizados fue similar.

Tabla VIII. Valores críticos de LOD significativos para los análisis de paternidad.

Sitio de colecta	Valores críticos de LOD	
	Nivel de confianza 95%	Nivel de confianza 90%
Clam Bay	4.61	3.11
La Bocana	4.79	3.27
La Puntita	4.47	3.01

En Clam Bay se obtuvieron 3 asignaciones padre-hijo (Tabla IX) una con un nivel de confianza del 95% la cual tiene la probabilidad de no exclusión más baja y las demás con un nivel de confianza del 90%.

En las asignaciones del juvenil83-adulto19 y juvenil85-adulto17 presentaron una no-coincidencia en los genotipos de los loci Fulgens13 y Fulgens64 respectivamente, pero estas podrían deberse a la presencia de alelos nulos.

Tabla IX. Juveniles de Clam Bay asignados a un posible padre. ID, nombre o número de identificación del organismo; LOD, Log de la probabilidad de asignación.

ID Juvenil	ID Padre	Valor de LOD	Probabilidad de no exclusión
83	19	5.16*	$6.39 \times 10^{-5}$
33	118	4.33 <sup>+</sup>	$1.79 \times 10^{-3}$
85	17	3.59 <sup>+</sup>	$1.04 \times 10^{-3}$

\* Nivel de confianza 95%; <sup>+</sup> Nivel de confianza 90%.

En el caso de la zona sublitoral de La Bocana las dos asignaciones obtenidas (Tabla X) fueron con un nivel de confianza del 95% y no presentaron incongruencias al comparar los genotipos de adultos y juveniles asignados. En el caso de la asignación juvenilD8-



adultoB3, el análisis sólo se realizó con 10 loci, razón por la cual la asignación pudo haber obtenido un valor de LOD más bajo.

Tabla X. Juveniles de la zona sublitoral de La Bocana asignados a un posible padre. ID, nombre o número de identificación del organismo; LOD, Log de la probabilidad de asignación.

<b>ID Juvenil</b>	<b>ID Padre</b>	<b>Valor de LOD</b>	<b>Probabilidad de no exclusión</b>
D7	D3	6.99*	$1.57 \times 10^{-4}$
D8	B3	5.73*	$4.71 \times 10^{-4}$

\* Nivel de confianza 95%; † Nivel de confianza 90%.

En la zona mesolitoral de La Bocana (La Puntita) se obtuvo una asignación padre-hijo (Tabla XI) con un nivel de confianza del 95% la cual no presenta ninguna incongruencia al comparar los genotipos de la pareja padre-hijo.

Tabla XI. Juveniles de la zona mesolitoral de La Puntita asignados a un posible padre. ID, nombre o número de identificación del organismo; LOD, Log de la probabilidad de asignación.

<b>ID Juvenil</b>	<b>ID Padre</b>	<b>Valor de LOD</b>	<b>Probabilidad de no exclusión</b>
1A-1	3C-1	6.77*	$3.57 \times 10^{-4}$

\* Nivel de confianza 95%; † Nivel de confianza 90%.

Al comparar los valores de LOD de las asignaciones entre sitios de colecta. Se observó que los valores de LOD de las asignaciones de Clam Bay fueron menores que en La Bocana,

esto puede deberse en parte a la presencia de no-coincidencias en las asignaciones de Clam Bay.

#### **7.2.4 Índice de retención larvaria**

Se determinó el índice de retención larvaria para cada sitio con la ecuación (3) propuesta en la sección 6.3.5.

Para Clam Bay se obtuvieron 3 asignaciones de 60 juveniles analizados lo que reflejó un potencial 5% de retención larvaria. Los juveniles asignados se colectaron en las estaciones 1 y 2 de la zona mesolitoral y los padres asignados se encontraron aproximadamente entre 80-120 m en las estaciones 5 y 7 de la zona sublitoral (en la Figura 3 se observa la posición de dichas estaciones).

En la zona sublitoral de La Bocana se asignaron dos de los 16 juveniles analizados lo que reflejó un 12.5% de retención larvaria. Los juveniles se colectaron a aproximadamente 30 m. de distancia de sus posibles progenitores.

En la zona mesolitoral de La Bocana (La Puntita) se obtuvo una asignación de 27 juveniles analizados, lo que indicó un índice de retención larvaria del 3.7%. El juvenil asignado se encontró a aproximadamente 80 m de su posible padre.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Caracterización de loci microsatélites

Los 12 nuevos loci microsatélites en *Haliotis fulgens* del presente trabajo son altamente informativos debido a su alto polimorfismo. Los microsatélites con elevado polimorfismo y con tetranucleótidos como motivo de repetición son ideales para utilizarse en análisis de parentesco debido a que generalmente están asociados a bajas frecuencias de alelos nulos (Munkres *et al.*, 2007). Además, su lectura de genotipos es más clara al haber mayor diferenciación entre un alelo y otro, lo cual disminuye incertidumbre dando mayor certeza durante la genotipificación.

A pesar de que el locus Fulgens13 presentó desviación significativa del Equilibrio de Hardy-Weinberg, sólo ocurrió en este locus y únicamente en la zona sublitoral de La Bocana. La causa posible fue la alta presencia de alelos nulos (0.146), los cuales son motivo frecuente de aparentes desviaciones del EHW en los microsatélites (Pemberton *et al.*, 1995), particularmente cuando sólo ocurre en un locus (Dakin y Avise, 2004). Otra posible explicación es la sobre representación de una clase de heterocigotos sólo por muestreo azaroso, lo cual es posible si consideramos el polimorfismo de este locus y que este locus estuvo en EHW en las otras dos localidades (Díaz-Viloria, 2009). El hecho de que sólo este locus mostró desviación del EHW no necesariamente significa que la población estuvo en desequilibrio. En este locus se observaron individuos homocigotos de un alelo poco común en la muestra lo cual provocó déficit de heterocigotos y desviación del EHW.

Otros dos casos que hay que es necesario tomar con reserva son: los loci Fulgens48 y Fulgens19. El uso del Fulgens48 no es recomendado debido a la elevada frecuencia de alelos nulos (0.08-0.15), hecho que se observó de manera consistente en los tres sitios de colecta. En el Fulgens19 ciertos organismos amplificaron tres alelos únicamente para este locus. Este, al ser el más polimórfico, posiblemente tenga una tasa mutacional alta, y entonces la presencia de tres alelos podría ser consecuencia de una mutación en cierto número de células del individuo, es decir, que tienen un alelo distinto a las demás. Al

respecto, Baranski *et al.* (2006) reportan que cuatro loci microsatélites aislados en *Haliotis rubra* producen un tercer alelo en algunos individuos lo cual atribuyen a la posible amplificación múltiple del locus o duplicación por segmentos similares en las secuencias flanqueantes, o bien, posiblemente porque los microsatélites estén asociados a elementos móviles (Megléczi *et al.*, 2004).

Cabe mencionar que existen 12 loci microsatélites adicionales estandarizados en el presente trabajo, que por ser potencialmente polimórficos podrían utilizarse en análisis genéticos subsecuentes de *H. fulgens*. Sin embargo, es necesario determinar cuáles de ellos son útiles en la práctica.

## **8.2 Análisis de parentesco**

Los resultados obtenidos al variar los parámetros de simulación fueron similares a los que presenta Koch *et al.* (2008), quienes de igual manera observaron que conforme el número de padres candidatos aumentaba, disminuía el número de asignaciones. Así mismo, afirman que si este valor es sobreestimado se pueden eliminar asignaciones verdaderas (falsos negativos o error tipo II) o si es subestimado da lugar a asignaciones falsas (falsos positivos o error tipo I). Por ello es importante evaluar el número de padres candidatos a utilizar en los análisis de paternidad, para utilizar los más adecuados según sea el caso. Para este trabajo el número de padres candidatos utilizado fue de 150, el cual se ajustó mejor a nuestro análisis. El valor utilizado fue congruente a las dimensiones de nuestro estudio, así como a los valores de densidad de adultos observados en el campo.

### **8.2.1 Análisis de paternidad para asignar ambos posibles padres**

En este trabajo, no se lograron asignaciones con valores significativos de ambos padres para un juvenil; sin embargo, es difícil en poblaciones silvestres donde se muestrea al azar encontrar asignaciones para ambos padres (Koch *et al.*, 2008).

Babcock y Keesing (1999) en un estudio con *Haliotis leavigata* concluyeron que la tasa de fertilización disminuye conforme la distancia entre adultos aumenta, disminuyendo significativamente entre 1-4 m por lo que se esperaría que ambos padres no estén a grandes distancias. De ser así, en las asignaciones de un solo padre obtenidas en este trabajo, presuntamente existe una probabilidad alta de que el otro progenitor estuviera dentro de nuestra área de muestreo (200 m<sup>2</sup>) al momento del desove pero que no fuera colectado al momento de la búsqueda, pues hay que considerar que a pesar de que el abulón presenta un movimiento limitado, de todas formas se desplaza. Por ejemplo, Coates *et al.* (2013) mencionaron que el desplazamiento del abulón amarillo generalmente es dentro de un área local (en un área promedio de 183 m<sup>2</sup>) pero realizan incursiones alejándose de un sitio principalmente a 5-10 m e inclusive a distancias mayores, con un patrón regular de “ir y regresar” a esta área. Lo anterior, podría explicar por qué no se encontraron ambos padres dentro de los cuadrantes muestreados.

### **8.2.2 Análisis de paternidad para asignar un posible padre**

Las asignaciones padre-hijo consideradas en el índice de retención larvaria fueron significativas, principalmente aquellas que se obtuvieron con análisis más estrictos. Aun así, se eliminaron aquellas asignaciones con no-coincidencias que no fueran resultado de la posible presencia de alelos nulos. Christie *et al.* (2010) obtuvieron una asignación significativa con una no-coincidencia, la cual descartaron por ser una aparente incompatibilidad mendeliana con alelos heterocigotos, y con esto evitar incrementar el error tipo I en los análisis. Sin embargo, otros estudios como D'Aloia *et al.* (2013) permiten una no-coincidencia en sus asignaciones mientras estas asignaciones sean significativas.

En este trabajo, los valores de LOD obtenidos en las asignaciones padre-hijo fueron mayores a los reportados por Díaz-Viloria *et al.* (2013) pero menores a los obtenidos por Koch *et al.* (2008). Otros estudios que han utilizado CERVUS no reportan los valores de LOD de las asignaciones (D'Aloia *et al.*, 2013) pero utilizaron un valor crítico de LOD de 4.0 con un nivel de confianza del 95%, el cual es similar al considerado en este trabajo.

El hecho de que las asignaciones de La Bocana coincidieran en todos los loci amplificados pero que en el caso de Clam Bay se encontraran asignaciones con no-coincidencias puede deberse a que la calidad del ADN no era óptima, ya que la calidad y cantidad de ADN puede afectar la amplificación de los microsatélites y causar la aparición de alelos nulos y errores de amplificación (Taberlet *et al.*, 1996; Gagneux *et al.*, 1997; Dakin y Avise, 2004).

Ya que la precisión de las asignaciones aumenta con el número de loci y la diversidad alélica, siendo estos factores los más importantes para obtener asignaciones correctas (Bernatchez y Duchesne, 2000; Harrison *et al.*, 2013), consideramos que si se incrementa el número de loci microsatélites utilizado en los análisis de paternidad, nos permitiría confirmar las asignaciones padre-hijo descartadas, y disminuir las probabilidades de no exclusión. Al respecto, Harrison *et al.* (2013) mencionan que cuando se utilizan 20 loci microsatélites polimórficos se minimizan casi por completo los errores tipo I y tipo II de los análisis de paternidad.

### **8.3 Índice de retención larvaria**

Los índices de retención larvaria encontrados en este estudio (3.7-12.5%) fueron bajos en comparación a los reportados en otros estudios como en peces que consideran un alto auto-reclutamiento (Jones *et al.*, 2005; Planes *et al.*, 2009; Carreras-Carbonell *et al.*, 2007; Berumen *et al.*, 2012). Aunque, Christie *et al.* (2010) consideraron que el encontrar pocas asignaciones padre-hijo en grandes poblaciones abiertas con pocos organismos colectados, sugiere que existe alto grado de auto-reclutamiento, nosotros no consideramos esto como evidencia suficiente para confirmar que los resultados de retención larvaria encontrados en este estudio, sean suficientes para sugerir un importante índice de retención larvaria en los sitios de estudio. Sin embargo, si podemos confirmar la presencia de auto-reclutamiento en escalas de decenas a centenas de metros (30-120 m). Lo anterior, coincide con trabajos que deducen por experimentos ecológicos que las larvas se pueden asentar en el mismo arrecife natal en escalas de decenas de metros (Prince *et al.*, 1987; Prince *et al.*, 1988; McShane *et al.*, 1988) o en escalas de cientos metros (Shepherd *et al.*, 1992; Sasaki y Shepherd, 1995).

Cabe mencionar, que se desconoce si los juveniles no asignados en los análisis de paternidad provienen del área circundante al sitio de colecta (lo que incrementaría el índice de retención larvaria) o si provienen de sitios lejanos (lo que apoyaría la hipótesis del transporte larvario a mayores distancias).

Los índices de retención larvaria del 5% en Clam Bay (3 juveniles de 65) y del 3.7% (1 juvenil de 30) en la zona mesolitoral de La Bocana (La Puntita) fueron similares al reportado en Díaz-Viloria *et al.* (2013) en abulón amarillo, quienes determinaron un 4% (2 juveniles de 51 colectados) de retención larvaria, aunque mencionaron, que este índice puede estar subestimado debido a que no colectaron la mayoría de los padres candidatos.

De igual manera D' Aloia *et al.* (2013) en una especie de pez arrecifal reporta un auto-reclutamiento del 4.6% (9 juveniles de 194 colectados) en un área menor a 1 km, lo cual se asemeja a lo reportado en este estudio.

En la zona sublitoral de La Bocana se encontró un mayor índice de retención larvaria con 12.5% (dos juveniles asignados de 16 colectados) comparado con la zona mesolitoral (La Puntita) con 3.7%. Esta mayor retención puede ser explicada por la presencia de mantos algales de *Eisenia* en la zona sublitoral, los cuales reducen la velocidad de las corrientes (Rosman *et al.*, 2007) siendo uno de los factores que favorecen la retención larvaria (McShane *et al.*, 1988; Guzmán del Prío *et al.*, 2000; Selkoe *et al.*, 2010).

En el caso de Clam Bay, las asignaciones encontradas fueron entre juveniles de estaciones de la zona mesolitoral y adultos de la zona sublitoral, lo cual sugiere que parte de la progenie que no se asentó en la misma zona de los adultos, fue desplazada hacia la orilla encontrando un sitio más adecuado en la zona mesolitoral. Trabajos como los de Sasaki y Shepherd (1995) y Miyake *et al.* (2000) mencionan que las larvas pueden ser transportadas hacia la costa por la acción del viento sobre las corrientes superficiales.

En conclusión consideramos que la retención larvaria puede estar ocurriendo tanto en la zona sublitoral como en la zona mesolitoral y entre estas dos áreas, y que el índice de

retención larvaria en Clam Bay y en la zona mesolitoral de La Bocana (La Puntita) podría aún ser mayor si se confirman las presuntas asignaciones que fueron descartadas.

Por otro parte, la conectividad genética existente en abulón azul en la parte central de la península de Baja California demostrada a escala evolutiva por Zuñiga *et al.* (2000) y Gutiérrez-González *et al.* (2007) quienes hablan de homogeneidad genética entre sus poblaciones, podría estar ocurriendo también en escalas ecológicas de un sitio cercano a otro (Díaz-Viloria, 2009). Si efectivamente, la conectividad entre sitios cercanos es en escalas ecológicas, es posible que la presencia de retención larvaria local sea importante pero con eventos de conectividad entre poblaciones cercanas, ya que sólo se necesita un intercambio de 10 individuos cada generación para que exista una homogeneidad entre éstas (Hedgecock *et al.*, 2007). Además, ciertos aspectos de la biología y ecología larvaria actúan en contra del transporte a grandes distancias. Dichos aspectos son: su corto período de vida planctónico de 3.5 o hasta 12 días (Leighton, 1974; Leighton *et al.*, 1981); el que sean lecitotróficas, les permite retrasar sólo poco días el asentamiento antes de agotar sus reservas (Leighton, 1972), disminuyendo la tasa de supervivencia (Takami *et al.* 2002). Además, las migraciones verticales que realizan las larvas y la selectividad del sustrato para el asentamiento (McShane, 1992) puede ocasionar que eviten corrientes superficiales (Forward *et al.*, 1989).



## 9. CONCLUSIONES

De los 24 loci microsatélites obtenidos, se caracterizaron 12 loci polimórficos para *Haliotis fulgens*, 11 de los cuales resultaron útiles para utilizarlos en análisis de parentesco por su alto polimorfismo (Número de alelos: 5-17;  $H_E$ : 0.69-0.92; PIC: 0.64-0.90) y por presentar Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Se encontraron asignaciones significativas de un juvenil a un posible padre, pero no para ambos padres.

El uso de loci microsatélites en análisis de paternidad permite determinar de manera directa si existe retención larvaria en un banco específico de abulón e incluso determinar en qué escalas espaciales ocurre el auto-reclutamiento.

El índice de retención larvaria encontrado en *Haliotis fulgens* en los sitios de estudio fue del 3.7%-12.5% en escalas de decenas a centenas de metros (30-120 m). El auto-reclutamiento se presenta tanto en bancos de la zona sublitoral como de la zona mesolitoral. Las larvas producidas por adultos en la zona sublitoral también pueden encontrar un sitio adecuado para su asentamiento en la zona mesolitoral.

En la escala de decenas de metros analizada en este trabajo, el auto-reclutamiento ocurrió en menor proporción respecto al reclutamiento proveniente de padres ubicados fuera del área de muestreo.

## **10. RECOMENDACIONES**

En futuras aplicaciones de análisis genéticos de paternidad, como una herramienta para medir de manera directa el auto-reclutamiento en un banco de abulón, se recomienda incrementar la escala espacial del muestreo del banco, lo que podría aumentar la proporción de auto-reclutamiento encontrada en este trabajo.

## 11. LITERATURA CITADA

Babcock R. y J. Keesing. 1999. Fertilization biology of the abalone *Haliotis laevis*: laboratory and field studies. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 56: 1668-1678.

Baranski, M., M. Rourke, S. Loughnan, C. Austin, N. Robinson. 2006. Isolation and characterization of 125 microsatellite DNA markers in the blacklip abalone, *Haliotis rubra*. *Mol. Ecol. Notes.* 6: 740-746.

Belmar-Pérez J. y S.A. Guzmán-del Prío. 1992. Madurez sexual y ciclo gonádico en *Haliotis fulgens* y *Astraea undosa* en Bahía Tortugas. Memorias Taller México-Australia sobre reclutamiento de Recursos Bentónicos de Baja California. 121-129.

Bernatchez, L. y P. Duchesne. 2000. Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many loci, how many alleles? *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 57: 1-12.

Berumen, M.L., G.R. Almany, S. Planes, G.P. Jones, P. Saenz-Agudelo, S.R. Thorrold. 2012. Persistence of self-recruitment and patterns of larval connectivity in marine protected area network. *Ecol. Evol.* 2 (2): 444-453.

Brown L.D. y N.D. Murray. 1992. Population genetics, gene flow, and stock structure in *Haliotis rubra* and *Haliotis laevis*. En: Shepherd, S.A., Tegner M.J., Guzmán-del Prío S.A. (eds). *Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture*. Fishing News Books. USA. 24-33.

Burton, R.S. y M.J. Tegner. 2000. Enhancement of red abalone *Haliotis rufescens* stocks at San Miguel Island: reassessing a success story. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 202: 303-308.

Carreras-Carbonell, J., E. Macpherson, M. Pascual. 2007. High self-recruitment levels in a Mediterranean littoral fish population revealed by microsatellite markers. *Mar. Biol.* 151: 719-727.

CONAPESCA. 2011. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2011. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. México. 305p.

Coates, J.H., K.A. Hovel, J.L. Butler, A.P. Klimley, S.G. Morgan. 2013. Movement and home range of pink abalone *Haliotis corrugata*: implications for restoration and population recovery. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 486: 189-201.

Chambers, M.D., G.R. VanBlaricom, L. Hauser, F. Utter, C.S. Friedman. 2006. Genetic structure of black abalone (*Haliotis cracherodii*) populations in the California islands and central California coast: Impacts of larval dispersal and decimation from withering syndrome. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 331: 173-185.

Christie, M.R., D.W. Johnson, C.D. Stallings, M.A. Hixon. 2010. Self-recruitment and sweepstakes reproduction amid extensive gene flow in a coral-reef fish. *Mol. Ecol.* 19: 1042-1057.

D'Aloia, C.C., S.M. Bogdanowicz, J.E. Majoris, R.G. Harrison, P.M. Buston. 2013. Self-recruitment in a Caribbean reef fish: a method for approximating dispersal kernels accounting for seascape. *Mol. Ecol.* 22: 2563-2572.

Dakin, E.E. y J.C. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity.* 93: 504-509.

Díaz-Viloria. 2009. Conectividad genética entre poblaciones de abulón amarillo (*Haliotis corrugata*; Wood, 1828). Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Díaz-Viloria, N., P. Cruz, S.A. Guzmán-del Prío, R. Perez-Enriquez. 2009. Genetic connectivity among pink abalone *Haliotis corrugata* populations. *J. Shellfish Res.* 28 (3): 599-608.

Díaz-Viloria, N., S.A. Guzmán-del Prío, P. Cruz, R. Perez-Enriquez. 2013. Assessment of self-recruitment in a pink abalone (*Haliotis corrugata*) aggregation by parentage analyses. *J. Shellfish Res.* 32 (1): 105-113.

- Excoffier, L., G. Laval, S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for populations genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Forster, G.R., G.W. Pots, R. Swinfen. 1982. Changes in the former population of Guernsey and Jersey. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 62: 717-727.
- Forward, R.B., C.A. Wellins, C.U. Buswell. 1989. Behavioural response of larvae of the crab *Neopanope sayi* to hydrostatic pressure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 57: 267-277.
- Gagneux, P., C. Boesch, D.S. Woodruff. 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Mol. Ecol.* 6:861-868.
- Giorgi, A.E. y J.D. DeMartini. 1977. A study of the reproductive biology of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson, near Mendocino, California. *Calif. Fish Game.* 63 (2): 80-94.
- Gruenthal K.M., L.K. Acheson, R.S. Burton. 2007. Genetic structure of natural populations of California red abalone (*Haliotis rufescens*) using multiple genetic markers. *Mar. Biol.* 152: 1237-1248.
- Gruenthal K.M. y R.S. Burton. 2008. Genetic structure of natural populations of the California black abalone (*Haliotis cracherodii* Leach, 1814), a candidate for endangered species status. *J. Exp. Biol. Ecol.* 355: 47-58.
- Gutiérrez-González, J.L., P. Cruz, M.A. del Río-Portilla, R. Perez-Enriquez. 2007. Genetic structure of green abalone *Haliotis fulgens* population of Baja California, México. *J. Shellfish Res.* 26 (3): 839–846.
- Guzmán-del Prío, S.A. 1992. A review of the biology of abalone and its fishery in México. En: Shepherd, S.A., Tegner M.J., Gúzman-del Prío S.A. (eds). *Abalone of the World. Biology, Fisheries and Culture.* Fishing News Books. USA. 341-360.

- Guzmán-del Prío, S.A., J. Carrillo-Laguna, J. Belmar-Pérez, L. Carreón-Palau, A. Castro. 2004. Transplanting of wild and cultivated juveniles of green abalone (*Haliotis fulgens* Philippi 1845): growth and survival. *J. Shellfish Res.* 23 (3): 855-860.
- Guzmán-del Prío, S.A., F. Salinas, O. Zaytsev, J. Belmar-Pérez, J. Carrillo-Laguna. 2000. Potential dispersion of reproductive products and larval stages of abalone (*Haliotis* spp.) as a function of the hydrodynamics of Bahía Tortugas, México. *J. Shellfish Res.* 2:869-881
- Hamm D.E y R.S. Burton. 2000. Population genetics of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the central California coast. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 254: 235-247.
- Harrison, H.B., P. Saenz-Agudelo, S. Planes, G.P. Jones, M.L. Berumen. 2013. Relative accuracy of three common methods of parentage analysis in natural populations. *Mol. Ecol.* 22: 1158-1170.
- Hedgecock, D. 2010. Determining parentage and relatedness from genetic markers sheds light on patterns of marine larval dispersal. *Mol. Ecol.* 19: 845–847.
- Hedgecock, D., P.H. Barber, S. Edmans. 2007. Genetics approaches to measuring connectivity. *Oceanography.* 20(3):70-79.
- Hillis, D.M., C. Moritz, B.K. Mable. 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates Inc. Second edition. E.U.A. 655p.
- Huang, B.X., R. Peakall, P.J. Hanna. 2000. Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Mar. Biol.* 136: 207-216.
- Jones, G.P., S. Planes, S.R. Thorrold. 2005. Coral reef fish larvae settle close to home. *Current Biol.* 15: 1314-1318.
- Kalinowski, S.T., M.L. Taper, T.C. Marshall. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16: 1099-1106.

- Koch, M., J.D. Hadfield, K.M. Sefc, C. Sturmbauer. 2008. Pedigree reconstruction in wild cichlid fish population. *Mol. Ecol.* 17: 4500-4511.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- León-Carballo, G., y M. Muciño-Díaz. 1995. Nota informativa sobre la pesquería de abulón en Baja California. Centro Regional de Investigaciones Pesqueras La Paz. Informe Técnico del INP. 1-6.
- León-Carballo, G., y M. Muciño-Díaz. 1996. Pesquería de Abulón. En: Casas-Valdez, M. y Ponce-Díaz, G. (eds.). Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. Vol. I. SEMARNAP. México. 15-41.
- Leighton, D.L. 1974. The influence of temperature on larval and juvenile growth in three species of southern California abalones. *US. Dept. Commerce, Fishery Bulletin.* 72(4): 1137-1145.
- Leighton, D.L. 2000. The biology and culture of the California abalones. Dorrance Publishing. USA. 216p.
- Leighton, D.L., M.J. Byhower, J.C. Kelly, G.N. Hooker, D.E. Morse. 1981. Acceleration of development and growth in young green abalone (*Haliotis fulgens*) using warmed effluent seawater. *J. World Maricult. Soc.* 12(1):170-180.
- Mardis, E.R. 2008. Next-Generation DNA sequencing methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9: 387-402.
- Mazón-Suástegui J.M., M. Muciño-Díaz, L.A. Bazúa-Sicre. Cultivo de abulón *Haliotis* spp. En: Casas-Valdez, M. y Ponce-Díaz, G. (eds.). Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur. Vol. II. SEMARNAP. México. 475-511.
- McShane, P.E. 1992. Early life history of abalone: a review. In: Shepherd, S.A., Tegner, M.J., Guzmán-del Prío, S.A. (eds). *Abalone of the World: Biology, Fisheries and Culture.* Fishing News Books, Oxford. 120-138.

McShane, P.E., K.P. Black, M.G. Smith. 1988. Recruitment processes in *Haliotis rubra* (Mollusca: Gastropoda) and regional hydrodynamics in southeastern Australia imply localized dispersal larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 124: 175-203.

McShane, P.E. y M.G. Smith. 1988. Measuring abundance of juvenile abalone, *Haliotis rubra* Leach (Gastropoda: Haliotidae); comparison of a novel method with two other methods. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 39: 331-336.

Megléczy, E., C. Costedoat, V. Dubut. 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics* 26:403-404.

Megléczy, E., F. Petenian, E. Danchin, A.C. D'Acier, J. Rasplus, E. Faure. 2004. High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within each of two species of Lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. *Mol. Ecol.* 13: 1693-1700.

Miller, K.J., K. Laberee, K.H. Kaukinen, S. Li, R.E. Withler. 2001. Development of microsatellite loci in pinto abalone (*Haliotis kamtschatkana*). *Mol. Ecol. Notes.* 1: 315-317.

Miller, K.J., B.T. Maynard, C.N. Mundy. 2009. Genetic diversity and gene flow in collapsed and healthy abalone fisheries. *Mol. Ecol.* 18:200-211.

Miyake, Y., S. Kimura, T. Kawamura, T. Horii, H. Kurogi, T. Kitagawa. 2009. Simulating larval dispersal processes for abalone using a coupled particle-tracking and hydrodynamic model: implications for refugium design. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 387: 205-222.

Miyake, Y., S. Kimura, T. Kawamura, T. Kitagawa, T. Takahashi, H. Takami. 2011. Population connectivity of Ezo abalone on the northern Pacific coast of Japan in relation to the establishment of harvest refugia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 440: 137-150.

Muciño-Díaz, M., J.A. Vélez-Barajas, J.R. Turrubiates-Morales, M.A. Reinecke. 1995. Aspectos reproductivos del recurso abulón en las zonas II, III y IV y su relación con la



ampliación del periodo de veda. México. Centro Regional de Investigación Pesquera en La Paz. Informe Técnico del Instituto Nacional de Pesca.

Munkres, K.P., L.K. Bay, D.R. Jerry, M.I. McCormick, L. Van-Herwerden. 2007. Development and characterization of microsatellite markers for parentage analyses of the coral reef damselfish (*Pomacentrus amboinensis*: Pomacentridae). *Conserv. Genet.* 8: 987-990.

Ortiz-Quintanilla, M. y G. León-Carballo. 1988. Recursos Pesqueros de México y sus Perspectivas. Recurso abulón (*Haliotis* spp.). En: Recursos Pesqueros del País. INP. 11-51.

Ortiz-Quintanilla, M., G. León-Carballo, M.A. Reinecke-Reyes, A. Lelevier-Grijalva, J.M. Turrubiates-Morales, J.G. González-Aviles. 1990. Proceso reproductivo en especies de abulón (*Haliotis* spp.) y su relación con los mecanismos regulatorios pesqueros en la costa occidental e islas de la península de Baja California, México. Res. VIII Simposio Internacional de Biología Marina. UABC, Ensenada, México. 156-163.

Pemberton, J.M., J. Slate, D.R. Bancroft, J.A. Barrett. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.* 4: 249-252.

Planes, S., G.P. Jones, S.R. Thorrold. 2009. Larval dispersal connects fish populations in a network of marine protected areas. *PNAS* 106 (14): 5693-5697.

Prince, J.D., T.L. Sellers, W.B. Ford, S.R. Talbot. 1987. Experimental evidence for limited dispersal of haliotid larvae (genus *Haliotis*; Mollusca: Gastropoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 106: 243-263.

Prince, J.D., T.L. Sellers, W.B. Ford, S.R. Talbot. 1988. Confirmation of a relationship between the localized abundance of breeding stock and recruitment for *Haliotis rubra* Leach. (Mollusca: Gastropoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 122: 91-104.

Rawlings, J.O. 1988. Applied regression analysis. A research tool. Wadsworth & Brooks. Belmont, CA. 533p.

Ricker, W.E. 1975. Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. Department of the Environment Fisheries and Marine Service. Ottawa. Bulletin 191. 381p.

Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43(1): 223-225.

Rosman, J.H., J.R. Koseff, S.G. Monismith, J. Grover. 2007. A field investigation into the effects of a kelp forest (*Macrocystis pyrifera*) on coastal hydrodynamics and transport. *J. Geophys. Res.* 112: C02016.

Rozen, S. y H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. En: Misener S. y Krawetz S.A. (eds). *Methods in molecular biology*. Human Press Inc. Totowa.

SAGARPA. 2012. Acuerdo por el que se da a conocer la Actualización de la Carta Nacional Pesquera 2012. D.O.F. 24 de agosto de 2012. Segunda sección. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 21-128.

Sasaki R. y S.A. Shepherd. 1995. Larval Dispersal and Recruitment of *Haliotis discus hannai* and *Tegula* spp. on Miyagi Coasts, Japan. *Mar. Freshwater Res.* 46: 519-529.

Selkoe, K.A., J.R. Watson, C. White, T.B. Horin, M. Iacchei, S. Mitarai, D.A. Siegel, S.D. Gaines, R.J. Toonen. 2010. Taking the chaos out of genetic patchiness: seascape genetics reveals ecological and oceanographic drivers of genetic patterns in the three temperate reef species. *Mol. Ecol.* 19: 3708-3726.

Shepherd, S.A. y J. Brown. 1993. What is an abalone stock? Implications for the role of refugia in conservation. *Can. J. Fisheries Aquatic Sci.* 50: 2001-2009.

Shepherd, S.A., S.A. Gúzman-del Próo, J. Turrubiates, J. Belmar, J.L. Baker, P.R. Sluczanowski. 1991. Growth, Size at Sexual Maturity, and Egg-Per-Recruit Analysis of the Abalone *Haliotis fulgens* in Baja California. *The Veliger* 34(4): 324-330.

- Shepherd, S.A., D. Lowe, D. Partington. 1992. Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*) XIII: larval dispersal and recruitment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 164: 247-260.
- Sierra-Rodríguez, P., M. Muciño-Díaz, J.L. Gutiérrez-González, J.R. Turrubiates-Morales. 2006. La pesquería del abulón. En: Arreguín-Sánchez, F., Beléndez-Moreno, L., Méndez-Gómez, H.I., Solana-Sansores, R., Rangel-Dávalos, C. (eds.). *Sustentabilidad y Pesca responsable en México: Evaluación y manejo*. Instituto Nacional de Pesca. México. 3-38.
- Slate, J., T. Marshall, J. Pemberton. 2000. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Mol. Ecol.* 9:801-808.
- Taberlet, P., S. Griffin, B. Goossens. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research.* 24: 3189-3194.
- Takami, H., T. Kawamura, Y. Yamashita. 2002. Effects of delayed metamorphosis on larval competence, and postlarval survival and growth of abalone *Haliotis discus hannai*. *Aquaculture.* 213: 311-322.
- Tegner, M.J. y R.A. Butler. 1985. Drift-tube study of the dispersal potential of green abalone (*Haliotis fulgens*) larvae in the southern California Bight: implications for recovery of depleted populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 26: 73-84.
- Temby, N., K. Miller, C. Mundy. 2007. Evidence of genetic subdivision among populations of blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach) in Tasmania. *Mar. Freshwater Res.* 58: 733-742
- Vega, A., G. León-Carballo, M. Muciño-Díaz. 1994. Sinopsis de información biológica, pesquera y acuacultural de los abulones (*Haliotis* spp.) de la península de Baja California, México. Centro Regional de Investigación Pesquera en La Paz. Informe Técnico del Instituto Nacional de Pesca.
- Wagner, A.P., S. Creel, S.T. Kalinowski. 2006. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. *Heredity.* 97: 336-345.

Will, M., M.L. Hale, D.R. Schiel, N.J. Gemmell. 2011. Low to moderate levels of genetic differentiation detected across the distribution of the New Zealand abalone, *Haliotis iris*. Mar. Biol. 158: 1417-1429.

Yoshida, K., y M. Awaji. 2000. Improvement of polymerase chain reaction condition to detect polymorphic dinucleotide repeat microsatellite DNA marker in the puffer fish *Fugu rubripes*. Fish. Sci. 66: 397-399.

Zuñiga, G., S.A. Guzmán-del Prío, R. Cisneros, G. Rodríguez. 2000. Population genetic analysis of the abalone *Haliotis fulgens* (Mollusca: Gastropoda) in Baja California, México. J. Shellfish Res. 19(2): 853-859.

## 12. ANEXOS

### Anexo 1 Obtención de loci microsatélites mediante pirosecuenciación 454

La pirosecuenciación 454 desarrollada por Roche, permite la obtención masiva de secuencias en poco tiempo (horas). El principio de esta tecnología se basa en la técnica denominada emulsión de PCR, la cual permite la amplificación del ADN dentro de un micro-reactor (Fig. 6).

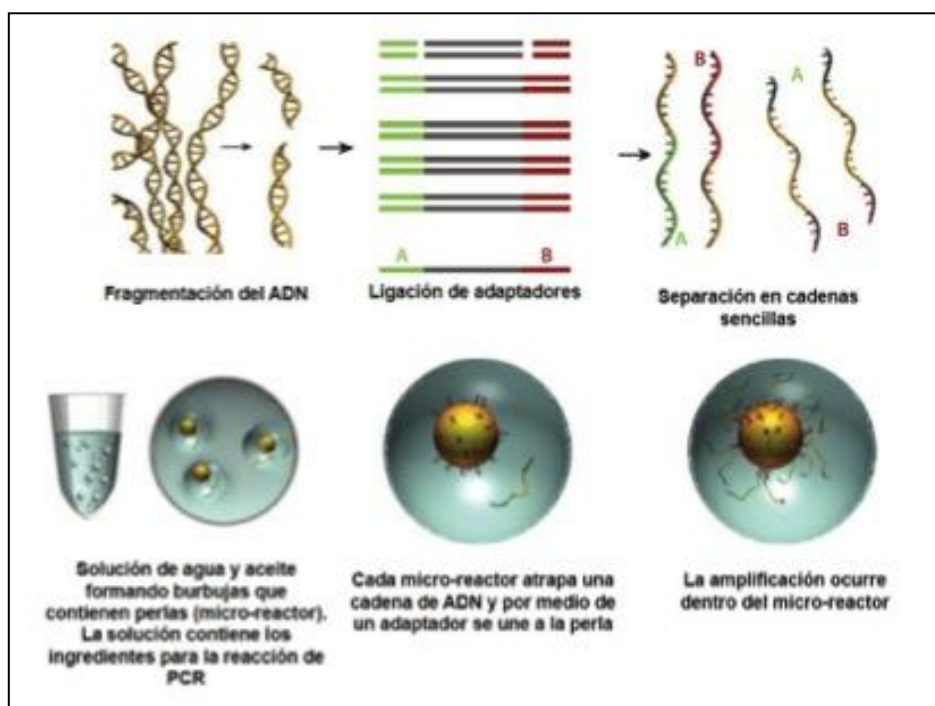


Figura 6. Preparación de ADN y emulsión de PCR (Mardis, 2008)

En la pirosecuenciación, cada incorporación de un nucleótido por la polimerasa resulta en la liberación de pirofosfato, el cual inicia una serie de reacciones en cadena que terminan en la producción de luz. La cantidad de luz es proporcional al número de nucleótidos incorporados. En la aproximación de la pirosecuenciación 454 de Roche, una librería de fragmentos es mezclada con una población de camas de agarosa, cuya superficie lleva oligonucleótidos complementarios y cada cama es asociada con un solo fragmento. Cada uno de estos complejos fragmento-cama está aislado en una micela de agua-aceite que también contiene reactivos para PCR y el termociclado (emulsión de PCR) de las micelas

produce aproximadamente un millón de copias de cada fragmento de ADN en la superficie de cada cama. Las camas son acomodadas en una placa (PTP; estructura capilar de sílica) que contiene cientos de miles de pozos, cada pozo sostiene una sola cama que provee una localización fija en la cual cada una de las reacciones de secuenciación puede ser monitoreada. Se agregan enzimas a la placa (PTP) para catalizar los pasos de reacción de pirosecuenciación. En un instrumento llamado FLX, la placa actúa como una celda de flujo, una solución pura de cada nucleótido es introducida en forma escalonada, tomando una imagen después de incorporar cada solución de nucleótido. El PTP es colocado frente a una cámara que registra la luz emitida en cada cama. El FLX proporciona 100 flujos de cada nucleótido durante una corrida de 8 horas, que produce un promedio de lectura 250 nucleótidos (un promedio de 2.5 bases son incorporadas por flujo). Estas lecturas crudas son procesadas por el programa de análisis 454 y luego pasadas por varios filtros de calidad para remover secuencias de baja calidad. Las lecturas resultantes producen 100 Mb de datos de calidad en promedio. Después del procesamiento de lectura, con un algoritmo (Newbler) se ensamblan las lecturas del FLX (Mardis, 2008).

## Anexo 2 Relación de loci microsatélites amplificados en *Haliotis fulgens*

Tabla XII. Loci microsatélites amplificados en *H. fulgens*. Ta, Temperatura de acoplamiento.

Locus	Motivo de repetición	Secuencia de iniciadores	Ta	Observaciones
HYAAF	(gatt) <sub>23</sub>	F: CATTAGAAGCCGGGTCATGT R: TGACATATACACGGAGGGCA	55°C	Amplificación inconsistente, lecturas alélicas poco legibles y confiables
FPU37	(atac) <sub>28</sub>	F: TGTGTTTTTGGATGTGGATGT R: CCTTAATGTCAACCCATCGAG	53°C	Amplificación inconsistente, lecturas alélicas poco legibles
H2196	(tata) <sub>23</sub>	F: CGATCATGAAACTGGACCAA R: CCAGAATTTGGAATAGACGCC	53°C	Amplificación inconsistente, lecturas alélicas poco legibles y confiables
Fulgens10	(tata) <sub>16</sub>	F: CACGTCTGTACCGGTGGTAA R: CCCCACGTTGTACATATCAGG	57°C	Locus seleccionado y caracterizado
Fulgens11	(taaa) <sub>15</sub>	F: TACAGGCTGCCGTGACATAG R: TGGCTTAGCCGGTTGTTTTA	53°C	Amplificación inconsistente
Fulgens13	(tatt) <sub>14</sub>	F: GTCCACGGCCTGTTTACTGT R: TGTTGTCGCGACTAATCACC	55°C	Locus seleccionado y caracterizado
Fulgens17	(ttat) <sub>13</sub>	F: ATTTGACGATGCCTACGGTC R: TAAGGCTCTGGGAGCACACT	55°C	Locus con bajo polimorfismo y lecturas poco legibles
Fulgens19	(tgta) <sub>12</sub>	F: ATGGCAACTACTCCGTGTGG R: ATCGGAACAACGTCTCCATT	53°C	Locus seleccionado y caracterizado
Fulgens21	(gtga) <sub>12</sub>	F: AGCTCCTCAACAACCTCCAC R: ACTTCAGGCTTTCTCCACA	57°C	Locus con bajo polimorfismo
Fulgens24	(actc) <sub>12</sub>	F: GGCTCATCGACAGTGTCTCA R: CGAAAGATCGAGGAACTGG	55°C	Locus seleccionado y caracterizado
Fulgens26	(ctca) <sub>12</sub>	F: GCTGATACAAAGCTGCTGAAAA R: TTGTAGGTGCGAGTGCTTGA	55°C	Locus polimórfico y potencial a utilizar en análisis genéticos
Fulgens29	(ctca) <sub>11</sub>	F: CGGGAATTTCTCCATATT R: AAAAACAACAAAAACATAACTCAGATT	53°C	Locus seleccionado y caracterizado

Fulgens32	(aatg) <sub>11</sub>	F: CAATCAGATCATTCTTCAAATTTTC R: CTTTTGTCATCCAGCCATCA	53°C	Locus seleccionado y caracterizado
Fulgens33	(tgag) <sub>11</sub>	F: GGCTGTTACCCACAATGGTT R: TTCACGGGTGCTTAGGCTAT	55°C	Locus con bajo polimorfismo y lecturas poco legibles
Fulgens36	(atgg) <sub>11</sub>	F: TCTGCTCCAGAAATGCAATG R: TGGCCATGAGCATCAATAAG	53°C	Locus seleccionado y caracterizado
Fulgens38	(tcac) <sub>11</sub>	F: GTCAGTGGTTCAGTCCCCAG R: GGCATACAGCATGGACACAG	58°C	Locus seleccionado y caracterizado
Fulgens40	(gttt) <sub>10</sub>	F: CTCCACCTGCCATTCAAGAT R: GCCATCATACACCTGGAACA	57°C	Locus polimórfico y potencial a utilizar en análisis genéticos
Fulgens41	(ctca) <sub>10</sub>	F: GTCCTGATTTCCACCTTGA R: GATAGATGAGGACGCTTGGG	55°C	Locus con bajo polimorfismo
Fulgens42	(agtg) <sub>10</sub>	F: CTAGGCTATCCAGCTGCTCC R: CCCTCCCATGATATGGTTTG	57°C	Locus seleccionado y caracterizado
Fulgens43	(gtga) <sub>10</sub>	F: AAATTACGAGGCTCTTGAATGAA R: AAGGCAGAATAGCTAGGCC	57°C	Locus polimórfico y potencial a utilizar en análisis genéticos
Fulgens44	(agtg) <sub>10</sub>	F: GTCGCCAACCATGTATGATG R: GCCCACTATGATGTTTGCTG	55°C	Locus polimórfico y potencial a utilizar en análisis genéticos
Fulgens45	(actc) <sub>10</sub>	F: GGCTGTAAAATTGCCGATGT R: CCCCTGACCTTTAGGGTCTT	55°C	Locus polimórfico y potencial a utilizar en análisis genéticos
Fulgens46	(tttg) <sub>10</sub>	F: CCAGGGTCATCTTGGATACG R: AGTCAATGCCAATGTTACG	55°C	Locus polimórfico y potencial a utilizar en análisis genéticos
Fulgens47	(actc) <sub>10</sub>	F: CAGGGGAGTTCATGTTCCAA R: TGTTTTGATGAAGTTTGGCG	53°C	Lecturas alélicas difíciles por su tamaño mayor a 330pb
Fulgens48	(aaac) <sub>10</sub>	F: TTACAGGCCGCTGTGACATA R: CCGTGTTGCTCAATACTGGA	55°C	Locus seleccionado y caracterizado
Fulgens49	(gatt) <sub>10</sub>	F: GCTCGGAGCACATACTCA R: CGCCGTCATATAGCTGGAAT	55°C	Locus con bajo polimorfismo y lecturas poco legibles
Fulgens50	(tgag) <sub>10</sub>	F: CCCCATGCATAAAATACCCA R: TGAAACACTGTTCAAAGCGG	53°C	Locus con bajo polimorfismo



Fulgens51	(actc) <sub>10</sub>	F: ATTGCTAAAAGCGGCAAAAG R: ATTGTCATGAGACAGCAGCC	51°C	Locus con bajo polimorfismo
Fulgens54	(tgat) <sub>10</sub>	F: AATGGATCAGGTGGTCAAGC R: GTCCCACTTTTGACGCATTT	53°C	Locus con bajo polimorfismo
Fulgens55	(cact) <sub>10</sub>	F: TGTGATCTTGGGTTTCACCA R: GCGGCCATGTTGGATATTAG	53°C	Lecturas alélicas difíciles por su tamaño mayor a 330pb
Fulgens56	(tgag) <sub>10</sub>	F: AAGCAAAGTCTCAACTGACAA R: TCACGTGGATTGTTGCTCAT	57°C	Locus con bajo polimorfismo
Fulgens57	(cact) <sub>10</sub>	F: ATAATTTTCGACGTCCCCCTT R: GGTGAGTGAATCTTGAGTGGG	57°C	Locus polimórfico y potencial a utilizar en análisis genéticos
Fulgens58	(tgag) <sub>10</sub>	F: CACCGTTCCACAAAGTCAAA R: CCCACATCAAGCTGACATA	53°C	Locus polimórfico y potencial a utilizar en análisis genéticos
Fulgens59	(aaac) <sub>10</sub>	F: AATATAGCTGAGCGTGGCGT R: CGAATCGAATGGAGTTGGTT	53°C	Locus con bajo polimorfismo
Fulgens60	(tgag) <sub>9</sub>	F: GGCAATTGGGATACGATGAC R: CGCTTAAGACGCCAGGTTAG	57°C	Locus polimórfico y potencial a utilizar en análisis genéticos
Fulgens61	(gttt) <sub>9</sub>	F: TTCGAGTAGGGGACACAAGG R: CATTGCTGAGTACGGCGTTA	55°C	Lecturas alélicas ilegibles
Fulgens62	(ctca) <sub>9</sub>	F: GTAGCCTCGTGGTAAAGCG R: TGTGAGGGAGTGAGTGGTAGG	57°C	Amplificación inespecífica y lecturas alélicas ilegibles
Fulgens63	(agtg) <sub>9</sub>	F: GGATAAACTAACGGGATAATTGC R: ATAGCCCATTTCTGGTGTCC	57°C	Locus seleccionado y caracterizado
Fulgens64	(gtat) <sub>9</sub>	F: AAAGCCTGCGACGTTAAAGA R: CAAGTGTGCATGCAAAAAGAA	53°C	Locus seleccionado y caracterizado
Fulgens65	(ctca) <sub>9</sub>	F: TCGAGGTATAAGCATAACAATCTGG R: TCACTGGACCAGACAATCCA	57°C	Lecturas alélicas difíciles por su tamaño mayor a 330pb
Fulgens66	(actc) <sub>9</sub>	F: GTCCCTAAACCGGCTTGAAT R: CCTAAACACTTCTCATGTCCTTCA	57°C	Locus con bajo polimorfismo
Fulgens67	(cata) <sub>9</sub>	F: TGTCTTGAAGGAAAAGGTGTCA R: TCCTGATATTGCATATTGCCT	53°C	Lecturas alélicas poco legibles

Fulgens68	(agtg) <sub>9</sub>	F: ACCTTTTTCCATTTCTGCAA R: TTGCCTGGCCTAAACATTTC	51°C	Locus polimórfico y potencial a utilizar en análisis genéticos
Fulgens69	(gtga) <sub>9</sub>	F: TGGAGTGGCGTCAACTTACA R: CAACTCATTGCTGATTATGGC	55°C	Locus polimórfico y potencial a utilizar en análisis genéticos
Fulgens70	(tcac) <sub>9</sub>	F: ATGCGTAAAGCCATTTCTG R: GATCACTTTGAGGACCTGGG	57°C	Locus polimórfico y potencial a utilizar en análisis genéticos
Fulgens71	(tatt) <sub>9</sub>	F: TTGCCGAACTAAGCTGGAAT R: CAGTTTCCGTCTGCTGATGA	57°C	Amplificación difícil (no amplifica en todos los individuos) e inespecífica
Fulgens72	(actc) <sub>9</sub>	F: TTTACGCCGCTTTAAGCAAT R: TTTCCACCAAAGGTGAGTTT	51°C	Locus con bajo polimorfismo
Fulgens73	(ctca) <sub>9</sub>	F: TCCGTGGTATAACAGAAATGCT R: TATCCCTCACGGAAGTACGG	57°C	Locus con bajo polimorfismo y amplificación compleja
Fulgens74	(ctat) <sub>9</sub>	F: GTGACCCTGAATTTTCGCTTC R: GCGCAGACAGGTGTTTTACA	55°C	Lecturas alélicas poco legibles
Fulgens75	(gagt) <sub>9</sub>	F: ATCAACCAAGTCAACCTGCC R: CTTCCACACTTGCATCCCTT	57°C	Lecturas alélicas difíciles por su tamaño mayor a 330pb
Fulgens76	(tatt) <sub>9</sub>	F: TTTTCCATGTTGTGGAAGGG R: TACCCTGGTTGTAAGAGGCG	57°C	Amplificación inespecífica y lecturas alélicas poco legibles
Fulgens77	(tttg) <sub>9</sub>	F: TCACGAACCGATAAATGTGC R: TGGCCCAGACTCGATAACTT	55°C	Locus con bajo polimorfismo
Fulgens78	(ctca) <sub>9</sub>	F: TCGAGGTATAAGCATAACAATCTGG R: TCACTGGACCAGACAATCCA	57°C	Lecturas alélicas difíciles por su tamaño mayor a 330pb
Fulgens79	(gtgc) <sub>9</sub>	F: CGTCGACACAGTGAGATGGT R: GGCCAGAATGACCTTTGAGA	55°C	Locus con bajo polimorfismo
Fulgens80	(tcac) <sub>9</sub>	F: CTACCTTCAGCATAACCCCA R: GCACGTTTGTGTATTGCCAG	57°C	No amplifica en todos los individuos, lectura alélica poco legible.

### Anexo 3 Talla de organismos colectados

Tabla XIII. Talla de organismos colectados en Clam Bay, Bahía Tortugas. ID, nombre o número de identificación del organismo.

Juveniles			Adultos	
ID organismo	Longitud total (mm)	Grupo de Edad	ID organismo	Longitud total (mm)
<b>Estación 1</b>			<b>Estación 5</b>	
28	6	0+	1	165
29	8	0+	2	180
30	7	0+	3	150
31	11	0+	4	140
32	6	0+	5	165
33	22	1+	6	165
34	20	1+	7	168
35	20	1+	8	165
36	22	1+	9	175
37	23	1+	10	140
38	23	1+	11	165
39	19	1+	12	155
40	15	0+	13	170
41	10	0+	14	160
42	59	2+	15	150
43	43	2+	16	160
44	27	1+	17	155
45	40	2+	18	160
46	39	1+	19	145
47	22	1+	20	155
48	40	2+	21	170
49	35	1+	22	165
50	29	1+	23	160
51	25	1+	24	175
52	22	1+	<b>Estación 7</b>	
<b>Estación 2</b>			94	168
72	24	1+	95	180
73	24	1+	96	192
74	20	1+	97	170
75	24	1+	98	163
76	24	1+	99	170
77	22	1+	100	185

78	27	1+	101	180
79	18	1+	102	165
80	9	0+	103	155
81	7	0+	104	165
82	6	0+	105	145
83	6	0+	106	145
84	6	0+	107	160
85	7	0+	108	132
86	4	0+	109	130
87	6	0+	110	135
88	5	0+	111	140
89	8	0+	112	133
90	7	0+	113	123
91	8	0+	114	142
92	5	0+	115	110
93	5	0+	116	123
<b>Estación 3</b>			117	132
119	48	2+	118	125
120	58	2+	<b>Estación 9</b>	
121	50	2+	53	165
122	42	2+	54	140
123	55	2+	55	138
<b>Estación 9</b>			56	115
60	95	4+	57	142
61	75	3+	58	140
62	75	3+	59	160
63	68	3+		
64	56	2+		
65	50	2+		
66	58	2+		
67	58	2+		
68	46	2+		
69	35	1+		
70	28	1+		
71	20	1+		

Tabla XIV. Talla de organismos colectados en la zona sublitoral de La Bocana. ID, nombre o número de identificación del organismo.

Juveniles			Adultos	
ID organismo	Longitud total (mm)	Grupo de Edad	ID organismo	Longitud total (mm)
<b>Colecta del 14 y 15 de noviembre del 2012</b>			<b>Colecta del 18 de abril del 2012</b>	
D5	57.83	2+	A1	169
D7	77.14	3+	A2	149
D8	79.59	3+	A3	164
D9	51.10	2+	A4	170
D10	18.53	1+	A5	169
D11	27.96	1+	A6	166
E1	51.54	2+	A7	183
E3	32.43	1+	A8	174
E4	31.97	1+	A9	163
E5	37.20	1+	A10	174
E6	46.58	2+	A11	160
E7	57.26	2+	A12	180
E8	29	1+	B1	160
E9	28	1+	B2	180
E11	37	1+	B3	172
E12	33	1+	B4	175
			B5	154
			B6	173
			B7	146
			B8	173
			B9	164
			B10	165
			B11	155
			B12	159
			C1	183
			C2	182
			C3	139
			C4	199
			C5	195
			C6	170
			C7	170
			C8	179
			C9	146
			C10	146

	C11	180
	C12	167
	D1	155
	D2	167
	D3	174
	D4	181
	F3	163
	F4	170

Tabla XV. Talla de organismos colectados en la zona mesolitoral de La Bocana (La Puntita). ID, nombre o número de identificación del organismo.

Juveniles			Adultos	
ID organismo	Longitud total (mm)	Grupo de Edad	ID organismo	Longitud total (mm)
<b>Colecta directa del 13 y 14 de noviembre del 2012</b>			<b>Colecta del 13 y 14 de noviembre del 2012</b>	
1A-1	32	1+	1-9	155
1A-2	33	1+	1-10	172
2A-1	29	1+	1A-1	155
2A-2	24	1+	1B-1	165
3B-1	31	1+	1B-2	166
6B-1	35	1+	1B-3	171
6B-2	18	1+	1B-4	158
7B-1	30	1+	1B-5	160
8A-1	32	1+	1B-6	157
9B-1	35	1+	1B-7	170
10A-1	26	1+	1C-1	170
J1-R	25	1+	1C-2	165
J2-R	37	1+	1C-3	155
J3-R	26	1+	1D-1	160
J4-R	33	1+	1D-2	160
<b>Colecta mediante método anestésico</b>			1D-3	156
J0-R	1.52	0+	1D-4	170
J5-R	2.18	0+	1D-5	165
J6-R	2.18	0+	2D-1	154
J7-R	1.56	0+	2D-2	160
J8-R	1.75	0+	2D-3	158

J9-R	0.97	0+	2D-4	154
J10-R	1.68	0+	2D-5	132
J11-R	1.29	0+	2D-6	146
J12-R	1.68	0+	2D-7	148
J13-R	1.95	0+	2D-8	140
J14-R	1.87	0+	2D-9	160
J15-R	1.79	0+	2D-10	160
J16-R	1.68	0+	2D-11	153
J17-R	1.75	0+	2D-12	153
J18-R	1.91	0+	3A-1	160
			3B-1	160
			3C-1	165
			3C-2	150
			3D-1	157
			3D-2	152
			4A-1	156
			4B-1	160
			4C-1	148
			4C-2	127
			4D-1	149
			4D-2	168
			4D-3	155
			4D-4	135
			4D-5	155
			4D-6	153
			5A-1	149
			5A-2	155
			5B-1	140
			5B-2	141
			5B-3	158
			5B-4	157
			5B-5	156
			5B-6	155
			5C-1	165
			5C-2	166
			5C-3	165
			5C-4	163
			5D-1	155

#### Anexo 4 Genotipos de juveniles y adultos asignados mediante análisis de paternidad con 100 padres candidatos

Tabla XVI. Genotipos de juveniles y de su padre asignado cuando se utilizaron 100 padres candidatos en Clam Bay. Se resaltan alelos compartidos.

	Fulgens10		Fulgens13		Fulgens19		Fulgens24		Fulgens29		Fulgens32		Fulgens36		Fulgens38		Fulgens43		Fulgens63		Fulgens64	
Juvenil 83	150	122	226	226	241	241	196	196	151	151	111	111	169	165	247	231	159	147	191	187	135	119
Adulto 19	130	122	238	210	253	241	196	196	151	151	111	111	177	169	243	231	163	159	191	187	119	119
Juvenil 33	158	126	214	214	0	0	200	196	147	147	111	111	177	169	247	227	159	147	195	191	127	115
Adulto 118	138	126	250	214	237	221	200	196	147	139	111	95	177	169	231	227	159	155	191	179	127	123
Juvenil 35	154	122	222	210	257	245	200	184	143	139	111	107	169	169	251	251	159	159	195	195	139	135
Adulto 111	142	134	226	210	249	245	212	200	139	139	115	107	169	165	251	227	159	151	195	191	139	127
Juvenil 85	138	126	238	222	249	237	216	200	147	139	111	95	173	169	243	227	171	155	187	179	123	119
Adulto 17	142	126	230	222	237	233	216	196	147	143	115	111	173	173	243	243	155	155	191	187	131	131
Juvenil 78	158	134	238	222	257	237	200	176	147	139	111	111	173	173	247	239	159	155	195	183	127	107
Adulto 94	134	130	226	222	249	237	200	176	147	139	111	107	173	173	251	247	155	151	191	179	127	123
Juvenil 37	142	126	238	218	253	241	200	176	143	143	111	95	169	165	291	231	163	155	195	179	123	115
Adulto 21	130	126	218	210	265	253	200	176	159	143	111	95	173	165	263	227	163	159	195	191	135	123
Juvenil 31	138	130	226	218	241	241	200	176	147	139	115	111	173	169	247	239	163	147	195	179	131	127
Adulto 114	138	130	218	214	229	229	200	200	171	147	111	111	169	169	279	239	166	163	191	179	131	127

Los organismos con "0" en el locus Fulgens19 presentaron tres alelos, por lo que no se utilizó este locus en los análisis de paternidad.

Tabla XVII. Genotipos de juveniles y de su padre asignado cuando se utilizaron 100 padres candidatos en la zona sublitoral de La Bocana. Se resaltan alelos compartidos.

	Fulgens10		Fulgens13		Fulgens19		Fulgens24		Fulgens29		Fulgens32		Fulgens36		Fulgens38		Fulgens43		Fulgens63		Fulgens64	
Juvenil D7	158	154	226	218	241	233	208	188	151	139	119	111	173	169	263	231	159	147	191	191	127	119
Adulto D3	154	118	226	222	249	241	208	196	151	143	127	111	169	169	251	231	159	159	195	191	139	119
Juvenil D8	146	118	214	214	0	0	216	196	139	139	111	111	169	165	267	239	159	155	191	191	127	107



Adulto B3 | 146 | 130 | 230 | 214 | 229 | 213 | 196 | 196 | 151 | 139 | 115 | 111 | 173 | 169 | 255 | 239 | 159 | 155 | 195 | 191 | 127 | 127

Los organismos con “0” en el locus Fulgens19 presentaron tres alelos, por lo que no se utilizó este locus en los análisis de paternidad.

Tabla XVIII. Genotipos de juveniles y de su padre asignado cuando se utilizaron 100 padres candidatos en la zona mesolitoral de La Bocana (La Puntita). Se resaltan alelos compartidos.

	Fulgens10	Fulgens13	Fulgens19	Fulgens24	Fulgens29	Fulgens32	Fulgens36	Fulgens38	Fulgens43	Fulgens63	Fulgens64
Juvenil 1A-1	134   122	250   218	261   261	208   196	143   139	115   111	169   169	247   231	163   159	195   183	131   127
Adulto 3C-1	142   122	218   218	0   0	208   204	147   139	115   107	169   157	251   231	159   159	195   179	131   131
Juvenil J13-R	158   154	214   214	245   241	200   196	147   139	111   111	173   169	255   227	171   163	195   191	127   107
Adulto 5A-2	154   154	218   214	257   245	204   196	143   139	115   111	169   169	255   243	167   159	195   191	115   107
Juvenil 2A-1	126   126	234   222	269   265	208   208	155   151	119   111	169   169	259   247	187   159	191   179	131   123
Adulto 5C-2	126   114	226   210	0   0	208   200	151   139	111   111	169   161	247   231	159   159	187   179	123   119

Los organismos con “0” en el locus Fulgens19 presentaron tres alelos, por lo que no se utilizó este locus en los análisis de paternidad.