



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

Programa de Estudios de Posgrado

**DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA  
GENÉTICA DEL CORAL HERMATÍPICO *Pocillopora  
verrucosa* EN EL GOLFO DE CALIFORNIA  
MEDIANTE EL USO DE MICROSATÉLITES**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**M a e s t r o e n C i e n c i a s**

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

p r e s e n t a

**F e r n a n d o A r a n c e t a G a r z a**

La Paz, Baja California Sur Febrero 2010

**Conformación del comité:**

Comité tutorial y comité revisor de tesis

**Dr. Pedro Cruz Hernández- Director de tesis**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dr. Eduardo Balart Páez**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dr. Hector Reyes Bonilla**

Universidad Autónoma de Baja California Sur

Jurado de examen:

**Dr. Pedro Cruz Hernández**

**Dr. Eduardo Balart Páez**

**Dr. Hector Reyes Bonilla**

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 15 del Mes de Febrero del 2010, 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:

**"DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DEL CORAL HERMATÍPICO *Pocillopora verrucosa* (Ellis y Solander, 1786) EN EL GOLFO DE CALIFORNIA MEDIANTE EL USO DE MICROSATÉLITES"**

Presentada por el alumno:

**FERNANDO ARANCETA GARZA**

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.

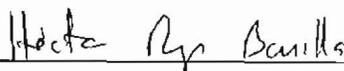
LA COMISION REVISORA



Dr. Pedro Cruz Hernández



Dr. Eduardo Balart Páez



Dr. Hector Reyes Bonilla



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## Resumen

*Pocillopora verrucosa* es un coral hermatípico y hermafrodita simultáneo que habita las costas peninsulares del Golfo de California. Esta especie es formadora de parches arrecifales o verdaderos arrecifes, como en Cabo Pulmo en la región del Pacífico Oriental, lo cual lo hace importante ecológica- y comercialmente para la región. No existen estudios que detallen la dinámica poblacional de la especie en la región, la cual es importante para poder conocer cuantas poblaciones existen, cuales son las zonas de mayor diversidad genética/genotípica, de donde vienen los migrantes, y así poder en un futuro contribuir al manejo integral de estos recursos. Para lo anterior se determinó la estructura genética poblacional empleando 6 loci microsatélite analizando cinco localidades a lo largo del rango de distribución de la especie (Loreto, el Portugués, Isla Espíritu Santo, Canal de San Lorenzo y Cabo Pulmo). Se demostró, empleando los genotipos únicos (individuos de origen sexual), que regionalmente existe una sola población genética (metapoblación) con elevado flujo genético ( $F_{ST}= 0.0007$ ;  $p=0.42$ ), y que exceptuando Loreto en un locus (Pd3200), se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). Así mismo, se observó estructura genética poblacional empleando los genotipo totales (todos los individuos) con un  $F_{ST}= 0.108$  ( $p< 0.001$ ), debido a la presencia de clonas (reproducción asexual) de manera diferencial en todas las localidades, con desviaciones del EHW debido a déficits y excesos de heterocigotos. Las subpoblaciones mantenidas por reproducción sexual o mayormente sexuales fueron Cabo Pulmo, el Portugués y Loreto promediando una diversidad genotípica ( $G_o/G_e$ ) del 55% y una equidad genotípica ( $G_o/N_g$ ) del 72%. En cambio las subpoblaciones del Canal de San Lorenzo y la Isla Espíritu Santo resultaron ser muy asexuales reproduciéndose por medio de la fragmentación, como parte de un programa de repoblamiento y también ocasionada por efecto de huracanes, respectivamente. La diversidad genotípica promedio de estas localidades fue muy baja (4.5%), con una equidad genotípica del 40%. La frecuencia de los huracanes por sitio mostró una correlación negativa significativa con la diversidad genotípica ( $G_o/G_e$ ;  $r^2=0.95$   $p<0.01$ ), la riqueza genotípica ( $N_g/N$ ;  $r^2=0.94$   $p<0.05$ ) y la equidad genotípica ( $G_o/N_g$ ;  $r^2=0.91$   $p<0.01$ ) en las poblaciones del Golfo de California, explicando casi el 90% de la variación entre sitios muy clonales y sexuales. Se obtuvo un aislamiento por distancia significativo entre todas las poblaciones, mostrando como las subpoblaciones vecinas son genéticamente más similares a diferencia de las más lejanas. El número total de migrantes por generación estimada para la región fue de 118.04  $Nm$ . En donde no hubo diferencias significativas entre las magnitudes totales de flujo en dirección norte en verano ( $Nm =70.12$ ) y en dirección sur en invierno ( $Nm =40.17$ ); indicando que existen otros desoves de gametos fuera del pico reproductivo en verano. Las localidades geográficamente más alejadas presentaron diferencias significativas en la contribución de  $Nm$  a la región ( $P<0.05$ ), siendo Loreto la de menor ( $Nm =2.5$ ) y el Canal la de mayor aporte ( $Nm =52$ ). Las subpoblaciones se comportaron en un arreglo metapoblacional, donde dependiendo de su localización y la

dirección de la corriente se comportaron como fuentes, sumidero o pseudo-sumidero. La única población verdaderamente sumidero fue Loreto, evidenciado por su posición en el límite geográfico de su distribución y su mínima contribución de migrantes, siendo la más vulnerable a factores estocásticos demográficos y ambientales. En conclusión, el coral *Pocillopora verrucosa* en el Golfo de California se comporta como una metapoblación, con elevado flujo genético por larvas sexuales y sin aparentes barreras oceanográficas. Sin embargo, eventos estocásticos como huracanes, promueven la reproducción asexual por fragmentación, resultando en una elevada proporción de clonas en las localidades impactadas. La composición genética detectada en estos sitios debería de ser evaluada después de disturbios ambientales que producen grandes mortalidades (blanqueamiento) seguidos por eventos de re-colonización, para determinar la persistencia o cambios en el sistema de reproducción y estructura genética.

Palabras Clave – *Pocillopora verrucosa*, Estructura genética, Microsatélite

## Abstract

*Pocillopora verrucosa* is an hermatipic coral and simultaneous hermaphrodite which inhabits the Peninsular coast of the Gulf of California (GC). This specie is one of the dominant coral species of the Eastern Pacific region, forming reef patches or true coral reefs, like the Cabo Pulmo Reef, making them ecologically and economically important to the region. There are not previous studies that aboard in detailed the population dynamic of the specie in the GC, which is important in order to know how many populations exists , which are the populations with the highest genetic/genotypic diversity, the localities which function as source/sink populations, the origin of the migrants, etc., and finally contribute to the integral management of the specie,. To achieve these objectives, we determined the population structure using six microsatellite loci in five populations that covers the full specie range in the peninsula (Loreto, El Portugués, Isla Espíritu Santo, Canal de San Lorenzo y Cabo Pulmo). We found by using only sexual origin individuals (unique genotypes) the existence of one genetic population (Metapopulation) in the region with high genetic flow ( $F_{ST}= 0.0007$ ;  $p=0.42$ ) and Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), and only Loreto with heterozygote deficit in one locus (Pd3200). In the other scenario, using all the individuals (including the clones) we found significant population structure ( $F_{ST}= 0.108$ ;  $P< 0.001$ ) and deviations to HWE, proving the important clone effect in the region. The sexual populations were Cabo Pulmo (CP), el Portugués (P) and Loreto (L), with a mean genotypic diversity ( $G_o/G_e$ ) of 55% and a genotypic evenness ( $G_o/N_g$ ) of 72%. On the other hand, the Canal de San Lorenzo (C) and the Isla Espíritu Santo (IS) were mostly asexual with reproduction by fragmentation-clonation, this was explained because they were part of a repopulation program and by cyclone effect respectively. The mean genotypic diversity for these localities was very low (4.5%), and also with a low genotypic evenness (40% ). The frequency of cyclones per site showed a negative significant correlation with the genotypic diversity ( $G_o/G_e$ ;  $r^2=0.95$   $p<0.01$ ), the genotypic richness ( $N_g/N$ ;  $r^2=0.94$   $p<0.05$ ) and genotypic evenness ( $G_o/N_g$ ;  $r^2=0.91$   $p<0.01$ ) explaining  $\approx 90\%$  of the variation among clonal and sexual sites. The test of isolation by distance showed a significant correlation among sites, between genetic and geographical distances in the GC. The total number of migrants per generations ( $Nm$ ) for the region was 118, with a total magnitude of 70  $Nm$  for summer (current flow to north) and 40 in winter period (current flow to south). The most geographical far away populations (L,CP and L,C) show significant values in the contribution of  $Nm$  to the region (2.5 vs 27, and 2.5 vs 52  $Nm$  respectively). The populations display a metapopulation arrangement and depending the location and current flow they will act as source or pseudo-sink. The only true sink subpopulation was Loreto, proved by its marginal geographical position, very low population density and minimum migrant contribution; being the most vulnerable to demographic and environmental stochastic factors. In conclusion, the *Pocillopora*

*verrucosa* coral in the Gulf of California conforms a metapopulation, with high genetic flow by sexual larvae and non-detected environmental barriers. However, stochastic events as hurricanes, promote the asexual reproduction by fragmentation, resulting in a high proportion of clones in the impacted localities. The genetic composition detected in these sites should be evaluated after disturbance events (bleaching events) causing high mortalities to the local population followed by re-colonization events, to determine the persistence or changes in the reproduction system and genetic structure.

Key Words – *Pocillopora verrucosa*, Genetic structure

## **DEDICATORIA**

Esta tesis va dedicada con todo mi cariño, esfuerzo y empeño a mi familia que fue la que me mantuvo cuerdo y apoyando siempre durante todo su transcurso. Que vuelvo a decirlo: “No se donde estaría ahora si no fuera por ellos”....los amo mucho:

A MI MADRE: Por sus invaluables consejos que solo las madres saben decir para dar confort y apoyo a sus hijos, lo cual no te lo dirá nadie.

A MI PADRE: Por ayudarme a motivarme y darme claridad en mis pensamientos sobre lo que es importante y valioso.

A MI HERMANA: Por ser tan linda y comprensiva conmigo y darme su apoyo en todo lo que he necesitado.

A MI HERMANO: Gracias por tu sonrisa y mostrarme que la vida se trata puramente de ser feliz, además de tener tus obras de arte en mi humilde hogar donde las presumo a cuanta persona entra.

Por todo esto y MUCHO más gracias...

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por las instalaciones y la formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Al Consejo Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) por el financiamiento del proyecto GD001 “Variabilidad genética y probable origen de las poblaciones colonizadoras en el área afectada por el buque tanque Lázaro Cárdenas II, Baja California Sur”. Asimismo se agradece a los proyectos 910-0, 989-0 y EP3.0 del Programa de Ecología Pesquera por el apoyo logístico y financiero en las salidas. Al personal del Laboratorio de Embarcaciones y Buceo, especialmente a los Técnicos Mario Cota, Horacio Bervera y Juan José Ramírez, por su apoyo en la obtención de las muestras.

A mi director de tesis el Dr. Pedrin Cruz por el apoyo, consejos, paciencia, por su guía, por no perder la calma y por su amistad.

Al Dr. Balart por su amistad y apoyo para el desarrollo de la tesis, y a enseñarme a no gastar más de la cuenta en las salidas.

Al Doc Hector Reyes, por su orientación, n-mil publicaciones de corales y sobre todo por apoyarme en algunas salidas de colecta claves en mi estudio.

A la Rorra (Mon Aceves) por su amor incondicional, cariño, apoyo, hacerme reír, aguantarme y enseñarme la vida blanco/negro y por sus ñññiiiiiii!!!!!!...te amo

A la familia Aceves por acogerme en su seno y darme calor familiar, se le quiere mucho a todos.

Ahora a toda la bola de locos, ebrios, m.....y sobre todo amigos que nadie más puede pedir más en la vida....bueno.....más pelo??? Je je gracias por ser: Greñas (Sofi?), Jeb (Lola) , Mini (ale), Drew (Ere je je), Burro (Manuela) , Mike (Afe), Chava (Aneth), Dani (Flor), Sudarsky the Yu (Diegote), Alan (¿?), al Patón...Pasa....Axelito mini mamer Paco, Shaggy (Don Lobstá), Pablote (Pu.. de Nueva Yor), mis carnales del Salsi (sin su elixir....estaría mas flaco je je je).....pero sobre todo a Katy (je je).....a todos los del laboratorio de Hector Reyes: Chepe, Champ, Chunga (Pronatura Boss), Nu, Gina, Nan, Sara, Cocho (Manu), Pitaar (Eli por sus golpes), Saul....Compatriotas de la Uni: Marco Medina, Nalgaro (por hacerme buen CV) je je, al Neza, Chango y Ruben.

Otro agradecimiento muy especial a mis carnales y amigos del laboratorio: Susy Avila, Doc Ric Perez, Doc Ana Maria, Clarisa, Tripi, Rosa-Broza, La chaparrita que se casa, al NoE-perdonado je je, a mis amigas y aluminitas Caro y Oney,

A mi raza de la maestría por ser uds: Misha (cuenta, cuenta), Adan, Tania, Paty, Zec y Marsh, Fausto, Masso, Chino, todos los tocheros, al Horacio.

A la raza Cobi por las chambitas y distracciones, y no me han cobrado el ventilador..je je....Chucho (Toluco), Paco (el Rosen) y mi kareoke de bolsillo, trovador del futbol llanero el Leo.

De Nuevo Gracias a todos

## **GLOSARIO.**

**Alelo:** Forma alternativa de un locus. En microsatélites, es una variante con diferente número de repeticiones de la secuencia motivo.

**Alelo nulos:** Alelos que no son amplificados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) debido a que presentan mutaciones en la región flanqueante de la secuencia por lo que no son visibles en el gel de electroforesis. La presencia de alelos nulos en una población puede originar desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg hacia un déficit de heterocigotos.

**Cadenas de Markov:** Modelo que es ajustable para modelar una secuencia de variables aleatorias, tales como secuencias de pares de bases de nucleótidos en una cadena de ADN, en la cual la probabilidad que asume el valor de una variable depende del valor de las variables más recientes que la preceden.

**Clon/Clona:** es un grupo de individuos genéticamente idénticos por descendencia.

**Coalescencia:** Teoría que describe la genealogía de cromosomas o genes. Bajo diversos escenarios de historias de vida (generaciones discretas, generaciones traslapables, reproducción no azarosa, etc.) tomando en cuenta ciertos límites, la distribución estadística de la longitud de la rama en una genealogía sigue una forma simple y la teoría de coalescencia describe dicha distribución.

**Corrección de Bonferroni:** Procedimiento no paramétrico el cual es empleado para reducir el error tipo I (rechazar una hipótesis nula verdadera) cuando se realizan múltiples pruebas o comparaciones.

**Dememorisaciones (en inglés dememorisations):** es el número de pasos que se deben de realizar antes de comenzar a comparar las probabilidades de la tabla alternativa a aquellas probabilidades observadas.

**Desequilibrio de ligamiento:** Cuando los alelos de diferentes loci se encuentran ligados no existe una segregación independiente de los mismos, lo cual trae consigo que a nivel poblacional se observen genotipos comunes entre individuos. El caso

extremo de desequilibrio de ligamiento ocurre cuando los loci se encuentran en el mismo cromosoma y muy cercanos por lo que la frecuencia de recombinación es muy baja. Sin embargo en poblaciones naturales adaptadas a un medio ambiente se pueden dar asociaciones entre alelos de diferentes loci en diferentes cromosomas debido a procesos de selección natural.

Diferenciación genética: Grado de divergencia entre los indicadores de diversidad genética (diversidad alélica, heterocigosidad, etc.) entre dos poblaciones o especies.

Diversidad genética: Es el grado de variación genética en una población o especie, medido en heterocigosidad, diversidad alélica o heredabilidad.

Efecto Wahlund: Reducción en la heterocigosidad en relación a lo esperado según el equilibrio de Hardy-Weinberg, en una población separada en varias sub poblaciones parcialmente aisladas.

Equilibrio de Hardy-Weinberg: Es el equilibrio alcanzando en las frecuencias alélicas en una población panmíctica donde no hay perturbaciones por efecto de la mutación, migración, selección o deriva. Si dos alelos A1 y A2 tienen frecuencias p y q, las frecuencias en equilibrio de Hardy-Weinberg para los genotipos A1A1, A1A2 y A2A2 serán  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$ , respectivamente.

Estructura genética poblacional: Ocurre cuando dos o más sitios colectados presentan un grado de diferenciación genética tal que se consideran como sub poblaciones diferentes.

Hermafrodita simultáneo - o sincrónico: Es un organismo adulto que presenta gónadas maduras tanto masculina como femenina.

Hermatípico – ó corales duros: Son corales formadores de arrecife, debido a la capacidad de depositar aragonita en su estructura.

Heterocigoto: Individuo con dos alelos diferentes en un locus.

Heterocigotos, déficit o exceso de: Cuando la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y la esperada ( $H_e$ ) bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg no coinciden, presentándose un déficit cuando la  $H_o$  es menor a la  $H_e$ , y un exceso en el caso contrario.

Heterocigosidad: Número de individuos heterocigotos para un locus dividido entre el número total de individuos de la muestra.

Heterocigosidad esperada. Proporción de organismos heterocigotos calculada a partir del equilibrio de Hardy-Weinberg. Su cálculo implica la obtención de las frecuencias genotípicas a partir de las frecuencias alélicas ( $A=p$ ,  $B=q$ ) siguiendo un binomio al cuadrado  $(p + q)^2$ , en donde  $p$  y  $q$  son las frecuencias alélicas; y  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$  corresponderán a las frecuencias de homocigotos  $AA$ , heterocigotos  $AB$  y homocigotos  $aa$ .

Heterocigosidad observada. Proporción de organismos heterocigotos calculada a partir de los genotipos observados en una muestra poblacional.

Homocigoto: Individuo con dos copias del mismo alelo en un locus.

Índice de fijación  $F_{ST}$ : Proporción de la endogamia total en una población como consecuencia de la diferenciación entre sub poblaciones.

Inferencia Bayesiana: Método estadístico en el cual no hay una distinción lógica entre los parámetros del modelo y los datos, sino que ambos son variables aleatorias con una distribución de probabilidad conjunta, la cual es especificada por un modelo probabilístico. La estadística bayesiana involucra manipular estas distribuciones para hacer inferencias sobre los parámetros o el modelo de probabilidad dado por los datos. El principal objetivo de la inferencia bayesiana es calcular la distribución *posteriori* de los parámetros, la cual es la distribución condicional de los parámetros dados por los datos.

Locus (plural: Loci): Segmento de ADN en un cromosoma. Este segmento puede codificar para una proteína, tener una función regulatoria o ser una región de ADN definida por un método molecular, P. ej: microsatélite.

Máxima verosimilitud: Método estadístico empleado para ajustar un modelo estadístico a los datos en donde se busca maximizar su probabilidad en base a ciertos parámetros, es decir, maximizar la verosimilitud en función de los parámetros para un set de datos fijos.

Microsatélite: Secuencias cortas (de 1 a 6 pares de bases) repetidas en tándem en un número de veces variables y que se encuentran en forma abundante y dispersa dentro del genoma. Estos marcadores por lo general presentan polimorfismos y

heterocigosidades elevadas en una población, por lo que son muy informativos para determinar la variabilidad y estructura genética poblacional.

Número de alelos efectivos ( $n_e$ ): Número de alelos que en igual frecuencia resultarían en la misma homocigosidad que el número de alelos observados. Se obtiene del cálculo:  $n_e = 1 / \sum p_i^2$ , donde  $p_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo.

Periodo de Calentamiento – se emplea en los programas de análisis genéticos para descartar los primeros valores y arboles obtenidos por ser erróneos dando oportunidad a que los valores resultantes sean los más reales.

Población: Grupo de organismos de la misma especie que habitan en un área geográfica restringida y que tienen la capacidad de reproducirse con cualquier otro miembro de dicho grupo.

Población panmíctica: Es aquella en donde todos los individuos de la población tienen la misma probabilidad de reproducirse.

Polimorfismo: Presencia de diferentes variantes alélicas para un mismo locus en una muestra poblacional. Se dice que un locus es polimórfico cuando presenta al menos dos alelos, y específicamente para microsatélites un locus de moderado a elevado polimorfismo puede presentar de 10 a 20 alelos.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Método utilizado para obtener copias de segmentos específicos de ADN (amplificar). El ADN es desnaturalizado por temperaturas elevadas, se añaden las regiones flanqueantes (*primers* u oligos) y la secuencia es copiada por medio de una enzima polimerasa termoestable (Taq). Este proceso se lleva a cabo en una serie de 30 a 40 ciclos en un termociclador. 30 ciclos producirán un factor de amplificación de 100 millones de copias.

## Índice General

1. Introducción .....	1
1.1 Biología de <i>Pocillopora verrucosa</i> .....	1
1.2 Los arrecifes del Golfo de California .....	2
1.3 Dispersión larvaria y conectividad .....	3
1.4 Estructura y flujo genético entre las poblaciones .....	6
1.5 Marcadores Moleculares para el estudio de Corales .....	8
2. Antecedentes .....	9
2.1 Reproducción asexual .....	10
2.2 Reproducción sexual .....	14
2.3 Trabajos de estructura poblacional en el Golfo de California .....	17
3. Justificación .....	18
4. Hipótesis .....	20
5. Objetivos .....	21
5.1 Objetivo general .....	21
5.2 Objetivos particulares .....	21
6. Material y Métodos .....	22
6.1 Área de estudio .....	22
6.2. Colecta de las muestras .....	25
6.3. Extracción de ADN .....	25
6.4. Amplificación por <i>PCR</i> .....	26
6.5. Electroforesis y visualización de los productos de <i>PCR</i> .....	27
6.6. Análisis de datos .....	28
6.6.1 Diversidad Genotípica .....	28
6.6.1.1 Factores potenciales que influyen la estructura clonal .....	30
6.6.2. Variabilidad genética .....	31
6.6.3. Determinación de la estructura poblacional .....	32
6.6.4. Patrones de migración y tamaños poblacionales relativos .....	34
7. Resultados .....	38
7.1. Diversidad Genotípica .....	38
7.1.1 Factores que influyen la estructura clonal .....	42
7.2 Diversidad Genética .....	44

7.3. Estructura Genética .....	49
7.4 Patrones de migración y tamaños efectivos poblacionales relativos.....	54
8. Discusión.....	56
8.1. Tipo de reproducción asexual vs sexual (diversidad genotípica).....	56
8.2 Diversidad genética.....	63
8.3. Estructura genética .....	66
8.4 Patrones de migración y tamaños poblacionales.....	71
9. Conclusiones .....	75
10. Recomendaciones.....	77
11. Bibliografía .....	79
12. Anexos .....	93

Lista de Tablas

Tabla I - Oligos de los microsatélite empleado en el estudio y sus características principales.....	26
Tabla II – Diversidad genotípica en <i>P. verrucosa</i> para los cinco sitios de muestreo.....	42
Tabla III – Incidencia de huracanes en cada localidad desde entre 1940 y 2006.....	43
Tabla IV - Diversidad genética en los seis loci para las cinco localidades de <i>P. verrucosa</i> .....	45
Tabla V – Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), observada ( $H_o$ ), y coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) para los genotipos totales (GT) y únicos (GU) en las localidades de muestreo en <i>P. verrucosa</i> .....	48
Tabla VI - Comparaciones pareadas de los valores de $F_{ST}$ en las cinco localidades tomando en cuenta al total de individuos.....	50
Tabla VII - Comparaciones pareadas de los valores de $F_{ST}$ en las cinco localidades tomando en cuenta únicamente individuos de posible origen sexual (genotipos multilocus únicos).....	51

## Lista de Figuras

Figura 1– Sitios de muestreo de <i>P. verrucosa</i> en la península de Baja California, cada uno con su tamaño de muestra respectivo (N).....	24
Figura 2 – Frecuencia de individuos con genotipos multilocus únicos (GU) y la frecuencia de las clonas en cada localidad.....	39
Figura 3 – Frecuencia de los individuos con los dos principales genotipos dominantes (GD1/GD2) en cada localidad.....	40
Figura 4 – Relación entre la incidencia de huracanes por sitio y (A) la diversidad genotípica ( $G_o/G_e$ ), (B) riqueza genotípica ( $N_g/N$ ) y (C) equidad genotípica ( $G_o/N_g$ ) en <i>P.verrucosa</i> en la península de Baja California. La mayor incidencia de huracanes de asocia a una mayor reproducción asexual y menor equidad genotípica.....	43
Figura 5 – Promedio de alelos totales (prom A), y número de alelos efectivos (ne) para cada localidad de <i>P. verrucosa</i> .....	44
Figura 6 – Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) por localidad, tomando en cuenta todas las muestras o genotipos totales (GT) y con solo individuos de origen sexual o genotipos multilocus únicos (GU). Nótese el exceso de $H_o$ en las localidades de la IS y C analizando todas las muestras (GT) y como retorna al equilibrio EHW analizándolo con GU.....	47
Figura 7 – Aislamiento por distancia para <i>P. verrucosa</i> entre las localidades (Prueba de Mantel) en la península de Baja California, donde 0 km representa Cabo Pulmo y $\approx 344$ km representa Loreto, siendo significativa la correlación de distancias genéticas y geográficas entre localidades ( $p=0.031$ ).....	52

Figura 8 – Número de posibles poblaciones (K) de <i>P. verrucosa</i> inferidas por el cálculo de $\ln P(D)$ por el programa STRUCTURE en las localidades muestreadas.....	53
Figura 9 - Estimado del flujo de inmigrantes por MIGRATE 3.0.3. de acuerdo con el patrón de corrientes dominante en la temporada de verano, con $Nm= 78$ (A) y de invierno con $Nm= 40.17$ (B). Las flechas gruesas representan un $Nm>10$ migrantes por generación.....	47

## 1. Introducción

### 1.1 Biología de *Pocillopora verrucosa*

El coral hermatípico *Pocillopora verrucosa* Ellis y Solander, 1786 pertenece a la familia Pocilloporidae Gray, 1842. Su morfología se caracteriza por colonias ramificadas y con protuberancias a manera de verrugas, formadas por ramas verticales claramente distintas de las verrugas, las cuales son de tamaño irregular (Veron y Pichon, 1976).

Su distribución mundial abarca desde el Mar Rojo y África Oriental hasta el este de Hawaii; alrededor de Australia, incluyendo la Gran Barrera de Coral y el Mar de Coral al este y al sur de Bahía Tiburón en la costa oeste (Veron, 1986). En el Pacífico Oriental, se distribuyen desde México, incluyendo el Golfo de California del lado peninsular y las costas continentales de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca, abarcando al sur las costas de Sudamérica en Costa Rica, Panamá, Colombia, Ecuador y las islas de Clipperton y Revillagigedo (Reyes *et al.*, 2005). Su distribución vertical para el Pacífico Oriental abarca las zonas someras (0-6m) [Reyes-Bonilla, 2000]. En general estos son frágiles y tienden a desarrollarse en bahías o a lo largo de las costas protegidos de las mareas (Glynn *et al.*, 1997).

El coral *P. verrucosa* es un hermafrodita simultáneo y presenta modos mixtos de reproducción (Highsmith, 1982; Glynn *et al.*, 1997; Richmond, 1997). Para el modo sexual presenta distintas estrategias dependiendo de su distribución geográfica, siendo un anidador, o con fecundación interna, y liberando las larvas plánulas al medio marino en el Atolón de Enewetak, en las Islas Marshall (Stimson, 1978); y emisor de gametos al medio en el Mar Rojo (Fadlallah, 1985), Sudáfrica (Ridway *et al.*, 2001; Ridgway *et al.*, 2008) y

en el Pacífico Oriental (Glynn *et al.*, 1991; Chávez-Romo y Reyes-Bonilla 2007). En el Golfo de California (GC) estos eventos de desoves ocurren entre verano y otoño, donde ocurre su pico de actividad reproductiva (Chávez-Romo y Reyes-Bonilla 2007), pudiendo reproducirse más de una vez al año, como ocurre en otros sitios del Pacífico Oriental como Costa Rica, Panamá e Islas Galápagos (Glynn *et al.*, 1991).

La reproducción asexual es por fragmentación (Highsmith 1982; Reyes-Bonilla, 2003), y se ha observado que los fragmentos de pocilopóridos colonizan con facilidad sustratos blandos (arenas y gravas) a partir del desprendimiento de sus ramas por factores físicos como huracanes (Reyes-Bonilla, 2003).

## 1.2 Los arrecifes del Golfo de California

Se pueden reconocer dentro del Golfo de California dos géneros principales formadores de arrecifes los Pocillopora (5 especies) y los Porites (1 especie) [Cortes, 1997; Glynn, 1997]. Estos arrecifes se caracterizan por: 1) su pequeño tamaño; 2) distribución discontinua, y 3) baja diversidad de especies (Glynn y Wellington 1983) en comparación con los arrecifes del Caribe y el Indo-Pacífico; y debido a su limitado desarrollo estructural como arrecife, no son considerados como arrecifes coralinos verdaderos (Squires, 1959; Brusca y Thomson, 1975).

Los arrecifes coralinos de la Península de Baja California son denominados de franja (Glynn, 1997) o simplemente parches coralinos, productos de acumulaciones de colonias coralinas de distintos tamaños, comprendiendo extensiones grandes del género *Pocillopora* (Perez-Vivar *et al.*, 2006). El único ejemplo de arrecife coralino estructural presente en el Golfo de California es Cabo Pulmo, abarcando un área de 450 ha (Perez-

Vivar *et al.*, 2006), que además de ser el arrecife más septentrional del Pacífico Oriental, en él habitan 226 especies de peces y aproximadamente 200 de invertebrados (Villareal-Cavazos, 1988; Arizpe *et al.*, 1988) lo que lo hace importante para la región.

Los estresores más importantes que enfrentan los parches coralinos en el Pacífico Oriental, incluido el Golfo de California se clasifican en dos, naturales y antropogénicos; dentro de los primeros se encuentran las tormentas y huracanes (González-Peláez *et al.*, 2001), y el blanqueamiento de sus colonias por fenómenos como el Niño y la Niña (Reyes-Bonilla *et al.*, 2002). De los inducidos por el hombre se encuentra la sedimentación o eutrofización del medio (Glynn 1997), destrucción debido a la técnica de pesca, la extracción de corales, el turismo y, destrucción por anclas, redes de pesca y encallamientos de barcos (Glynn, 1997; Balart, 2001).

### 1.3 Dispersión larvaria y conectividad

La mayoría de los peces e invertebrados, incluyendo los corales, pasan desde días hasta semanas en sus estadios larvarios pelágicos (Hellberg *et al.*, 2002). Durante ese tiempo estos se dispersan y pasan por una metamorfosis para transformarse en adultos. Este es el proceso que determinará principalmente la escala espacial de la estructura poblacional y es tema central en la dinámica poblacional de especies con estadio pelágicos (Purcell *et al.*, 2006; Cohen y Sponaugle, 2009). La dispersión o conectividad entre poblaciones se refiere al intercambio de individuos entre subpoblaciones geográficamente separadas que forman una metapoblación; puesto en el contexto de los corales, la conectividad involucra la fase de dispersión, el proceso de asentamiento (Cohen y Sponaugle, 2009), hasta que el

individuo forma parte de la población adulta y participa en la reproducción (Baums *et al.*, 2006).

Las dispersiones en corales a largas distancias han sido asociadas con la producción de larvas generadas a partir de la reproducción sexual de organismos no emparentados, lo cual mantiene una homogeneidad genética entre las poblaciones locales (Ayre *et al.*, 1997). En contraste, las dispersiones cortas o restringidas están generalmente asociadas con la endogamia, pérdida de diversidad genética y en un aumento en las tasas de divergencia entre las subpoblaciones (Knowlton y Jackson, 1993). Específicamente en corales, el tipo de dispersión está asociado a la propia biología de la larva, en donde el tamaño de los gametos o larvas pudiera ser un buen estimador del periodo de precompetencia (estadio planctónico). Las larvas recién paridas de corales anidadores son sustancialmente más grandes que los gametos, y tienen normalmente periodos de precompetencia menores, de 1 a 2 días (Atoda, 1947) en comparación con las larvas que fueron producto de una fertilización externa (5-7 días) [Baird, 1998]. La duración de la fase planctónica también difiere entre especies y es dependiente de los reservorios nutricios disponibles en la larva, presencia de zooxantelas (Glynn *et al.*, 1991), o la capacidad de alimentarse o absorber nutrientes (Richmond, 1987). En pocilopóridos del Golfo de California, Chávez-Romo y Reyes-Bonilla (2007) demostraron que los ovocitos presentaban un tamaño mayor en comparación a las especies de América Central y Galápagos (Glynn *et al.*, 1991) debido al reservorio de material nutritivo, y además encontraron zooxantelas en los ovocitos, todo lo anterior confiriéndole a las larvas una mayor capacidad de duración en la columna de agua (Richmond, 1987). Lo anterior, permitiría mantener niveles apreciables de conectividad

entre las poblaciones del Golfo de California y quizás el resto del Pacífico Mexicano (Chávez-Romo y Reyes-Bonilla, 2007).

Los rangos de dispersión de larvas plánulas coralinas han sido inferidos por medio de métodos directos e indirectos. Dentro de los primeros encontramos estudios biogeográficos (Veron, 1995), modelos hidrodinámicos (Wolanski, 1994), rastreo aéreo y muestreo planctónico de los desoves (Willis y Oliver, 1990), así como estudios en laboratorios abordando la fisiología y competencia larvaria (Richmond, 1987; Mundy y Babcock, 1998). Pero esta información en general ha sido limitada principalmente por el problema de la dilución y localización de las larvas en el océano. Dentro de los métodos indirectos sobresalen los estudios genéticos, que evalúan la diferenciación poblacional y las medidas de flujo génico, generando una herramienta poderosa para investigar la dispersión. Estos análisis se basan en que los migrantes exitosos deberán dejar un rastro genético de sus movimientos, generando un modo para estimar la conectividad poblacional. Sin embargo, debido a que los genes son recombinados y transferidos a través de múltiples generaciones, el genotipo tal cual de la larva obtenida no puede indicar directamente el origen de la larva de la misma forma que una etiqueta física/química (Hedgecock, 1994) a menos que la especie tuviera larvas asexuales como con el género *Pocillopora* (Stoddart, 1983). Pero en general, la interpretación de la distribución geográfica de los marcadores genéticos se fundamenta en el desarrollo y aplicación de modelos genéticos poblacionales (Waples, 1998).

#### 1.4 Estructura y flujo genético entre las poblaciones

La grandes poblaciones están agrupadas en menores subpoblaciones dentro de las cuales ocurre la reproducción. A esta agrupación se le denomina estructura poblacional o subdivisión poblacional, y es cuando existe una diferenciación genética entre las subpoblaciones, lo que significa que las frecuencias alélicas entre estas se vuelven diferentes (Hartl y Clark, 2007).

En la poblaciones marinas esto refleja la interacción histórica y contemporánea entre un conjunto de complejos procesos ecológicos, demográficos, etológicos, genéticos, oceanográficos, climáticos y tectónicos (Hedgecock, 1986). El efecto combinado de estos mecanismos, actuando a través de un rango de escalas espaciales y temporales, determinan las tasas y patrones de dispersión de gametos, cigotos, larvas y adultos. Son estos movimientos, junto con la sobrevivencia y reproducción exitosa de los migrantes, los que controlan la escala y tasa en donde procesos aleatorios (p.e. deriva genética) o determinísticos (p.e. selección natural) construyen o borran la estructura dentro y entre grupos de individuos (Grosberg y Cunninham, 2001).

El flujo genético ( $Nm$ ) entre poblaciones puede ser estimado empleando métodos directos e indirectos. Los indirectos estiman  $Nm$  a partir de diferencias genéticas entre poblaciones asumiendo que esas poblaciones han alcanzado un equilibrio (Slatkin, 1993). Los directos se centran en la asignación de individuos a sus poblaciones de origen (Manel *et al.*, 2005) o a sus progenitores (Jones *et al.*, 2005) y, de esta manera son conceptualmente similares a la evidencia obtenida de marcas físicas o químicas (Thorrold *et al.*, 2007). La diferenciación entre subpoblaciones ha sido medida tradicionalmente con los índices de

fijación de Wright ( $F_{ST}$ ), la cual es una varianza estandarizada en las frecuencias alélicas entre poblaciones. Para los loci con dos alelos, el  $F_{ST}$  va desde 0, cuando las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas en todos los loci, hasta 1, cuando las poblaciones no comparten alelos. En el modelo de Isla en equilibrio, el número absoluto de migrantes intercambiados cada generación puede ser estimado como  $Nm=(1-F_{ST})/(4F_{ST})$ , donde  $N$  es el tamaño efectivo poblacional de la población y  $m$  es proporcional a los migrantes entrando a esa población cada generación. Varios estudios en corales (Ridgway *et al.*, 2001; Ayre y Hughes, 2004; Miller y Ayre, 2004) han empleado esta ecuación, pero ha sido demostrado (Whitlock y McCauley, 1999) que se desvía del valor real varios órdenes de magnitud debido a que no se cumplen la gran mayoría con los supuestos del modelo de isla (Hedgecock *et al.*, 2007), los cuales son panmixia, tamaños poblacionales constantes y tasas de migración simétricas. Nuevos métodos basados en modelos de coalescencia superan algunas de estos problemas (Beerli y Felsenstein, 2001), pero tienen sus propias desventajas, ya que son sensibles a poblaciones no muestreadas (Slatkin, 2005).

Los estimados directos de la conectividad mediante el asignamiento toman ventaja de los marcadores moleculares variables (ver sección 1.5) para calcular la probabilidad que un individuo se haya originado de una población fuente particular, como los basados en genotipos multilocus (Paetkau *et al.*, 1995); estos asumen que las poblaciones son muestreadas aleatoriamente y están en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW). Más recientemente, se han desarrollado aproximaciones bayesianas y de máxima-verosimilitud, que incluyen menos supuestos y proveen de mayor exactitud en las estimaciones (Manel *et*

*al.*, 2005) así como también infieren tasas de migración entre las poblaciones (Wilson y Rannala, 2003).

### 1.5 Marcadores Moleculares para el estudio de Corales

Para que un marcador genético sea útil para inferir si las poblaciones están abiertas o cerradas, el marcador deberá de presentar polimorfismo intra-específico y se deberá de conocer su tipo de herencia. Ya existen fuertes bases teóricas que facilitan la interpretación de marcadores nucleares codominantes, heredados por ambos padres, y de marcadores mitocondriales ( $ADN_m$ ), heredados de manera matrilineal. En los estudios genéticos con corales, hay tres marcadores muy ampliamente usados: Alozimas,  $ADN_m$  y microsatélites. El análisis de las alozimas, que se refiere al polimorfismo de proteínas específicas, revelan una limitada proporción del total de la variación total codificada en el ADN, ya que solo detectan los polimorfismos en los aminoácidos con carga eléctrica que modifican su avance por electroforesis, por lo que con esta técnica se detecta un bajo polimorfismo. Por otro lado, las alozimas, están sujetas a presión selectiva y su manejo es muy delicado, ya que las muestras deben estar congeladas o extraídas inmediatamente en tejidos frescos para su análisis (Hellberg *et al.*, 2002).

El  $ADN_m$  es heredado en la gran mayoría de los casos por la madre, y este generalmente no se recombina como el nuclear, por lo que es muy útil para rastrear linajes maternos. Se han utilizado en estudios de genética de poblaciones, pero son más valiosos para analizar filogenias, ya que permiten comprender mejor la historia evolutiva (Avice, 2000). Específicamente en corales, el  $ADN_m$  es invariable, siendo obsoleto para estudios poblacionales (Shearer *et al.*, 2002).

Dentro de los marcadores nucleares sobresale el uso de los microsatélites. Los microsatélites son repeticiones en tándem de 2-10 pares de bases nucleotídicas. Estos son altamente variables en base al número de repeticiones, por lo que el polimorfismo puede ser analizado en base a los diferentes tamaños alélicos. Sus principales ventajas son su elevado polimorfismo y segregación independiente inter-loci, la cual debe de ser demostrada (Hellberg *et al.*, 2002).

## **2. Antecedentes**

*Pocillopora verrucosa* en el Golfo de California es un coral hermafrodita simultáneo que presenta modos mixtos de reproducción, que son el sexual, con emisión de gametos (Glynn *et al.*, 1991; Chávez-Romo y Reyes-Bonilla, 2007) y asexual por fragmentación (Reyes-Bonilla *et al.*, 2003). Existe un estudio realizado por Lirman (2000) que aborda los factores que promueven la fragmentación en el coral ramoso *Acropora palmata*, el cual presenta una morfología parecida a *P. verrucosa* y por tanto patrones semejantes de fragmentación. Las ventajas de la reproducción por fragmentación vs la reproducción por larvas, son: 1) Una mayor supervivencia y reclutamiento (Jackson, 1977); 2) colonización de áreas no adecuadas como arenas o gravas (Highsmith, 1982); y 3) no restricción a una temporada en el año. La mayor supervivencia de los fragmentos fue cuando estos crecían sobre el coral vivo y la mayor mortalidad en fondos arenosos (71%), y no hubo relación entre tamaño y supervivencia. Del mismo modo, los fragmentos muertos de disturbios previos servirán de sustrato para posteriores fragmentos, creando espacio primario y expansión del arrecife.

## 2.1 Reproducción asexual

No hay información en *P. verrucosa* que aborde el tema de su reproducción asexual. Sin embargo si existen estudios genéticos en otras especies dentro de la familia Pocilloporidae como *Seriatopora hystrix* y *P. damicornis*, con la consideración que a diferencia de *P. verrucosa* ambas especies son anidadoras, y además que *P. damicornis*, cambia de estrategia reproductiva a emisora en el Pacífico Oriental (Glynn *et al.*, 1991; Chávez-Romo y Reyes Bonilla, 2007).

En corales, la mayoría de los trabajos que abordan la clonalidad están interesados en conocer qué tanto aporta cada tipo de reproducción (sexual vs asexual) al mantenimiento de las poblaciones y cuáles son los factores que la provocan (Hunter, 1993; Coffroth y Lasker 1998; Lirman, 2000; Baums *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2007). Actualmente, no se ha encontrado un patrón definido por la gran variedad de hábitats, estrategias reproductivas y metodologías, tanto de campo como de análisis de los datos, que existen en los estudios. La mayoría de estos estudios utilizan a las alozimas como marcadores moleculares; las cuales no permiten una comparación directa con los valores absolutos de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ ) estimados a partir de microsatélites, debido al sesgo causado por el diferente polimorfismo de cada marcador, siendo la tasa de mutación, y por ende el polimorfismo, mucho mayor en microsatélites (Ridway *et al.*, 2001; Baums *et al.*, 2005).

En estos estudios, generalmente citan y ponen a prueba la hipótesis de “La fresa y el coral” (en inglés Strawberry-Coral model) propuesta por Williams (1975), en donde ambas especies usan la reproducción sexual para generar migrantes genotípicamente diversos o la emplean como estrategia en ambientes variantes, seleccionándose los genotipos más

adecuados. En cambio, la dispersión limitada de los propágulos asexuales será usada para mantener a las poblaciones compuestas de clonas localmente adaptadas dentro de hábitats parentales relativamente estables. Hunter (1993), en *P. compressa*, encontró la mayor diversidad genotípica en sitios con mayor disturbio (oleaje), la mayor clonalidad en sitios protegidos, y en sitios intermedios encontró niveles intermedios de diversidad genotípica. Por otro lado, Coffroth y Lasker (1998) demostraron que el pico de reproducción clonal por fragmentación es a niveles de perturbación intermedia (grandes disturbios seguidos de episodios de calma, como los huracanes), y en sitios con perturbaciones mayores, la diversidad genotípica fue menor. Esta misma hipótesis de la “perturbación intermedia” también fue demostrada por Adjeroud y Tsuchiya (1999) debido a la alta incidencia de tifones seguida de periodos de calma en Japón, apoyando también la hipótesis de que la reproducción asexual tendrá mayor contribución en el límite de la distribución geográfica de la especie.

Existen trabajos con alozimas, donde encontraron que las poblaciones son mantenidas principalmente por la reproducción asexual; esto involucra niveles bajos de diversidad genotípica ( $G_o/G_e$ ) y desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), con excesos y déficits de heterocigotos, causadas por el rompimiento y fragmentación de las colonias por distintos eventos ambientales como oleajes o ciclones (Ayre y Willis, 1988; Hunter, 1993; Coffroth y Lasker, 1998; Adjeroud y Tsuchiya, 1999; Ayre y Hughes, 2000) o por factores biológicos como la producción de larvas plánulas ameióticas (Stoddart, 1984). Sin embargo, en estos estudios siempre hubo la presencia del reclutamiento sexual, aunque a veces mínimo, en forma de migrantes de otras localidades, como ocurrió en

*Pocillopora damicornis* en la parte S-O de Australia (Stoddart, 1984); *Pavona cactus* en la Gran Barrera de Coral (GBC), Australia (Ayre y Willis, 1988); *Porites compressa*, en Hawaii (Hunter, 1993); en el gorgónido *Plexaura kuna*, en el Caribe (Coffroth y Lasker, 1998); y *P. damicornis* en Japón (Adjeroud y Tsuchiya, 1999). También se han observado situaciones de clonalidad extrema en algunas poblaciones como el caso presentado por Ayre y Willis (1988) donde encontraron solo dos genotipos en 60 individuos en el coral *Pavona clavus* en la GBC, siendo una diversidad genotípica cercana a cero ( $G_o/G_e=0.02$ ).

La especie hermana de *P. verrucosa*, *P. damicornis*, ha sido el centro de atención de muchos de los estudios clonales, la mayoría en distintos lugares de Australia y con resultados contradictorios a lo esperado. Ayre y Miller (2004) demostraron que las poblaciones “aisladas” de Isla Howard (Australia) no tuvieron inclinaciones a la asexualidad (diversidad genotípica ó  $G_o/G_e= 0.70$ ) ni siquiera en sitios ecológicamente estables. Miller y Ayre (2004) descubrieron que *P. damicornis* realiza un enorme gasto energético produciendo larvas asexuales-ameióticas, pero sin detectar su aportación o huella en las poblaciones naturales. Lo anterior debido a que encontraron diversidades genéticas del 75 al 100% que se esperarían en poblaciones principalmente sexuales. Sherman *et al.* (2006) observaron patrones similares, en donde todas las larvas analizadas fueron asexuales, pero el mantenimiento de las poblaciones fue principalmente sexual, con 14/17 sitios genotípicamente diversos ( $G_o/G_e=0.66$  a 1). Solamente en tres sitios se presentaron bajas diversidades genotípicas ( $G_o/G_e=0.35$  a 0.53), dos de los cuales tuvieron historial de blanqueamiento con mortalidades severas, y la recolonización de los sitios fue a partir de larvas asexuales de los adultos sobrevivientes.

Whitaker (2006) estudió los patrones de variación genética entre poblaciones de *P. damicornis* y la importancia relativa de los reclutas derivados de reproducción sexual y asexual en Australia Occidental. Este estudio es de los primeros que sugieren la eliminación de los genotipos repetidos o clones de los análisis genéticos debido al sesgo de sobrestimación que causa al medir la diferenciación poblacional o  $F_{ST}$ . Analizando alozimas demostraron niveles considerables y variables de reproducción asexual ( $G_o/G_e=0.072$  a  $0.77$ ), causadas por larvas asexuales ameióticas, y concluyen que la subdivisión genética significativa entre poblaciones ( $F_{ST}=0.360$  “con todas las clonas” y  $F_{ST}=0.175$  “individuos de origen sexual”) reflejó que las poblaciones tienen un reclutamiento local y los reclutas asexuales tienen efectos considerables en la abundancia local y estructura poblacional.

En otros estudios con microsatélites, Baums *et al.* (2006) evaluaron la variación de la estructura clonal empleando a la especie ramificada *Acropora palmata* en todo el Caribe, y demostraron que las poblaciones variaron desde un genotipo monoclonal ( $G_o/G_e=0.05$ ) hasta el 100% de diversidad esperada ( $G_o/G_e=1$ ). Allí la provincia occidental se caracterizó por colonias empobrecidas genotípicamente y con bajas densidades, y el caso contrario en la provincia oriental. El reclutamiento asexual no tuvo correlación con huracanes o tamaño de colonias (fuentes potenciales de fragmentos) pero estuvo negativamente correlacionada al tamaño de la plataforma continental. Por otro lado, Foster *et al.* (2007) estudiaron al coral masivo caribeño *Montastraea annularis* y demostraron que son capaces de tener dispersión asexual por medio de la generación y dispersión de sus

fragmentos causado por las tormentas o huracanes, pero siendo la estrategia sexual la dominante.

## 2.2 Reproducción sexual

Existen dos trabajos en Sudáfrica que utilizaron a *P. verrucosa* para conocer su estructura poblacional. Ridgway *et al.* (2001) estudiaron dos complejos arrecifales compuestos de un total de seis localidades, abarcando un rango geográfico de 150 km. Analizando seis loci alozimáticos, no detectaron diferencias significativas entre las poblaciones, en donde cada sitio fue genotípicamente diverso (promedio  $G_o/G_e=0.64$ ) con una baja replicación clonal y un elevado flujo genético entre poblaciones ( $Nm=44$ ). Ridgway *et al.* (2008) expandieron su estudio anterior introduciendo a poblaciones más norteñas, situadas en Mozambique, abarcando una distancia total de 850 km. Para este estudio emplearon cuatro loci microsatélites, y demostraron que todas las poblaciones tuvieron reproducción sexual (promedio  $N_g/N=0.88$ ); difirieron del EHW por déficit de heterocigotos; y encontraron una clina latitudinal en la diversidad genética. Por otro lado encontraron diferencias significativas ( $F_{ST}=0.054$ ;  $P<0.05$ ) entre las poblaciones del sur de África y Mozambique, sugiriendo una conectividad débil entre localidades. Debido al patrón de corrientes dirección Norte-Sur, las poblaciones de Mozambique contribuyeron con reclutas genéticamente diversos a las poblaciones sureñas ajustándose al modelo de “paso a paso” multi-generacional (en inglés *stepping-stone*).

Existen otros dos estudios que emplearon los mismos microsatélites de Ridgway *et al.* (2008). El primero fue en la especie *P. meandrina* (Magalon *et al.*, 2005) realizado con cuatro loci microsatélites en cuatro poblaciones del Archipiélago de la Sociedad (Pacífico

Sur), abarcando una distancia de 200 km y a su vez fueron comparados con la Isla de Tonga, a 2,000 m de distancia. Se reportaron déficits de heterocigotos para todas las poblaciones, y encontraron diferencias poblacionales muy significativas entre Tonga y el archipiélago de la Sociedad ( $F_{ST}= 0.104$ ;  $P=0.001$ ). Lo interesante es que dentro del archipiélago hubo un sitio (Moorea 1) diferente a todos ( $F_{ST}= 0.024$ ;  $P=0.001$ ), y la prueba de  $F_{ST}$  pareada entre poblaciones demostró que las diferencias fueron mayores a nivel local (dentro del Archipiélago de la Sociedad) que a distancias de 2,000 km (Tonga). Lo anterior se adjudicó a un evento de blanqueamiento seguido de una recolonización que pudo haber tenido un efecto de cuello de botella, lo que explicaría el promedio de heterocigosidad alto en Tonga y Moorea 1 (sitios no afectados), y bajo en los demás sitios del Archipiélago (sitios afectados). Sin embargo, la poca diferenciación genética entre islas del Archipiélago evidencia la existencia de un gran flujo genético en esta escala espacial, y que la reproducción dominante es la sexual.

En el segundo estudio se emplearon seis loci microsatélite (Souter *et al.*, 2009), empleando la otra especie *P. damicornis*. Se colectaron 29 sitios en los países africanos de Kenia y Tanzania. Se evaluó la conectividad a dos escalas espaciales, a nivel de cuatro áreas designadas o parques, y dentro de cada una con respecto a cuatro sitios arrecifales de colecta. Las escalas grandes abarcaron entre 120 a 700 km; y a escalas locales o cortas la longitud de los arrecifes por área fue entre 0.7 a 10 km. Se observó una división genética global significativa ( $F_{ST}=0.023$ ;  $P<0.001$ ), pero solo el 34% de las comparaciones pareadas de  $F_{ST}$  fueron significativas, indicativo de áreas muy conectadas (hasta 697 km) y aisladas (arrecifes dentro de la misma área <10 km) dentro del mismo rango geográfico. No se

observó aislamiento por distancia en ninguna escala espacial, adjudicándolo a una estructura genética global desordenada denominada “parqueo genético caótico”, generada por factores de selección pre- y post-asentamiento, y a diferentes orígenes genéticos larvarios. De manera interesante, logran separar del flujo genético histórico, los patrones contemporáneos de migración, presentando rangos de 0 a 4 migrantes dentro de cada población y distancias de dispersión entre 5 y 500 km.

Baums *et al.* (2005) emplearon cinco microsatélites en la especie ramificada *Acropora palmata* para analizar 11 sitios y 44 arrecifes del Caribe y las Bahamas, y al igual que Whitaker (2006), solo tomaron en cuenta los genotipos multilocus únicos para los análisis genéticos (de n=1300 a n=709). Se demostró por medio de enfoques que involucran el genotipo multilocus de los organismos, que se puede detectar tanto la migración y el aislamiento poblacional a escalas temporales más contemporáneas. Usando un análisis Bayesiano, demostraron que las poblaciones del oeste y este del Caribe han tenido poco o ningún reciente intercambio de migrantes ( $F_{ST}= 0.040$ ;  $P<0.001$ ), identificando a Puerto Rico como un área de mezcla entre las dos subregiones. Como consecuencia de este aislamiento, las poblaciones deberán tener el potencial de adaptarse localmente y por tanto requerirán de estrategias de manejo específicas.

Underwood *et al.* (2006) estudiaron la conectividad del pocilóporo *Seriatopora hystrix* en las Islas Scott después del evento de blanqueo en 1998, abarcando escalas de 2 a 60 km. Los ocho loci microsatélite demostraron una estructura significativa en todos los sitios ( $F_{ST}=0.095$ ;  $P<0.001$ ), debido al reclutamiento local de las larvas paridas. Del mismo modo que Baums *et al.* (2005), emplearon análisis Bayesianos para determinar la

conectividad entre arrecifes, relacionando la densidad coralina con el número de migrantes, demostrando que el sitio que no fue afectado por el blanqueamiento, sirvió de sitio fuente al resto de las subpoblaciones, y el sitio que más inmigrantes recibió fue el único que pudo recuperar su densidad coralina original.

Por otra parte Maier *et al.* (2009) estudiaron a *Seriatopora hystrix* en Dahab, dentro del Mar Rojo. Se muestrearon dos sitios, y se analizaron cinco loci microsatélite, observándose EHW, panmixia y reproducción principalmente sexual y diferencias significativas sutiles entre sitios ( $F_{ST}= 0.035$ ;  $P<0.0001$ ). Los análisis Bayesianos de inmigración demostraron que hay un alto reclutamiento de fuentes desconocidas hacia ambas poblaciones.

### 2.3 Trabajos de estructura poblacional en el Golfo de California

Actualmente existen tres trabajos que abordan la estructura poblacional, por medio de alozimas, de tres distintas especies de coral a lo largo del Pacífico Mexicano (PM) incluyendo el Golfo de California (GC); Dos emplean a los corales masivos *Porites panamensis* (Paz-García *et al.*, 2008) y *Pavona gigantea* (Saavedra-Sotelo, 2007). En ambos casos hubo estructura significativa entre la región sur del GC y el resto de las poblaciones. El tercer estudio fue realizado por Chávez-Romo *et al.*, (2008) empleando a *P. damicornis*, en donde encontraron déficits de heterocigotos causados por reproducción clonal, endogamia o efecto Wahlund, y demostraron clinas de diversidad genética a lo largo del PM, siendo el GC el más empobrecido. Por otro lado, observaron que las poblaciones dentro y en la entrada del GC poseen diferencias sutiles, y muy significativas con el resto del PM. Las diferencias fueron adjudicadas a varios factores (reclutamiento local, patrones de

corrientes), incluyendo el modo de reproducción dominante en las poblaciones. Se encontró además que la fragmentación es muy común en todo el PM.

### **3. Justificación**

Actualmente el calentamiento de los océanos y los efectos destructivos antropogénicos en las costas están causando que los ecosistemas coralinos se colapsen y tengan daños ecológicos irrevocables, así como pérdidas millonarias a las economías de los países. Esto ha orillado el desarrollo, a veces brusco o acelerado, de planes de manejo o conservación sin las herramientas o estudios suficientes. Muchas veces la ignorancia de la biología de especies o la limitante de la tecnología en estos estudios, evita que se desarrolle un plan de manejo coherente para las demandas actuales de conservación y manejo.

Específicamente en corales, el determinar cuántas poblaciones existen, su tamaño efectivo, cuales son los sitios fuente, los sitios sumidero, los mas genéticamente diversos, y sus patrones de dispersión larvaria con simples herramientas básicas (morfometrías, taxonomía, monitoreo de larvas) no serían suficientes para contestar estas preguntas. Además de ser cuestionamientos elementales, no solo para corales, sino para cualquier especie marina de importancia ecológica o pesquera importante que se quiera conservar y/o manejar. Por lo que se necesita de las herramientas genéticas para poder darle esa precisión al estudio, resaltando la importancia de proteger e identificar los arrecifes fuente y más genéticamente diversos, pudiendo inclusive estimar a escalas ecológicas contemporáneas como están conectadas las poblaciones, tema tan importante en materias de conservación y manejo.

Actualmente se conoce poco sobre cómo es la estructura poblacional de *P. verrucosa*, uno de los principales corales constructores de arrecifes coralinos en Cabo Pulmo (único arrecife coralino verdadero en el GC) y de los parches arrecifales en el resto del Golfo de California. Se han inferido patrones a través de su biología o empleando marcadores moleculares de baja resolución en uno o dos sitios dentro de la península, pero en ningún estudio se ha examinado que ocurre a todo lo largo de su rango de distribución (Los Cabos – Loreto). Lo anterior es de particular importancia debido a que Baja California Sur está siendo invadida por constructoras costeras, un turismo creciente y desmedido, pesca furtiva que atenta la integridad del arrecife y un crecimiento poblacional producto de la migración de gente tanto nacional como internacional.

#### 4. Hipótesis

1. Debido a sus características biológicas y capacidad de dispersión larvaria, las poblaciones de *Pocillopora verrucosa* formarán una sola población con elevado flujo genético entre localidades más cercanas. Apoyando lo anterior se espera que el modo de reproducción dominante sea el sexual y que los genotipos de cada individuo entre localidades no se repitan en el Golfo de California.
2. Debido a la alta incidencia de huracanes, tormentas y recientes disturbios antropogénicos como encallamientos de barcos reportadas dentro del Golfo de California, se espera que la reproducción asexual sea dominante en los sitios donde hubiera mayor incidencia de estos factores, por efectos directos en la fragmentación de las ramas coralinas.
3. La diversidad genética y genotípica disminuirá en un gradiente lineal hacia latitudes más altas, debido a que las poblaciones de corales hermatípicos no se encuentran en las mejores condiciones ambientales (temperatura, luz, surgencias) y se empobrecen genéticamente conforme aumenta la latitud.
4. Se espera que la mayor dispersión larvaria ( $Nm$ ) sea en dirección Sur→Norte porque es la condición oceanográfica dominante del verano que es cuando se presentan los picos de desove reportados para la especie.
5. Se espera que ocurra un efecto de aislamiento por distancia debido a que la deriva genética y factores estocásticos tendrán mayor efecto que la migración entre las localidades más alejadas.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Determinar si existe estructura genética en el coral hermatípico *Pocillopora verrucosa* en las costas orientales de Baja California Sur.

### 5.2 Objetivos particulares

1. Determinar la estructura genética regional del coral *P. verrucosa* bajo un esquema sexual (considerando genotipos multilocus únicos) y otro asexual.
2. Determinar los sitios genéticamente más diversos en la península.
3. Determinar el tipo de reproducción dominante (sexual/asexual) que mantiene localmente a cada subpoblación
4. Determinar el efecto de los huracanes en la estructura genética intrapoblacional regional.
5. Determinar si existe un efecto de aislamiento por distancia entre las poblaciones de la región.
6. Estimar el número de migrantes y los patrones principales de dispersión larvaria en la región.
7. Determinar zonas fuente y sumidero con base en tasas de inmigración en escalas ecológicas o contemporáneas.

## 6. Material y Métodos

### 6.1 Área de estudio

Se recolectó un total de 217 ejemplares de *Pocillopora verrucosa* de cinco sitios de la Península de Baja California (Fig. 1) de febrero del 2008 a junio del 2009, abarcando todo el rango de distribución regional. Las localidades fueron, de norte a sur: 1) Loreto (L), donde la densidad coralina fue muy baja (cabezas o colonias aisladas), obligando a tomar ejemplares de varios sitios: Las Palmas, en la Isla Carmen (25°48'19.4" N, 111°12'10.3" O); La Biznaga en la Isla Danzantes (25°48'55.3" N, 111°15'33.1" O); y un islote situado más al sur denominado El Candelero (25°44'40.9" N, 111°13'37.9" O).

En la Bahía de la Paz, se tomaron ejemplares en el sitio 2) El Portugués (P), en la costa peninsular a unos 50 km al sur de San Juan de La costa (24°40'48.5" N, 110°40'49.8" O); el sitio 3) Canal de San Lorenzo (C), ubicado entre el lado sur de la Isla Espíritu Santo y la playa El Tecolote en el área peninsular (24° 23.208' N y 110°18.900'O); este sitio fue impactado por el buque-tanque "Lázaro Cárdenas II" en septiembre del 2001, dejando un área total impactada de aproximadamente 8km<sup>2</sup>; y posteriormente en el mismo mes fue impactado indirectamente por el huracán Juliette (categoría 2). La colecta se realizó en un área restaurada (área primaria de daños, 847m<sup>2</sup>) en noviembre, en donde se "resembraron" fragmentos de coral de los alrededores para su restauración (Balart, 2001); y el sitio 4) Isla Espíritu Santo (IS), específicamente en Bahía San Gabriel (24°25'36.77"N y 110°22'10.37"O).

El sitio 5) fue el más sureño, siendo el Parque Nacional Cabo Pulmo ( $23^{\circ}24'28.53''\text{N}$  y  $109^{\circ}25'32.24''\text{O}$ ), caracterizado por ser el único arrecife de coral verdadero del GC.

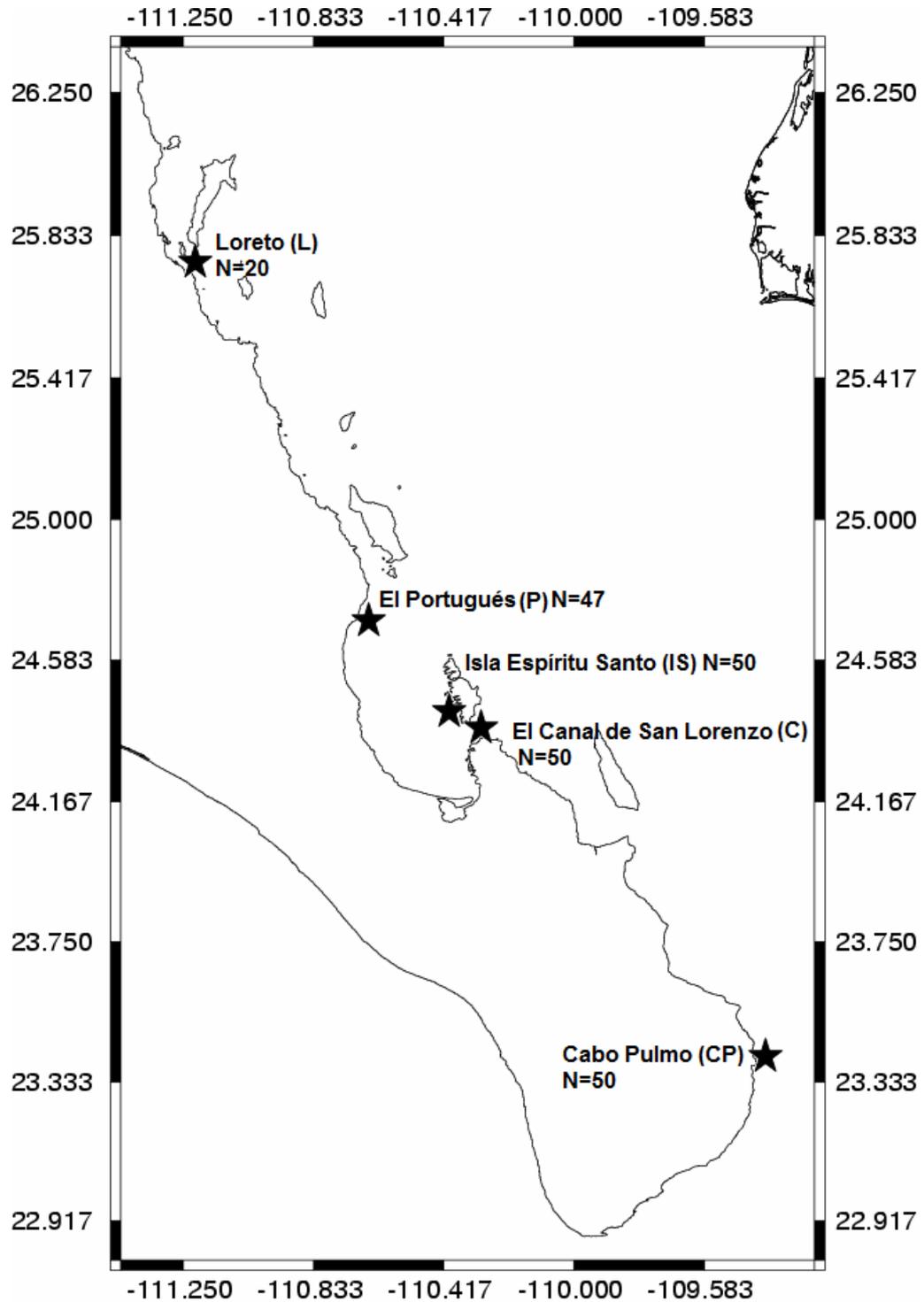


Figura 1– Sitios de muestreo de *P. verrucosa* en la península de Baja California, y tamaño de la muestra colectada (N).

## 6.2. Colecta de las muestras

Se colectaron 2 cm de un “dedo” o punta de cada colonia/individuo de *P. verrucosa*, extrayendo alrededor de 50 muestras aleatorias por sitio. Loreto fue el único sitio, donde debido a su baja densidad poblacional, se colectaron únicamente 20 muestras.

Se realizó la identificación y extracción con equipo de buceo autónomo (SCUBA), a una profundidad media de colecta menor a los 4m. Las colonias fueron identificadas de acuerdo a Veron y Pichon (1976), Veron (1986) y Cortes y Guzman (1998). Al terminar el muestreo, los fragmentos fueron preservados en etanol al 70% y trasladados hasta el laboratorio de Genética Acuícola en el CIBNOR para su posterior procesamiento.

Se midieron las colonias coralinas de Loreto, el Canal y La Isla Espíritu Santo de acuerdo al método de Solano *et al.* (1993) considerando el diámetro máximo horizontal y máximo vertical. Se empleó la prueba de Krustal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney para el análisis de las tallas por subpoblación usando el programa STATISTICA v.8.0 (Statsoft, 2007).

## 6.3. Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído a partir de la maceración de una o dos verrugas de cada punta colectada en tubos de 1.5 ml. Se usó un Kit comercial (DNeasy®Tissue-QIAGEN), siguiendo las especificaciones del fabricante. La calidad del ADN fue verificada mediante geles de agarosa (SIGMA) al 1% teñidos con bromuro de etidio (SIGMA) en un transiluminador de luz ultra violeta BioDoc-It™ (UVP). En los mismos geles se cuantificó el ADN, al comparar su intensidad con marcadores de ADN de peso molecular conocido ( $\lambda$ -INVITROGEN a diluciones con 100, 150 y 200 ng/ $\mu$ l).

#### 6.4. Amplificación por PCR

Los marcadores fueron amplificados por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés *PCR*), utilizando seis loci microsatélite. En donde dos loci (PV6 y PV7) fueron específicos para *Pocillopora verrucosa* (Magalon *et al.*, 2004) y los otros cuatro (Pd-3002, Pd-3005, Pd-2006 y Pd-3008) fueron específicos para la especie hermana *P. damicornis* (Starger *et al.*, 2008) (Tabla I). Ninguno amplifica el ADN de la zooxantela, por lo que no se tuvo que removerlas del tejido.

La *PCR* se llevó a cabo en un termociclador iCYCLER (Applied Biosystems) en reacciones con un volumen total de 12.5µl, con las siguientes concentraciones de reactivos: Buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, dNTP's 0.2mM, 0.5µM de cada primer y 0.625 U/µl de Taq polimerasa.

Tabla I. Oligos usados para la amplificación por *PCR* de los microsatélite empleados en el estudio y sus características principales.

Locus	Rango de tamaño (pb)	Secuencia de Oligo (5'-3')	No. Acceso GenBank	Tipo de repeticiones	Autor
PV6	195-219	F:CTTCCCGACCAGTTTAGGG R:AGCCGTTTCAGCTACCTATGG	AY397781	(GT) <sub>7</sub>	Magalon <i>et al.</i> , 2004
PV7	215-233	F:GGAGATGGATGGAGACTGC R:GGTATCTCTGTGCTCAGTTCTTTG	AY397782	(GT) <sub>5</sub> (CT) <sub>2</sub> GT(CT) <sub>3</sub>	Magalon <i>et al.</i> , 2004
Pd-3002	195-243	F:ATCCGAATACAAGCGAAAACG R:CAAAGCTTCTATCAGAAAATGCAA	DQ684673	(AAC) <sub>10</sub>	Starger <i>et al.</i> , 2008
Pd-3005	162-187	F:AGAGTGTGGACAGCGAGGAT R:GTTTCCTTCGCCTTCGATTTT	DQ684676	(TGA) <sub>9</sub>	Starger <i>et al.</i> , 2008
Pd-2006	181-199	F:ATCTCCATGTGATCGGCATT R:GTTCCCCCAGCTGAGAAGTT	DQ684677	(CA) <sub>8</sub>	Starger <i>et al.</i> , 2008
Pd-3008	153-162	F:AGTTGAGGTTGTTGAAACATG R:TCCATGCAGAACCCC	EF120464	(CTG) <sub>7</sub>	Starger <i>et al.</i> , 2008

Los ciclos de amplificación empleados para todos los oligos fueron los propuestos por Magalon *et al.* (2004): 1×94°C (10 min), 30× (45s a 94°C, 45 s a 55°C, 30 s a 72°C), y 1×72°C (8 min).

Se presentaron en algunos loci (PV6 y Pd-2006) problemas en su lectura por artificios en su amplificación denominados en inglés “stutters”. Estos son errores ocasionados por plegamientos de la hebra sencilla durante la polimerización con la Taq, produciéndose fragmentos de menor tamaño al alelo real, dificultando la lectura de los genotipos. Para disminuir lo más posible este error de amplificación, en estos loci se empleó el protocolo propuesto por Yoshida *et al.*, (2005): 1×94°C (2 min), 5×(5s a 94°C, 60s a 56°C, 60s a 72°C), 20×(0s a 94°C, 60s a 56°C, 60s a 72°C) 1×72°C (60 min).

#### 6.5. Electroforesis y visualización de los productos de *PCR*

Todos los productos de *PCR* se corrieron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 5% y urea 7.5M, a 2500v, 100ma y 90wtts, por 2.5 horas aproximadamente. Los genotipos fueron visualizados mediante revelado con Sybr gold y con la ayuda de un scanner FMBIO III Multi Viex (HITASHI).

## 6.6. Análisis de datos

### 6.6.1 Diversidad Genotípica

Todos los individuos de las diferentes localidades fueron genotipificados mediante el programa GIMLET (Valière, 2002), el cual identifica y agrupa a los individuos con base en los genotipos multilocus únicos de cada sitio, detectando a los individuos que comparten el mismo genotipo (clonas). También se calculó la probabilidad de identidad ( $P_{ID}$ ) que estima la probabilidad de coleccionar dos individuos de la misma población con un mismo genotipo multilocus por azar y no por descendencia (Wait *et al.*, 2001). Se emplearon dos fórmulas, con sesgo (Paetkau Strobeck, 1994) y sin sesgo (Kendal y Stuart, 1977):

Con sesgo: 
$$P_{ID} = \sum_i p_i^4 + \sum_i \sum_{i \neq j} 2p_i p_j \quad (1)$$

Sin sesgo: 
$$P_{ID} = \frac{n^2(2a_2^2 - 2a_2) - (2n^2(a_2 + 2a_2)) + n(9a_2 + 2) - 6}{(n-1)(n-2)(n-3)} \quad (2)$$

Donde  $p_i$  y  $p_j$  son las frecuencias del  $i$ -ésimo y  $j$ -ésimo alelo y  $a_n = \sum_i p_i^n$

Se obtuvo la **riqueza genotípica**, normalizada al tamaño de muestra, calculada según Coffroth y Lasker (1998):

$$N_g/N \quad (3)$$

Donde  $N_g$  es el *número de genotipos multilocus únicos por sitio* y  $N$  el *número de colonias genotipificadas*. La riqueza genotípica será igual a 1 cuando todas las colonias en una población sean únicas y será 0 cuando todas las colonias sean dominadas por un solo genotipo. De acuerdo a Ridgway *et al.* (2008) la riqueza genotípica sirve como un índice para estimar los efectos de la reproducción asexual en la diversidad genotípica, dando un estimado máximo de la contribución de la reproducción asexual al reclutamiento local.

Se calculó la **equidad genotípica** según Coffroth y Lasker (1998):

$$G_o/N_g \quad (4)$$

Donde  $G_o$  es la *diversidad genotípica observada*, calculada como:

$$G_o = 1/\sum g_i^2 \quad (5)$$

Donde  $g_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo genotipo en la población (Stoddart y Taylor, 1988). La equidad genotípica, representa el número de individuos por clon; esta tiene un máximo de 1 cuando todos los genotipos están distribuidos equitativamente entre las clonas y se acerca a cero cuando un solo clon domina la población.

Se evaluó la **diversidad genotípica** la cual estima la importancia relativa de la propagación asexual en una población según Stoddart y Taylor (1988):

$$G_o/G_e \quad (6)$$

En donde se compara la diversidad genotípica observada ( $G_o$ ) contra la diversidad esperada ( $G_e$ ) en una estricta población sexual; siendo  $G_e$  el número de genotipos totales por localidad.

Con base en las combinaciones de diversidad genotípica ( $G_o/G_e$ ) y equidad genotípica ( $G_o/N_g$ ), las poblaciones fueron categorizadas en cuatro grupos de acuerdo a la clasificación realizada por Baums *et al.*, (2006):

1. Sexual ( $G_o/G_e \geq 0.80$  ;  $G_o/N_g \geq 0.85$ ),
2. Mayoría sexual ( $G_o/G_e$  entre 0.79 - 0.25;  $G_o/N_g$  0.84 - 0.51)
3. Mayoría asexual ( $G_o/G_e$  entre 0.25 - 0.11 ;  $G_o/N_g$  entre 0.50 - 0.25)
4. Muy asexual ( $G_o/G_e \leq 0.10$  ;  $G_o/N_g \leq 0.24$ ).

#### 6.6.1.1 Factores potenciales que influyen la estructura clonal

Para demostrar si existía una relación entre el nivel de reproducción asexual y presencia de disturbios ambientales se analizó la ocurrencia de huracanes en la zona entre 1940 y 2006. Se crearon zonas estandarizadas de amortiguamiento o buffer definidas (Baums *et al.*, 2006), de acuerdo a la fuerza de la tormenta: 35km de zona buffer para tormentas tropicales y huracanes categoría I y II (HS1 y HS2); 60 km para categorías 3 (HS 3); 100 km para categorías 4 y 5 (HS 4 y HS 5). Existen datos espacialmente explícitos para la región oriental del Pacífico, y en particular el Golfo de California, disponibles en la página WEB del Centro Nacional de Huracanes (NHC) de la NOAA (National Oceanic and

Atmospheric Administration) (<http://csc-s-maps-q.csc.noaa.gov/hurricanes/viewer.html>).

Los datos empleados se encuentran en el Anexo C.

Se realizaron regresiones lineales tomando como variable independiente el número de huracanes en la zona y como dependiente a los índices de riqueza genotípica ( $N_g/N$ ), diversidad genotípica ( $G_o/G_e$ ) y equidad genotípica ( $G_o/N_g$ ). Los análisis se realizaron en el programa STATISTICA v.8.0 (Statsoft, 2007)

#### 6.6.2. Variabilidad genética

Para cada localidad se obtuvieron los niveles de variabilidad genética expresados en términos de número de alelos promedio (A), número de alelos efectivos ( $n_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ); usando el programa ARLEQUIN v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), tanto para la totalidad de los individuos, como empleando únicamente individuos con genotipos multilocus únicos (Baums *et al.*, 2005).

Se revisaron los errores genotípicos (alelos nulos, “bandas fantasma” o stutters, “allelic drop out” o la falta de amplificación del alelo más grande y errores tipográficos) mediante el programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

Para probar el equilibrio de Hardy- Weinberg se siguió el procedimiento de Guo y Thompson (1992) usando una prueba análoga a la prueba exacta de Fisher. Esta prueba emplea un algoritmo aleatorio modificado de las cadenas de Markov empleando el programa ARLEQUIN v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). De esta forma se usaron 1,000,000 pasos en las Cadenas de Markov y 100,000 “dememorizaciones” (en inglés dememorisations) locus por locus usando un valor de significancia de 0.05. Donde la

hipótesis nula establece que las poblaciones están en equilibrio, de Hardy-Weinberg. Por último se realizó una corrección de Bonferroni para ajustar el valor crítico de significancia (Rice, 1989).

Se determinó el desequilibrio de ligamiento entre los pares de loci utilizando el programa ARLEQUIN v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Este se basa en el método de Cadenas de Markov aplicando una prueba exacta de Fisher, utilizando 100,000 pasos en la Cadena de Markov, con 100,000 “dememorizaciones”, y con un criterio de significación de 0.05. La hipótesis nula de dicha prueba establece que los genotipos de un locus son independientes de los genotipos de otro locus. Por último se realizó una corrección de Bonferroni para ajustar el valor crítico de significancia (Rice, 1989).

#### 6.6.3. Determinación de la estructura poblacional

Se emplearon dos análisis para determinar la estructura poblacional: Método pareado de  $F_{ST}$ , y un análisis bayesiano por medio del programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Para este tipo de análisis se usó la base de datos con genotipos multilocus únicos o sin clonas, denominados “individuos de posible origen sexual”, para así eliminar un sesgo hacia una sobrestimación de las medidas de diferenciación (Baums *et al.*, 2006; Whitaker, 2006). Con fines comparativos, se calcularon los valores pareados de  $F_{ST}$  empleando la base de datos total (individuos de origen sexual y asexual).

El método pareado de  $F_{ST}$  es usado para medir las distancias genéticas a corto plazo entre poblaciones con reproducción sexual. Esta prueba tiene la hipótesis nula de ausencia de diferencias entre las poblaciones (un valor de  $F_{ST}$  pareado no diferente de cero), y fue analizado con el programa ARLEQUIN v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), aplicando 10,000

permutaciones con un nivel de significancia del 0.05. Se realizó una corrección de Bonferroni para ajustar el valor crítico de significancia en las pruebas múltiples (Rice, 1989). El índice de fijación se calculó de acuerdo a Weir y Hill (2002) donde el  $F_{ST}$  global será el promedio ponderado de los valores específicos de  $F_{ST}$  de cada población, como:

$$F_{ST} = (\sum_{i=1}^P n_i F_{STi}) / \sum_{i=1}^P n_i \quad (7)$$

Donde  $n_i$  es el número de copias de genes muestreados en la  $i$ -ésima población, y proponen usar como valor poblacional específico para la  $i$ -ésima población la cantidad de:

$$F_{ST} = \frac{\frac{1}{n} \left[ \frac{1}{P-1} SSD(AP) - \frac{1}{n_i} \frac{N}{N-P} SSD(WP) \right]}{\sigma_T^2} \quad (8)$$

Donde  $n$  es definido como:

$$n = \frac{N - \sum_p \frac{N_p^2}{N}}{P-1} \quad (9)$$

Siendo  $N$  el número total de individuos;  $N_p$  el número de individuos en la población  $p$ ;  $P$  el número total de poblaciones;  $SSD(AP)$  es la suma de desviaciones cuadradas entre las poblaciones;  $SSD(WP)$  es la suma de desviaciones cuadradas dentro de las poblaciones;  $\sigma_T^2$  es la varianza molecular total al cuadrado.

Se empleó el programa STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000) para determinar la estructura poblacional de la región basándose en el análisis de genotipos multilocus. Este se basa en un método bayesiano de agrupamiento que toma una muestra de los genotipos completos y determinando el número más probable de poblaciones ( $K$ ) que expliquen mejor los datos. El programa asume los supuestos de equilibrio de Hardy-Weinberg y equilibrio de ligamiento entre las subpoblaciones. Con fines comparativos, se emplearon los parámetros de corrida usados por Ridgway *et al.* (2008) con poblaciones de  $P$ .

*verrucosa* en Sudáfrica, donde el periodo de calentamiento fue de 100,000; con 250,000 Cadenas de Markov; “modelo ancestral de mezcla (admixture)”; frecuencias alélicas correlacionadas”; y con 10 iteraciones.

Se realizó una prueba de Mantel para determinar si existía una correlación entre distancias geográficas con distancias genéticas, para lo cual se utilizó el programa en línea ISOLDE el cual está incorporado en el programa GENEPOP en línea (Raymond y Rousset, 1995; <http://genepop.curtin.edu.au/>). En la prueba se consideraron las distancias geográficas en kilómetros y los valores de  $F_{ST}$  linearizados  $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ . Para determinar la significancia estadística de la regresión se utilizaron 100,000 permutaciones y una distancia mínima de 12 km entre localidades, contrastando la hipótesis nula de independencia entre las matrices de distancia geográfica y distancia genética.

#### 6.6.4. Patrones de migración y tamaños poblacionales relativos

Para inferir las tasas de migración de *Pocillopora verrucosa* se empleó la base de datos con los individuos de posible origen sexual, suponiendo que la migración de un sitio a otro solamente se puede dar por medio de larvas plánulas producto de la reproducción sexual.

La tasa de migración normalmente se obtiene a partir del  $F_{ST}$  de Wright (1965) para inferir patrones de flujo genético. Sin embargo, asume que todas las subpoblaciones tienen el mismo tamaño o que son infinitas, además de considerar tasas de migración simétricas, lo cual en las poblaciones naturales casi nunca sucede, por lo que el uso de este método lleva a sobreestimaciones erróneas del flujo génico.

Actualmente se puede estimar el tamaño poblacional y las tasas de migración sin asumir equidad en las poblaciones y simetría en sus migraciones mediante el programa MIGRATE 3.0.3. (Beerli y Felsenstein, 1999; Beerli y Felsenstein, 2001). Estos estimados son promedios sobre el tiempo evolutivo y revelan patrones a largo plazo de la migración (Beerli, 1998). Para lo anterior se empleó la máxima verosimilitud empleando el algoritmo de Monte Carlo basado en las Cadenas de Markov (MCMC) y en la teoría de coalescencia (para la parte teórica del modelo ver Beerli y Felsenstein, 2001). El programa estima dos parámetros  $\theta$  y  $M$ , el parámetro del tamaño poblacional relativo  $\theta$  lo obtiene a partir de:

$$\theta = 4N_e\mu \quad (10)$$

donde  $N_e$  es el tamaño efectivo poblacional y  $\mu$  = tasa de mutación. Debido a que se desconoce  $\mu$ , este se absorbe en los parámetros  $\theta$  (fórmula 10) y  $M$  (fórmula 11) como constante (Beerli y Felsenstein, 1999).

Los patrones de migración se obtuvieron calculando el parámetro  $M$ :

$$M = m/\mu \quad (11)$$

donde  $m$  es la tasa de inmigración, asumiendo una tasa de mutación constantes entre todos los loci.

Finalmente se derivó el número de inmigrantes por generación (Beerli y Felsenstein, 1999), como:

$$M*\theta = 4N_e m \quad (12)$$

Se empleó el modelo alélico (modelo mutacional infinito de alelos), utilizando dos corridas analíticas, una corrida inicial corta y otra más larga. La primera fue realizada con la estimación del tamaño poblacional ( $\theta$ ) y de migración ( $M$ ) obtenidos a partir de los valores de los  $F_{ST}$ , empleando 10 cadenas cortas y 3 largas con 5,000 y 15,000 genealogías guardadas respectivamente, eliminando las primeras 10,000 genealogías como periodo de calentamiento. La segunda corrida, más larga, se realizó introduciendo los valores obtenidos de los parámetros  $\theta$  y  $M$  de la corrida corta, empleando 10 cadenas cortas y 3 largas con 50,000 y 500,000 genealogías guardadas respectivamente, eliminando las primeras 10,000 genealogías como periodo de calentamiento. Además, se empleó un esquema de calentamiento adaptativo de cuatro cadenas con las temperaturas de 5.0, 2.5, 1.5 y 1, con un intervalo de cambio de 1. Este esquema permite muestrear en zonas con mayores probabilidades, resultando en estimados más exactos que los brindados por una sola cadena larga (Beerli y Felsenstein, 2001).

Al intentar estimar el valor del tamaño efectivo poblacional,  $N_e = \theta/4\mu$ , es evidente que la tasa de mutación tiene una gran influencia en el resultado, y estas pueden variar en microsatélites entre  $10^{-5}$  hasta  $10^{-2}$  por locus y por generación (Weber y Wong, 1993). Consecuentemente cualquier estimado de  $N_e$  está propenso a una gran variación (varios

órdenes de magnitud) dependientes de la tasa de mutación empleada. Por lo tanto seguimos la recomendación de DeWoody y Avise (2000) en usar los valores relativos de  $\theta$  en vez de estimados absolutos de  $N_e$ .

Se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas (Kruskall-Wallis, Mann-Whitney) empleando el programa STATISTICA v.8.0 (Statsoft, 2007) para observar si existían diferencias significativas entre las magnitudes de flujo genético ( $Nm$ ).

## 7. Resultados

De las tres localidades, en donde se tomaron datos morfométricos, en el Canal se presentaron las mayores tallas promedio ( $0.36\text{m}^2$ ), seguida por la Isla Espíritu Santo ( $0.09\text{m}^2$ ), y Loreto ( $0.046\text{m}^2$ ). Las tres poblaciones fueron estadísticamente diferentes entre cada una [ $H(2, N=120)=54.75272$   $p=0.0000$ ], los datos se encuentran en el anexo D.

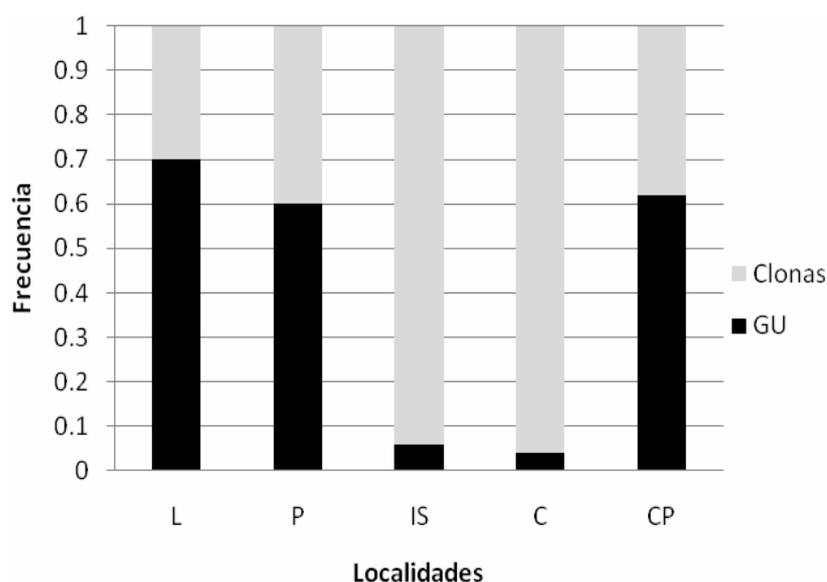
### 7.1. Diversidad Genotípica

Los 217 ejemplares colectados de las cinco localidades estudiadas fueron exitosamente genotipificados. La probabilidad de Identidad ( $P_{ID}$ ), que es la probabilidad que dos individuos compartan el mismo genotipo multilocus por azar y no por descendencia, fue con sesgo de  $P_{ID_s}=2.94 \times 10^{-19}$  y sin sesgo  $P_{ID}=8.48 \times 10^{-20}$ . Esto resulta en una probabilidad muy baja de que los individuos con genotipos multilocus idénticos no sean clonas. Del total de individuos genotipificados (217), solo 99 fueron genotipos multilocus únicos y ninguno se repitió entre localidades. Esto representa menos de la mitad del tamaño de muestra (45%), indicando una alta clonalidad en el área.

Se encontraron clonas en todos los sitios y su frecuencia varió por localidad, con rangos entre 0.30 (Loreto) a 0.96 (El Canal) [Fig.2]. Los sitios que presentaron la mayor clonalidad fueron el Canal y la Isla Espíritu Santo, con frecuencias superiores a 0.90. En cuanto a la frecuencia de individuos con genotipos multilocus únicos por sitio, Loreto fue el que mayor frecuencia presentó (0.7) seguida de Cabo Pulmo (0.62) y el Portugués (0.6) [Fig.2]. La Isla y el Canal presentaron frecuencias de genotipos multilocus únicos muy

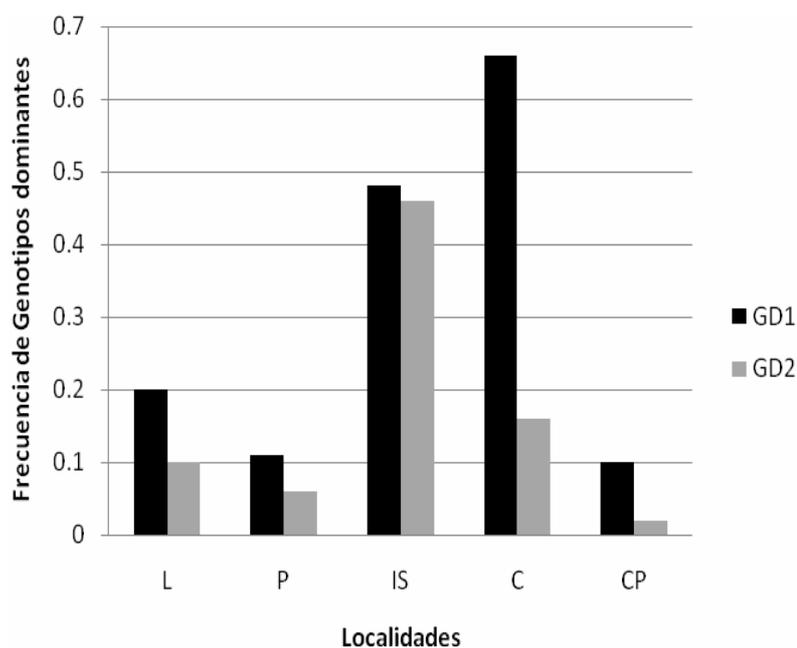
bajas (0.06 y 0.04, respectivamente), corroborándose la importante contribución de clonas en estas poblaciones.

En la figura 3 (y más ampliamente en el anexo B) se presenta la frecuencia de los individuos con genotipos dominantes en cada localidad. Se observa como el Canal fue dominado por un genotipo multilocus presente en 33/50 individuos (66 %), y la Isla dominada por dos genotipos multilocus en 24/50 y 23/50 individuos, 48 y 46 % respectivamente, siendo un dominio casi total de clonas en estos sitios. En cuanto a los demás sitios, ningún genotipo multilocus dominó en la población, teniendo un máximo de 5/50 individuos con el mismo genotipo para Cabo Pulmo (10 %), 5/47 para el Portugués (11 %) y 4/20 individuos compartiendo un genotipo para Loreto (20 %).



L: Loreto, P: Portugués, IS: Isla Espíritu Santo, C: Canal; CP: Cabo Pulmo

Figura 2 – Frecuencia de individuos con genotipos multilocus únicos (GU) y la frecuencia de las clonas en cada localidad.



L: Loreto, P: Portugués, IS: Isla Espíritu Santo, C: Canal; CP: Cabo Pulmo

Figura 3 – Frecuencia de los individuos con los dos principales genotipos dominantes (GD1/GD2) en cada localidad.

Cabo Pulmo presentó los valores más elevados de genotipos multilocus únicos ( $N_g=37$ ), seguido del Portugués (35). Los sitios con menor  $N_g$  fueron Loreto (16), el Canal (6) y la Isla (5) [Tabla II].

La proporción de riqueza genotípica ( $N_g/N$ ) fue mayor en las poblaciones de Loreto (0.80), Portugués y Cabo Pulmo (0.74 ambas), pero existe un efecto por tamaño de muestra que puede sobrestimar a Loreto ( $N=20$  contra  $N\approx 50$ ) sobre el resto. Por ello la riqueza genotípica observada ( $G_o$ ) muestra mejor como Cabo Pulmo ( $G_o=26$ ) tiene las mayores diversidades genéticas, seguida de el Portugués (25), Loreto (11), La Isla (2.26) y el Canal (2.12). Este dominio de genotipos diversos indica que el reclutamiento es favorecido por la

reproducción sexual en estas localidades. En contraste, los sitios del Canal y la Isla presentaron una proporción muy inferior ( $N_g/N < 0.12$ ;  $G_o < 3$ ) de riqueza genotípica y genotipos observados (Tabla II).

La diversidad genotípica observada ( $G_o$ ) fue menor a la esperada ( $G_e$ ) en todas las localidades; al comparar estos índices se observa que la contribución sexual o diversidad genotípica ( $G_o/G_e$ ) fue mayor en las poblaciones de Loreto, Portugués y Cabo Pulmo, por encima del 50% en cada localidad, y fue dominada por la reproducción asexual con menos del 0.05% de  $G_o/G_e$  en las localidades del Canal y la Isla. La equidad genotípica ( $G_o/N_g$ ) [Tabla II], fue mayor en las poblaciones donde no hubo dominio de un solo genotipo en la población, sino que fue equitativo, como fue Loreto (0.74), Portugués (0.73) y Cabo Pulmo (0.70). En cambio las poblaciones de la Isla (0.45) y más aun en el Canal (0.35) se observa cómo fueron dominadas por uno o dos genotipos presentes en la gran mayoría de los individuos (Fig.3). El promedio de diversidad genotípica ( $G_o/G_e=0.55$ ) y equidad genotípica ( $G_o/N_g=0.72$ ) de las poblaciones con mayor contribución sexual (Loreto, Cabo Pulmo y Portugués) indica que son poblaciones mayormente sexuales; en cambio el promedio de la Isla y el Canal,  $G_o/G_e=0.045$  y  $G_o/N_g=0.4$ , indican poblaciones muy asexuales (Baums *et al.*, 2006).

Tabla II – Diversidad genotípica en *P. verrucosa* para los cinco sitios de muestreo.

<b>Población</b>	$N$	$N_g$	$N_g/N$	$G_o$	$G_o/N_g$	$G_o/G_e$
Loreto	20	16	0.80	11.76	0.74	0.59
Portugués	47	35	0.74	25.39	0.73	0.54
Isla E.S.	50	5	0.10	2.26	0.45	0.05
Canal	50	6	0.12	2.12	0.35	0.04
Cabo Pulmo	50	37	0.74	26.04	0.70	0.52
promedio	43.40	19.80	0.50	13.51	0.68	0.31

$N$ , número de colonias genotipificadas;  $N_g$ , número de genotipos único;  $N_g/N$ , riqueza genotípica;  $G_o$ , riqueza genotípica observada;  $G_o/N_g$ , equidad genotípica (ponderado con genotipos multilocus únicos);  $G_o/G_e$ , diversidad genotípica (ponderado con el total de genotipos esperados).

### 7.1.1 Factores que influyen la estructura clonal

Las localidades más norteñas (Loreto y Portugués) tuvieron la menor frecuencia (3 huracanes) y categoría de huracán (1), seguida de Cabo Pulmo (5) donde alcanzó categorías del 1 al 4, y finalmente el Canal y la Isla tuvieron la máxima frecuencia (10) con categorías 1 y 4 (Tabla III).

Para la región sur de la península de Baja California la diversidad, riqueza y la equidad genotípica estuvieron negativamente correlacionados al número de huracanes en cada sitio (Fig.4). Esto significa que en los sitios donde hubo mayor cantidad de huracanes, como el Canal y La Isla, se presentaron los índices más bajos reflejando un dominio de la reproducción asexual, y menor equidad genotípica. Por otro lado, los sitios donde hubo

menores incidencias (Loreto, Portugués y Cabo Pulmo) se presentó un dominio de la reproducción sexual sobre la asexual.

Tabla III – Incidencia de huracanes en cada localidad entre 1940 y 2006.

	No. De Huracanes en la Zona	Categoría
Loreto	3	1
Portugués	3	1
Cabo Pulmo	5	1,2,3,4
Isla Espíritu Santo	10	1,4
Canal	10	1,4

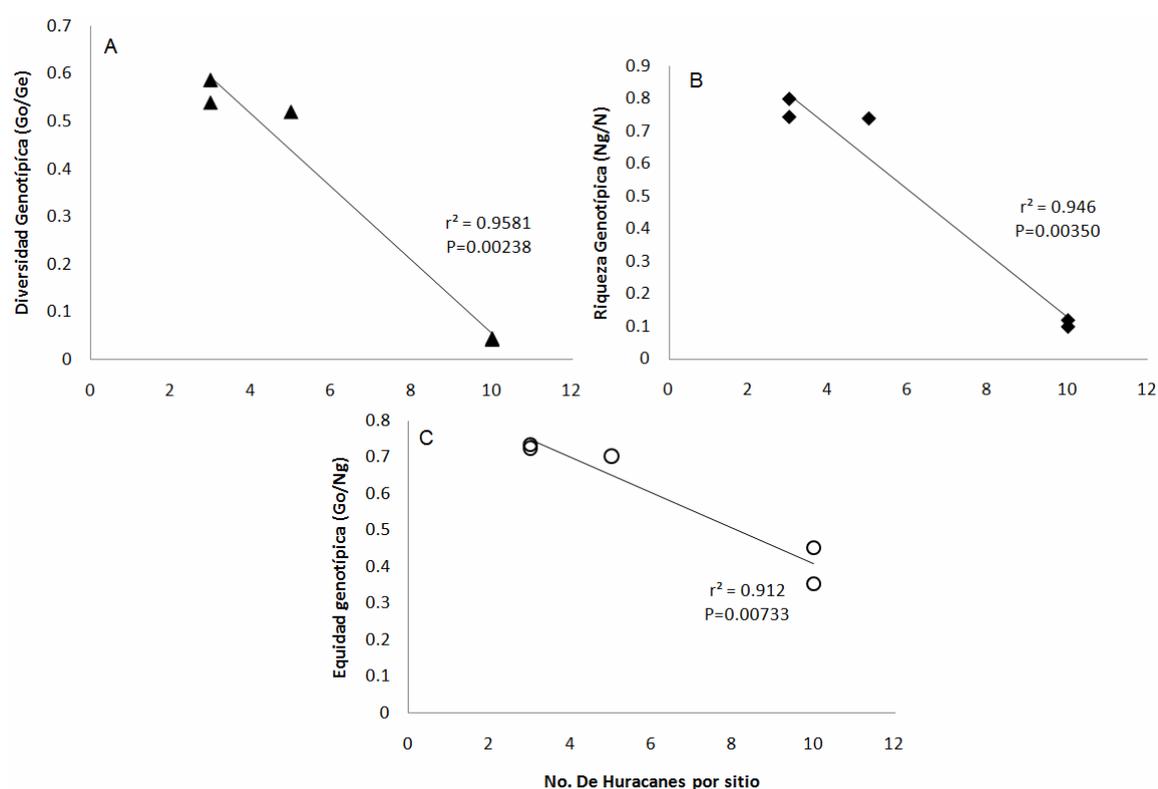
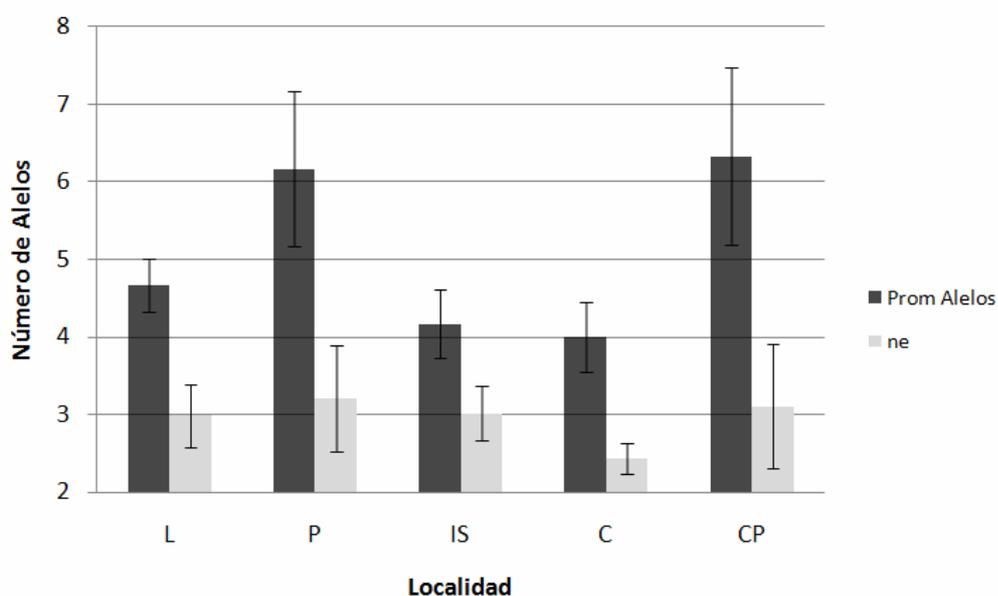


Figura 4 – Relación entre la incidencia de huracanes por sitio y (A) la diversidad genotípica ( $G_o/G_e$ ), (B) riqueza genotípica ( $N_g/N$ ) y (C) equidad genotípica ( $G_o/N_g$ ) en *P. verrucosa* en la península de Baja California. La mayor incidencia de huracanes de asocia a una mayor reproducción asexual y menor equidad genotípica.

## 7.2 Diversidad Genética

Los seis loci fueron polimórficos al criterio del 99%. Las poblaciones de *Pocillopora verrucosa* presentaron una diversidad alélica de 4 a 10 alelos, con un promedio general de 5.03 (EE±0.7) alelos (Tabla IV). Las poblaciones de mayor a menor variabilidad alélica fueron Cabo Pulmo (6.33; EE±1.1), el Portugués (6.17; EE±1), Loreto (4.67; EE±0.33), la Isla (4.17; EE±0.44) y el Canal (4.0; EE±0.44). En el caso de los alelos efectivos (ne) las localidades de mayor a menor variabilidad fueron: Portugués (3.21; ES±0.80), Cabo Pulmo (3.11; EE±0.69), Isla (3.02; EE±0.36), Loreto (2.99; EE±0.40) y el Canal (2.44; EE±0.20) [Fig.5].



L: Loreto, P: Portugués, IS: Isla Espiritu Santo, C: Canal; CP: Cabo Pulmo

Figura 5 – Promedio de alelos totales (prom A), y número de alelos efectivos (ne) para cada localidad de *P. verrucosa*.

Tabla IV - Diversidad genética en los seis loci para las cinco localidades de *P. verrucosa*.

Locus		L	P	IS	C	CP
	N	16	35	5	6	37
PV6	A	5	10	6	5	10
	ne	3.90	6.85	3.13	4.17	6.43
PV7	A	6	8	5	5	8
	ne	3.77	3.23	2.57	3.85	3.03
Pd3005	A	5	5	4	4	7
	ne	2.18	1.87	2.06	2.38	1.79
Pd3002	A	4	5	4	3	6
	ne	3.65	2.23	1.94	2.94	2.77
Pd3008	A	4	4	3	4	4
	ne	1.47	1.49	2.06	1.85	1.94
Pd2006	A	4	5	3	3	3
	ne	2.93	2.95	2.88	2.94	3.27
<b>Prom A (±EE)</b>		<b>4.67±0.33</b>	<b>6.17±1</b>	<b>4.17±0.44</b>	<b>4±0.44</b>	<b>6.33±1.14</b>
<b>Prom ne (±EE)</b>		<b>2.99±0.4</b>	<b>3.21±0.69</b>	<b>3.02±0.36</b>	<b>2.44±0.20</b>	<b>3.11±0.8</b>

Número de organismos analizados (N); número total de alelos por locus (A); número de alelos efectivos (ne); Error Estándar (EE)

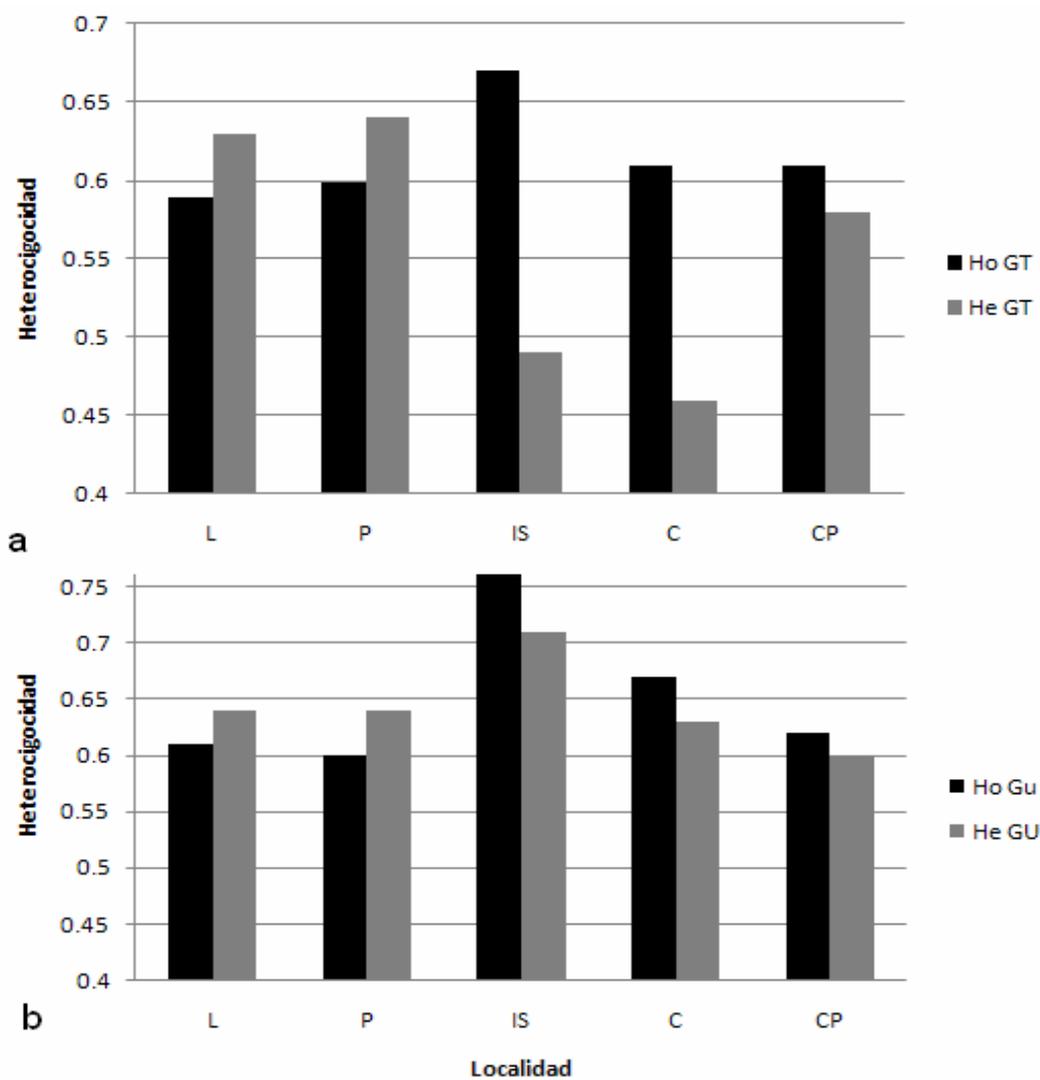
Las frecuencias alélicas para todos los loci se muestran en el anexo A, donde se comparan las frecuencias obtenidas de todos los individuos o los genotipos totales (GT) contra las frecuencias considerando solamente a los genotipos multilocus únicos (GU). En donde las poblaciones que mostraron mayor variación en sus frecuencias al pasar de GT a GU fueron la Isla (IS) y el Canal (C), siguiendo en menor grado Cabo Pulmo (CP), el Portugués (P) y Loreto (L). De manera general en ambas bases de datos, las poblaciones que presentaron mayor grado de similitud por locus entre sus frecuencias fueron P, L y CP. Por otro lado se puede observar la existencia de alelos privados dentro de algunas poblaciones, como es el caso de los alelos, 230(CP) y 244(C) en el locus PV7; el alelo 202(CP) en el locus Pd3005; el alelo 188 (CP) en el locus Pd3002; y el alelo 202 (P) en el

locus Pd2006. De aquí, que la población con más alelos privados fue Cabo Pulmo (3), seguido por el Portugués (1) y el Canal (1).

La heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) tanto para genotipos totales (GT) como únicos (GU) se presenta en la tabla V. En general se observa como las localidades más norteñas (L y P) presentaron déficits de heterocigotos y las sureñas (IS, C y CP) presentaron excesos en ambas bases de datos (Fig.6).

Para el caso de los genotipos totales (GT) el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se cumplió únicamente en Cabo Pulmo para los seis loci probados (6/6 loci;  $p=0.0083$ ), seguido de Loreto (5/6 loci,  $p=0.01$ ), el Portugués (3/6 loci,  $p=0.016$ ), el Canal (1/6 loci,  $p=0.05$ ) y en ningún locus en la Isla Espíritu Santo. Además, en los seis loci de cada localidad ocurrieron tanto déficits como excesos de heterocigotos (Tabla V), exceptuando Loreto que solo ocurrió un exceso significativo ( $p=0.01$ ).

Para evaluar si las muestras de supuesto origen sexual (empleando únicamente individuos con genotipos multilocus únicos) se ajustaban al modelo de EHW, se removieron los genotipos replicados de la base de datos de los genotipos totales y las proporciones genotípicas fueron re-analizadas. De manera congruente, el análisis de EHW con los genotipos multilocus únicos (GU), cumplió con las expectativas del EHW en todos los locus (Tabla V) menos en el locus Pd3002 para la población de Loreto ( $p=0.01$ ), donde se presentó un déficit de heterocigotos muy marcado (Tabla V).



L: Loreto, P: Portugués, IS: Isla Espiritu Santo, C: Canal; CP: Cabo Pulmo

Figura 6 – Heterocigocidad observada (Ho) y esperada (He) por localidad, tomando en cuenta todas las muestras o genotipos totales (GT) y con solo individuos de origen sexual o genotipos multilocus únicos (GU). Nótese el déficit de heterocigotos en las localidades de la IS y C analizando todas las muestras (GT) y como retorna al EHW analizando solamente con GU.

Tabla V –Heterocigosidad observada (Ho), esperada (He), y coeficiente de endogamia (F<sub>IS</sub>) para el total de individuos o genotipos totales (GT); y sin tomar en cuenta las clonas o solo genotipos multilocus únicos (GU) en las localidades de muestreo en *P. verrucosa*.

Total de Individuos (GT)						Sin Clonas (GU)							
Locus		L	P	IS	C	CP	Locus		L	P	IS	C	CP
		20	47	50	50	50			16	35	5	6	37
PV6	Ho	0.9	<b>0.7</b>	<b>1</b>	<b>0.32</b>	0.94	PV6	Ho	0.88	0.77	1	0.67	0.92
	He	0.77	<b>0.83</b>	<b>0.54</b>	<b>0.39</b>	0.86		He	0.77	0.86	0.84	0.74	0.87
	Fis	0.15	-0.1	0.19	-0.9	-0.2		Fis	-0.1	0.1	-0.21	0.11	-0.06
PV7	Ho	0.7	<b>0.77</b>	<b>1</b>	<b>0.9</b>	0.8	PV7	Ho	0.69	0.71	1	0.67	0.73
	He	0.72	<b>0.73</b>	<b>0.65</b>	<b>0.59</b>	0.69		He	0.76	0.68	0.82	0.67	0.7
	Fis	-0.1	-0.2	-0.5	-0.5	0.12		Fis	0.1	-0.05	-0.25	0	-0.04
Pd3005	Ho	0.55	0.49	<b>0.5</b>	<b>0.88</b>	0.42	Pd3005	Ho	0.69	0.43	0.6	0.5	0.51
	He	0.48	0.47	<b>0.63</b>	<b>0.59</b>	0.4		He	0.56	0.45	0.64	0.56	0.47
	Fis	0	-0.1	-0.5	0.21	-0.2		Fis	-0.2	0.04	0.08	0.12	-0.09
Pd3002	Ho	<b>0.25</b>	<b>0.51</b>	<b>0.52</b>	0.26	0.54	Pd3002	Ho	<b>0.31</b>	0.49	0.8	0.67	0.51
	He	<b>0.72</b>	<b>0.66</b>	<b>0.41</b>	0.24	0.55		He	<b>0.75</b>	0.65	0.73	0.53	0.56
	Fis	0.22	0.02	-0.1	-0.3	0.66		Fis	0.59	0.25	-0.1	-0.3	0.09
Pd3008	Ho	0.4	0.43	<b>0.04</b>	<b>0.3</b>	0.28	Pd3008	Ho	0.31	0.46	0.4	0.5	0.32
	He	0.38	0.47	<b>0.06</b>	<b>0.33</b>	0.29		He	0.33	0.49	0.51	0.56	0.33
	Fis	0.1	0.02	0.09	0.33	-0.1		Fis	0.06	0.07	0.24	0.12	0.03
Pd2006	Ho	0.75	0.72	<b>0.98</b>	<b>1</b>	0.7	Pd2006	Ho	0.75	0.74	0.8	1	0.7
	He	0.68	0.68	<b>0.64</b>	<b>0.6</b>	0.67		He	0.68	0.7	0.73	0.71	0.67
	Fis	-0.1	0	-0.7	-0.5	-0.1		Fis	-0.1	-0.06	-0.1	-0.46	-0.05
Prom Ho		0.59	0.6	0.67	0.61	0.61	Prom Ho		0.61	0.6	0.77	0.67	0.62
Prom He		0.63	0.64	0.49	0.46	0.58	Prom He		0.64	0.64	0.71	0.63	0.6
Prom Fis		0.06	-0.1	-0.3	-0.4	0.07	Prom Fis		0.06	0.06	-0.08	-0.07	-0.03

Negrillas-*itálicas*: diferencias significativas con respecto al Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) después de corrección a Bonferroni (P<0.05).

Analizando los genotipos totales (GT), la prueba de desequilibrio de ligamiento entre los distintos loci (Anexo E), resultó en 35 de 75 comparaciones significativas ( $p < 0.05$ , con corrección de Bonferroni) indicando que en todas las localidades los loci no se segregaron de manera independiente observándose alelos de diferentes loci ligados entre sí denotando la presencia de los genotipos repetidos de las clonas (Sección 7.1).

Por otro lado, analizando los genotipos multilocus únicos (eliminando el efecto de las clonas-reproducción asexual) no se presentó desequilibrio de ligamiento en ningún caso ( $p = 0.0033$  con corrección de Bonferroni).

El programa MICRO-CHECKER sugirió la presencia de alelos nulos solamente en el locus Pd3002 ( $p < 0.001$ ) para la población de Loreto y el Portugués, como resultado de un exceso de homocigotos para la mayoría de las clases de tamaño alélicas.

### 7.3. Estructura Genética

Cuando se incluyeron a todos los individuos (GT) en el análisis pareado de  $F_{ST}$ , se observó una estructura poblacional muy significativa, obteniendo un valor global  $F_{ST}$  de 0.108 ( $p < 0.001$ ).

Todos los valores pareados de  $F_{ST}$  fueron estadísticamente significativos (Tabla VI) aún después de la prueba secuencial de Bonferroni, observándose las menores diferencias genéticas entre Portugués y Loreto ( $F_{ST} = 0.01318$ ) y las mayores entre Canal de San Lorenzo e Isla Espiritu Santo ( $F_{ST} = 0.21889$ ). Lo anterior indica que las frecuencias alélicas entre las localidades son muy distintas, pudiendo deberse a una dispersión muy local (poco flujo genético) o diferencias en los modos de reproducción de cada sitio.

Tabla VI - Comparaciones pareadas de los valores de  $F_{ST}$  en las cinco localidades tomando en cuenta al total de individuos (GT).

	L	P	IS	C	CP
L		0.03752*	0*	0.0001*	0.01297*
P	<b>0.01318</b>		0*	0*	0.00634*
IS	<b>0.13044</b>	<b>0.12104</b>		0*	0*
C	<b>0.08534</b>	<b>0.13824</b>	<b>0.21889</b>		0*
CP	<b>0.01914</b>	<b>0.01308</b>	<b>0.12745</b>	<b>0.10436</b>	

La diagonal inferior izquierda muestra los valores de  $F_{ST}$  significativos en negritas y en la diagonal superior los valores de significancia (p). \*p =0.05; después de la corrección de Bonferroni

En el análisis considerando únicamente a los individuos de origen sexual o genotipos multilocus únicos por sitio (GU), se obtuvo un resultado muy contrastante, con un valor global  $F_{ST}$  de 0.0007 ( $p=0.42$ ) el cual no es significativo e indica que la subpoblaciones de *P. verrucosa* en la región están altamente conectadas entre sí (panmixia), compartiendo migrantes. Los valores pareados de  $F_{ST}$  no fueron estadísticamente significativos (Tabla VII), después de aplicar una prueba secuencial de Bonferroni ( $p<0.005$ ), demostrándose una elevada similitud y flujo genético entre las localidades. Las localidades con menor similitud genética fueron las más alejadas geográficamente, siendo Loreto y Cabo Pulmo ( $F_{ST} = 0.021$ ). Por tanto, la estructura genética detectada al considerar todos los genotipos, se debió principalmente a la elevada presencia local de “clonas” originadas por reproducción asexual.

La variación genética generada por los individuos de posible origen sexual ( $F_{ST}=0.0007$ ) con respecto al total ( $F_{ST}=0.108$ ) de las muestras fue obtenida dividiendo: ( $F_{ST}=0.0007 / F_{ST} 0.108$ )\*100, resultando ser el 0.65%, dejando ver la importancia de la

reproducción asexual (99.35%) como agente de variación genética entre las subpoblaciones.

Tabla VII - Comparaciones pareadas de los valores de  $F_{ST}$  en las cinco localidades tomando en cuenta únicamente individuos de posible origen sexual (GU).

	L	P	IS	C	CP
L		0.09682	0.74993	0.64994	0.01762
P	0.01054		0.96119	0.77279	0.39036
IS	-0.01668	-0.029		0.80566	0.70122
C	-0.0101	-0.01317	-0.02814		0.84645
CP	0.02113	0.00057	-0.01242	-0.01707	

La diagonal inferior izquierda muestra los valores de  $F_{ST}$ , que para esta prueba ninguno fue significativo, y en la diagonal superior los valores de significancia (p). \*p < 0.005 después de la corrección de Bonferroni.

La prueba de Mantel demostró en una escala de 12 a 344km que si existe una correlación significativa ( $p=0.006$ ) entre las matrices de las distancias genéticas y geográficas (Fig. 7), con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0.628. Un análisis eliminando la localidad de Loreto demostró que se mantiene significativa la correlación del aislamiento por distancia ( $R^2=0.708$ ,  $p=0.0465$ ).

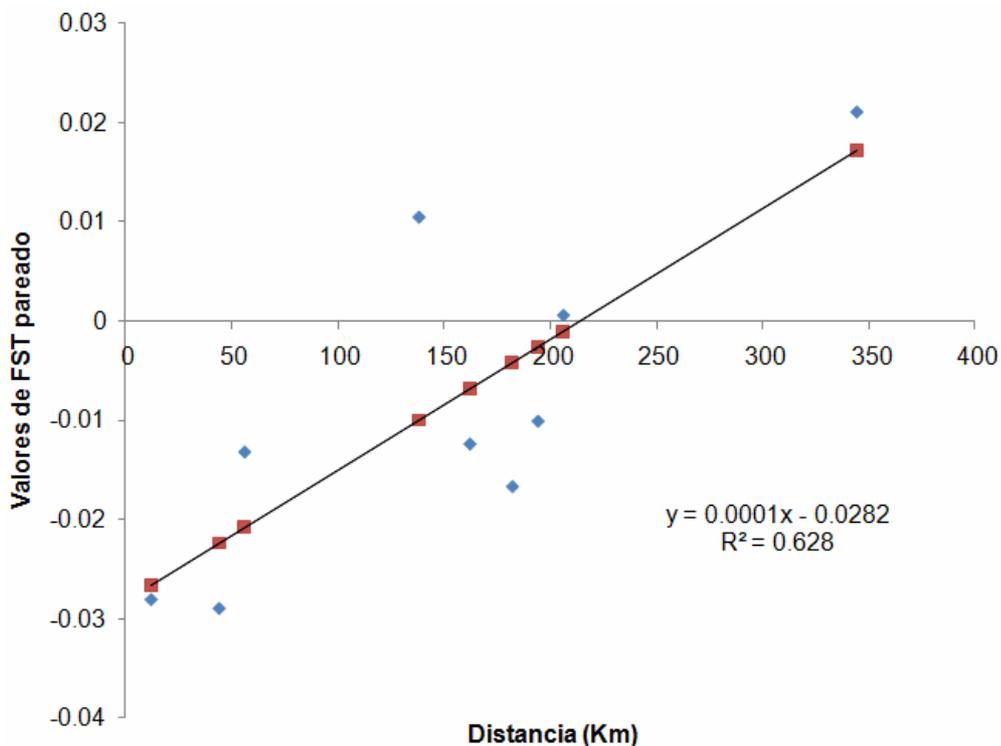


Figura 7 – Aislamiento por distancia para *P. verrucosa* entre las localidades (Prueba de Mantel) en la península de Baja California, donde 0 km representa Cabo Pulmo y  $\approx 344$  km representa Loreto, siendo significativa la correlación de distancias genéticas y geográficas entre localidades ( $p=0.006$ ).

El programa STRUCTURE coincidió con los resultados del análisis de estructura poblacional inferida por genotipos multilocus únicos, dando la mayor probabilidad de que todos los individuos pertenezcan a una sola población panmíctica ( $K=1$ ) [Fig. 8].

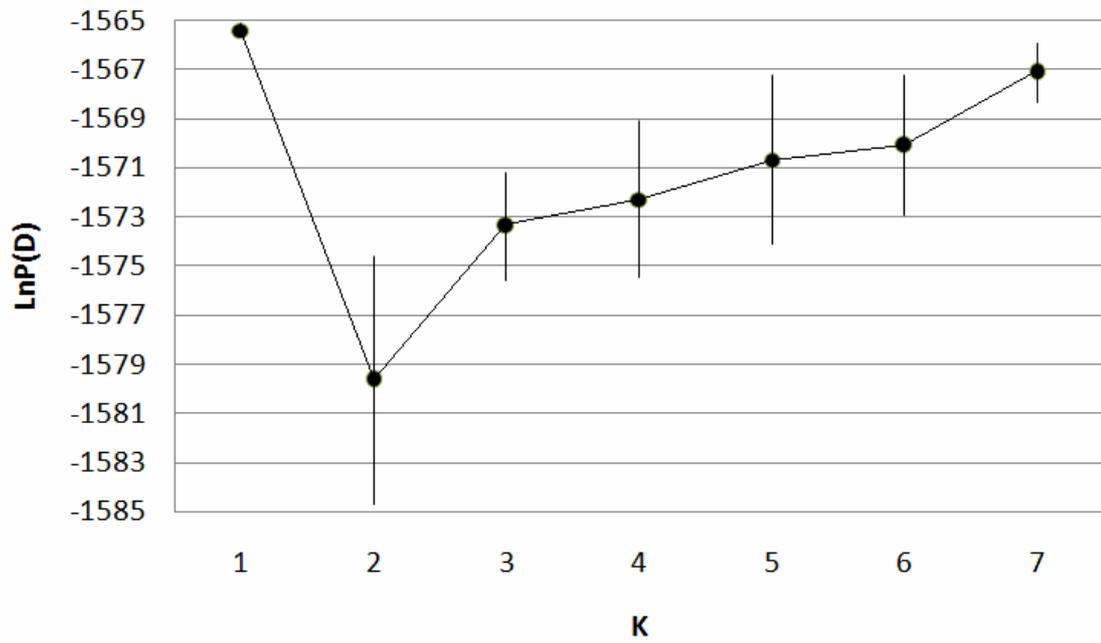


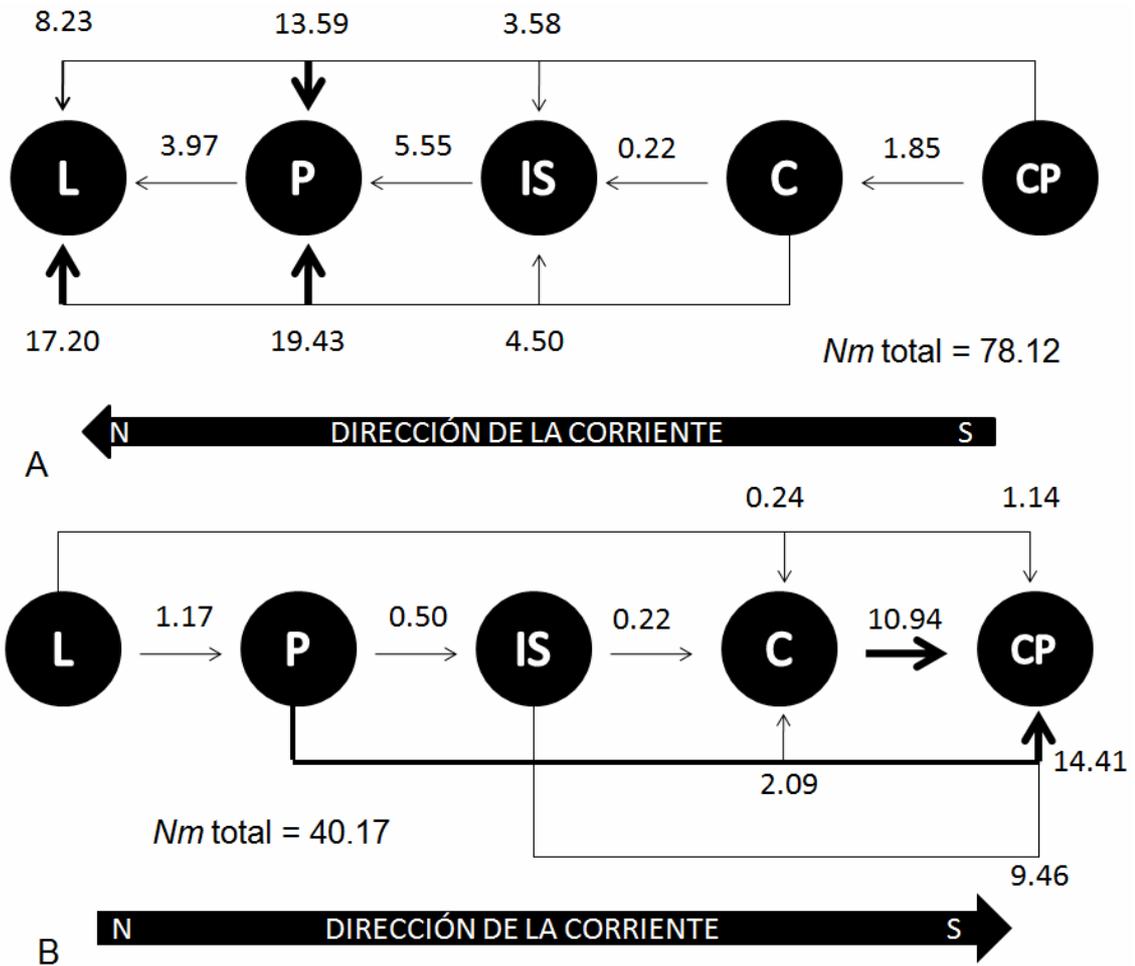
Figura 8 – Número de posibles poblaciones (K) de *P. verrucosa* inferidas por el cálculo de  $\ln P(D)$  por el programa STRUCTURE en las localidades muestreadas.

#### 7.4 Patrones de migración y tamaños efectivos poblacionales relativos

El valor máximo del tamaño efectivo poblacional relativo estimado ( $\theta$ ) fue para Cabo Pulmo (2.39), seguido del Portugués (1.77), Loreto (1.49), el Canal (0.089) y la Isla (0.752) [Tabla IX].

Los estimados del número de inmigrantes por generación calculados por MIGRATE 3.0.3 (figura 9) revelaron que la principal población fuente de inmigrantes fue el Canal de San Lorenzo ( $Nm=52.09$ ), seguido de Cabo Pulmo (27.26), el Portugués (20.98), La isla Espíritu Santo (15.18) y por último Loreto (2.55). Las localidades que recibieron más inmigrantes fueron el Portugués ( $Nm=39.71$ ), Cabo Pulmo (35.95), Loreto (29.42), La Isla Espíritu Santo (8.57) y por último el Canal (4.41).

En cuanto a la dirección del flujo de inmigrantes, se observó migración tanto dirección Norte→Sur, como Sur→Norte (Fig.9), y la cual fue asimétrica entre todas las poblaciones. Se presentó una tendencia de magnitud de inmigrantes donde hubo mayor número en dirección Norte, época de verano, ( $Nm= 78.12$ ) comparándolo con la dirección sur, época de invierno ( $Nm=40.17$ ); pero no se presentaron diferencias estadísticas ( $p=0.1779$ ). Se presentaron diferencias significativas entre el flujo total de inmigrantes producido por sitio [Kruskal Wallis:  $H(4, N= 20)= 9.514286$   $p=0.0495$ ] donde únicamente fueron diferentes L, C ( $p= 0.0209$ ) y L, CP ( $p= 0.0209$ ) las poblaciones más alejadas geográficamente.



$Nm$ =flujo de inmigrantes por generación se calculó como  $Nm=M\theta/4$ ; L=Loreto; C=Canal de San Lorenzo; IS= Isla Espiritu Santo; P= Portugués; CP= Cabo Pulmo.

Figura 9 - Estimado del flujo de inmigrantes por MIGRATE 3.0.3. de acuerdo con el patrón de corrientes dominante en la temporada de verano (A), con  $Nm= 78$  y de invierno (B) con  $Nm= 40.17$ . Las flechas gruesas representan un  $Nm>10$  migrantes por generación.

## 8. Discusión

### 8.1. Tipo de reproducción asexual vs sexual (diversidad genotípica)

Los resultados indican que las poblaciones de *Pocillopora verrucosa* en las localidades de muestreo de la península de Baja California tienen un modo mixto de reproducción (sexual y asexual), pero existe variación en las contribuciones relativas en cada una de las localidades muestreadas. De los 217 organismos estudiados, solo el 45% (99 organismos) fueron de origen sexual, siendo los sitios con mayor reclutamiento por reproducción sexual Loreto (70%), Cabo Pulmo (68%) y el Portugués (60%) [Fig.2]. Estas localidades son consideradas en la escala que emplea Baums *et al.* (2006) como “poblaciones mayormente sexuales”, promediando  $G_o/G_e=0.55$  y  $G_o/N_g=0.72$ , y además con una riqueza genotípica ( $N_g/N$ ) de 0.76, lo que apoya un mayor reclutamiento sexual. Sin embargo en estas tres localidades, siempre estuvieron presentes genotipos multilocus replicados, compartidos entre 2-5 individuos dentro de cada población lo que indica una contribución asexual clonal en las mismas. Los resultados de riqueza genotípica presentados en el estudio fueron ligeramente menores en comparación de las poblaciones africanas de *P.verrucosa*, donde el rango de  $N_g/N$  en todos los sitios fue entre 0.83 y 0.94, donde ningún genotipo fue representado por más de dos colonias (Ridgway *et al.*, 2008). Esto indica que las condiciones ambientales que imperan en cada estudio son diferentes, favoreciendo la clonalidad en el GC por factores como huracanes.

El mayor reclutamiento asexual fue en las localidades de el Canal de San Lorenzo (96%) y la Isla Espíritu Santo (94%), ya que estas fueron dominadas por uno o dos genotipos multilocus, con niveles de diversidad y equidad genotípica muy bajos,

promediando  $G_o/G_e=0.045$  y  $G_o/N_g=0.4$ , las cuales resultaron ser poblaciones “muy asexuales” en base a la clasificación de Baum *et al.* (2006) y, además apoyado por una riqueza genotípica promedio de 0.11. Estos valores de diversidad genotípica se pueden comparar con los de otras especies muy clonales, presuntamente producto de la fragmentación, como es *Pavona cactus* ( $G_o/G_e=0.02 - 0.14$ ; Ayre y Willis, 1988); en especies ramificadas desovadoras propensas a la fragmentación como son *Acropora valida* ( $G_o/G_e=0.20$ ; Ayre y Hughes, 2000), *A. millepora* ( $G_o/G_e=0.17$ ; Ayre y Hughes, 2000) y *A. palmata* (las poblaciones más asexuales con  $G_o/G_e=0.03 - 0.14$  y  $G_o/N_g=0.48 - 0.53$ ; Baums *et al.*, 2006). Nuestros valores de diversidad fueron aun más bajos que los previamente reportados en la especie hermana anidadora *P. damicornis* ( $G_o/G_e=0.30$ ) derivados de la fragmentación por acción de tormentas (Adjeroud y Tsuchiya, 1999). Además, también fueron inferiores comparados con las poblaciones australianas de *P. damicornis* formadoras de larvas plánulas clonales o ameioticas ( $G_o/G_e=0.72$ ,  $G_o/N_g=0.825$ ; Ayre y Miller, 2004) e inclusive con poblaciones que habitan en el extremo de su distribución, como en la aislada Isla Lord Howe ( $G_o/G_e=0.55$ ,  $G_o/N_g=0.68$ ; Miller y Ayre, 2004). Únicamente en Australia Occidental se presentaron valores en dos sitios de un total de ocho analizados, por debajo del nuestro ( $G_o/G_e=0.07$ ,  $G_o/N_g=0.17$ ; Whitaker, 2006), derivados de una combinación de fragmentos y mayormente larvas plánulas ameioticas.

Ningún genotipo se compartió entre localidades, por lo que cada sitio tiene sus genotipos multilocus únicos. Este es el primer indicio que los reclutas asexuales no son producto de larvas plánulas asexuales (ameioticas) de otras localidades (Stoddart, 1983; Ayre y Miller, 2004). Más aun, en un estudio por Glynn *et al.* (1991) en Costa Rica,

Panamá y las Islas Galápagos, y por Chávez-Romo y Reyes-Bonilla (2007) dentro del Golfo de California, observaron que las poblaciones de pocilopóridos son hermafroditas con desarrollo simultáneo de gametos femeninos y masculinos, sin señales de producción interna de larvas. Entonces nuestros resultados indican que los genotipos multilocus únicos son producto del reclutamiento sexual vía liberación de gametos al medio, y los individuos clones producto de la fragmentación. Por otro lado, en especies de escleractinios, con reproducción asexual vía fragmentos, el impacto a la diversidad genotípica ( $G_o/G_e$ ) es mucho mayor en las poblaciones locales, con valores tan bajos como 0.02 y 0.20 (Ayre y Willis 1988; Ayre y Hughes, 2000; Baums *et al.*, 2006), y afectando también a otras especies como las poblaciones de corales blandos como *Plexaura kuna* ( $G_o/G_e=0.03$ ; Coffroth y Lasker, 1998). Por tanto los valores que observamos para *P. verrucosa* en el Canal (0.04) y en la Isla Espíritu Santo (0.05) se ajustan a una reproducción asexual por fragmentación.

La propagación clonal es mediada generalmente por la interacción entre el modo de reproducción y el ambiente. Los factores que pueden influenciar estos patrones se atribuyen mayormente a disturbios (Hunter, 1993; Coffroth y Lasker 1998; Lirman, 2000; Baums *et al.*, 2006; Foster *et al.*, 2007). Entre estos, los más importantes que se mencionan son la energía del oleaje producido por tormentas y los huracanes, ambos impactando en el Golfo de California. La temporada oficial de huracanes inicia el 15 de mayo y termina el 30 de noviembre. De acuerdo al registro de la NOAA (<http://hurricane.csc.noaa.gov/hurricanes/>), los lugares del estudio donde han sido más frecuentes los huracanes son la Bahía de la Paz a nivel del Canal de San Lorenzo y la Isla Espíritu Santo, seguido de Cabo Pulmo, el

Portugués y por último Loreto. Los resultados indican que existe una relación negativa entre la frecuencia de huracanes con la riqueza, diversidad y equidad genotípica de los sitios, donde las más impactadas son las que mayor clonalidad (menor diversidad y riqueza) presentaron (Fig.4 A, B y C). La equidad genotípica también disminuyó, pero en menor grado a lo observado en los otros dos índices; esto quizá se relacione con las altas mortalidades de fragmentos reportadas por Lirman (2000), donde no todos serán reclutados a la población; y con el amortiguamiento que proporcionan los mayores tamaños de las colonias a disturbios fuertes, como lo señala Coffroth y Lasker (1998). Nuestros datos apoyan la hipótesis de Coffroth y Lasker (1998), respecto a que los lugares con niveles intermedios de disturbio presentan los mayores picos de propagación asexual (en este caso fragmentación) en especies ramificadas. Con esto se refiere a un episodio de disturbio fuerte, como podrían ser los huracanes, que parten y fragmentan a las colonias de *P. verrucosa*, seguido de un periodo de calma, permitiendo a los fragmentos adherirse al sustrato y aumentar su sobrevivencia. Además, al aumentar la energía de los disturbios (p.e. huracán=muy alta energía) la tasa de mortalidad de los reclutas sexuales es mayor (Coffroth y Lasker, 1998), reflejada en bajas diversidades genotípicas locales, quedando solo las colonias más grandes y longevas (o mayor equidad  $G_o/N_g$ ) que pueden soportar el disturbio y a su vez son fragmentadas, esta combinación conlleva a una baja diversidad genotípica con colonias clones longevas y de gran tamaño. Esto podría concordar con los sitios del Canal de San Lorenzo y la Isla Espíritu Santo, donde genéticamente las colonias representaban uno o dos individuos dominantes y sus tamaños en general fueron de colonias grandes-adultas, sobre todo en el Canal (talla promedio=  $0.35m^2$ ). Por otro lado,

en lugares con disturbios menores se esperan altas sobrevivencias de fragmentos o clones así como de reclutas sexuales, conllevando una acumulación de genotipos y aumentando su riqueza (Coffroth y Lasker, 1998). Esto se pudo reflejar en los sitios con dominio sexual de Cabo Pulmo, Portugués y Loreto.

Como se mencionó anteriormente, el Canal de San Lorenzo sufrió una destrucción masiva de corales por parte del buque petrolero “Lázaro Cárdenas II”. La restauración consistió en el cementado de fragmentos de coral cuyo origen genético se desconocía, por lo que cabría la posibilidad de cementar él mismo individuo varias veces, restaurando a partir de muy pocos individuos. Esto causaría un cuello de botella demográfico/genético y el resultado sería una pérdida en la variabilidad genética de la subpoblación (Nei *et al.*, 1975). Precisamente, el Canal fue el sitio con menor variabilidad alélica y genotípica del estudio, sugiriendo señales del efecto de cuello de botella. Pero al comparar este sitio con la Isla Espíritu Santo ( $G_o/G_e = 0.04$  Canal vs  $0.05$  Isla respectivamente), lugar donde no hay ningún disturbio antropogénico reportado, se observó que estas altas frecuencias de clonalidad suceden de manera natural en las subpoblaciones, hecho que podría estar ocurriendo de igual manera en el Canal de San Lorenzo. Por lo que los fragmentos cementados podrían venir de un solo genotipo, debido a esta clonalidad natural del área, y el esfuerzo de restauración del área no afectará negativamente a la subpoblación. Además, la zona del Canal presenta una pendiente somera lo que permite una mayor retención de los fragmentos y sobrevivencia, aumentando así la clonalidad y disminuyendo la diversidad genotípica. Por otro lado, el transporte de los fragmentos fuera del parche de corales por fuerzas como tormentas o huracanes puede ser un mecanismo para crear espacio primario y

lograr la expansión del arrecife (Highsmith, 1982; Lirmann, 2000), esto significa que los escombros producidos por el buque petrolero servirán de sustrato para aumentar la sobrevivencia de fragmentos en huracanes subsecuentes.

Otro disturbio importante registrado en la zona es el blanqueamiento y su efecto en la muerte de las colonias. En la península se han registrado episodios cada vez más frecuente de blanqueamiento de coral, reportándose mortalidades del 10% de la cobertura en pocilopóridos localizados en Cabo Pulmo durante el Niño de 1987 (Reyes-Bonilla, 1993); mortalidades del 18% durante los años 1997-1999, incluyendo eventos de Niño y anti-El Niño, siendo los pocilopóridos los más afectados (Reyes-Bonilla, 2001; Reyes-Bonilla *et al.*, 2002); mortalidades del 30% en el GC después del Niño de 1997-1998 en pocilopóridos (Iglesias-Prieto *et al.*, 2003), y también reportes de blanqueamientos sin mortalidades registradas en el 2006 dentro del GC en épocas de primavera (LaJeunesse *et al.*, 2007). El efecto del blanqueamiento del coral no fue cuantificado sobre la estructura genética de las poblaciones en el presente estudio, pero se sabe por otros estudios que la puede afectar a dos niveles (Coffroth y Lasker, 1998; Edmunds *et al.*, 2003 Sherman *et al.*, 2006 ; Underwood *et al.*, 2007). El primero a nivel evolutivo, demostrado por Edmunds *et al.* (2003) donde observó en el escleractinio *Montastraea franksi* una susceptibilidad diferencial al blanqueamiento, seleccionando solo aquellos genotipos capaces de soportar el cambio climático. El segundo es el cambio a nivel ecológico al recuperarse la población del blanqueamiento, y que puede detectarse como un cambio inmediato en las frecuencias alélicas/genotípicas de la subpoblación. Sherman *et al.* (2006) analizaron poblaciones de *P. damicornis* por medio de alozimas en localidades de la Gran Barrera de Coral Australiana

después del blanqueamiento de 1998, y compararon la variabilidad genética en un estudio realizado previamente en el mismo sitio (Benzie *et al.*, 1995), observando una disminución en la diversidad y riqueza genotípica, mencionando que la población post-blanqueamiento fue producto de la recolonización de las larvas plánulas asexuales, y un subsecuente reclutamiento de larvas de otros sitios que permitió incrementar la diversidad genotípica. En la región del Golfo de California, específicamente en pocilopóridos no hay indicios de la producción de larvas asexuales ameióticas (Chávez-Romo *et al.*, 1997; Glynn *et al.*, 1991), sino puramente sexuales. Entonces lo que se esperaría en esta región es que las zonas que presentaran altas mortalidades de manera local por el blanqueamiento fueran recuperadas por larvas sexuales de zonas vecinas. Loreto fue un ejemplo de lo anterior, ya que se encontraron grandes cabezas de coral blanqueado y epifitado en algunas zonas (*Observación personal*, 2009), junto con colonias aisladas y de tamaños muy reducidos (tallas promedio de 0.046 m<sup>2</sup>), lo que probablemente no fomente la reproducción por fragmentación, y sean en su mayoría producto del reclutamiento sexual. Esto explicaría por qué Loreto resultó tener una alta diversidad genética aún con tamaños de muestras bajos (N=20) y colonias de tamaños reducidos, resultado de la alta conectividad regional que se observó en el presente estudio (ver sección 7.3.). Lo anterior fue similar a lo observado en el pocilopórido *Seriatopora hystrix* por Underwood *et al.* (2007), donde demostraron que después de un evento de blanqueamiento con muy altas tasas de mortalidad, el sitio que no fue afectado produjo la mayor cantidad de migrantes hacia los sitios afectados, patrón que muy seguramente se repita para las poblaciones del Golfo de California.

## 8.2 Diversidad genética

La diversidad genética que se presentó en la región de la península de Baja California para *P. verrucosa* fue de 5.07 alelos (A) promedio y una heterocigosidad esperada (He) promedio de 0.644, siendo similar a la encontrada para la misma especie y por el mismo tipo de marcadores moleculares en Sudáfrica Nororiental (A = 5, He = 0.492; Ridgway *et al.*, 2008). De hecho, la He fue superior en Baja California debido a un mayor déficit de heterocigotos en las poblaciones africanas. Lo interesante es que ambas zonas se localizan en el límite de distribución de *P. verrucosa* para cada hemisferio, situándose ambas en altas latitudes, siendo los arrecifes más meridionales de África (Ridgway *et al.*, 2008) y de los más septentrionales del Pacífico Oriental (Brusca y Thomson, 1975), por lo que se espera que estos arrecifes estén empobrecidos genéticamente y aislados del resto de las poblaciones (Ayre y Hughes, 2004). En el Pacífico Mexicano (PM) usando alozimas, se ha demostrado que las poblaciones en el Golfo de California de *Pocillopora damicornis* (Chávez-Romo *et al.*, 2008), *Porites panamensis* (Paz-García *et al.*, 2009) y *Pavona gigantea* (Saavedra-Sotelo *et al.*, 2007), se encuentran genéticamente aisladas del resto, y con una diversidad genética menor comparada a las poblaciones más sureñas del PM. Para este estudio no se encontró un patrón claro de gradiente genético latitudinal, pero si se puede mencionar que la subpoblación más sureña (CP) fue la que mayor diversidad alélica (Fig. 5), número de genotipos multilocus únicos observados y mayor diversidad genotípica (Tabla II) por sitio presentó.

En otros estudios con especies desovadoras en regiones más tropicales como la Polinesia, empleando los mismos microsatélites en la especie *P. meandrina* (Magalon *et al.*, 2005), se encontraron diversidades genéticas mayores ( $A = 10.5$ ,  $He = 0.7322$ ) a comparación de los estudios en zonas templadas (este estudio en GC y en Sudáfrica, Ridgway *et al.*, 2008). También se observa la misma tendencia en especies del Caribe en la especie *Acropora palmata* ( $A = 12.93$ ,  $He = 0.503$ ) [Baums *et al.*, 2005]. Inclusive en las especies anidadoras tropicales se presentó una mayor diversidad genética, donde *P. damicornis* (Souter *et al.*, 2009), especie anidadora en las costas de Kenya y Tanzania, presentó mayor diversidad genética ( $A = 7.5$ ,  $He = 0.69$ ); por otro lado la especie *Seriatopora hystrix*, otro pocilóporo tropical anidador ubicado en los Arrecifes Scott, Australia, presentó ligeramente mayor diversidad alélica ( $A = 5.79$ ) semejantes a las poblaciones de altas latitudes como *P. verrucosa* ( $A = 5.07$  en este estudio), pero con heterocigosidades menores ( $He = 0.421$ ) [Underwood *et al.*, 2006]. Estas diversidades no tan altas en especies anidadoras se deben a que el reclutamiento de sus larvas es más local por el tiempo tan corto que transcurren en la columna de agua (Harrison y Wallace 1990). Esto genera una baja variabilidad genética adjudicado a una elevada endogamia (Ayre y Hughes, 2000; Underwood *et al.*, 2007; Souter *et al.*, 2009).

Cuando se tomaron en cuenta a todos los individuos (genotipos totales) en el análisis de variabilidad genética, se presentaron déficits y excesos de heterocigotos en todos los loci ( $p < 0.05$ ) y en casi todas las localidades, con excepción de Cabo Pulmo, que mantuvo el equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) en todos los loci. En contraste, al considerar para el análisis únicamente a los individuos con posible origen sexual

(Genotipos multilocus únicos), solamente el locus *Pd 3002* en la localidad de Loreto se desvió significativamente del EHW presentando un marcado déficit de heterocigotos ( $p < 0.01$ ; Tabla V) lo cual se discute más adelante.

El mayor ajuste al EHW se debe principalmente al eliminar el efecto de la reproducción asexual, la cual no es asumida por el modelo. Previamente, se ha observado en corales que la reproducción por fragmentación es responsable de que en determinadas localidades se presenten excesos o déficits de heterocigotos (Ayre y Willis, 1988; Adjeroud y Tsuchiya, 1999; Ayre y Hughes, 2000; Whitaker *et al.*, 2006; Miller y Ayre, 2004). En el presente estudio, los casos más extremos fueron en el Canal de San Lorenzo y la Isla Espíritu Santo, las cuales fueron poblaciones mantenidas en su mayoría por reproducción asexual.

Los déficits en los heterocigotos son una característica común de las poblaciones coralinas (Ayre y Willis, 1988; Adjeroud y Tsuchiya, 1999; Ayre y Hughes, 2000; Whitaker *et al.*, 2006; Miller y Ayre, 2004; Baums *et al.*, 2006; Underwood *et al.*, 2006; Chávez-Romo *et al.*, 2008; Paz-García *et al.*, 2008; Ridgway *et al.*, 2008; Souter *et al.*, 2009) como lo fue en Loreto para nuestro estudio, pero no siempre se puede saber con claridad los mecanismos que los conllevan (Ridgway *et al.*, 2008). Además de la reproducción asexual, existen otras posibles explicaciones para el déficit de heterocigotos. Por un efecto fundador cuya principal consecuencia de su reducido tamaño poblacional es la endogamia (Templeton, 1980), lo cual explicaría el único déficit de heterocigotos en el estudio (ver Tabla V). Otra explicación apoyada por Souter *et al.* (2009) es el efecto de la variabilidad en las tasas y fuentes reclutamiento o efecto Wahlund en la subpoblación

(Johnson y Black, 1984); en donde distintos eventos fundadores provenientes de distintas poblaciones sureñas tendrán sobrevivencias diferenciales causando un déficit de heterocigotos en los loci de la subpoblación (Nei *et al.*, 1975; Allendorf, 1986; Lesica y Allendorf, 1995). Otra posibilidad es un efecto de cuello de botella, donde la población residente en Loreto históricamente sufrió grandes mortalidades por efecto del blanqueamiento (*Observación personal*, 2009), disminuyendo el tamaño efectivo poblacional, subsecuente pérdida de variabilidad por deriva genética, reflejando el déficit tan marcado de heterocigotos (Sherman *et al.*, 2006); que la selección en contra de los migrantes puede limitar el flujo genético, aun cuando la dispersión sea alta (Schmidt y Rand, 2001). Por último, es importante mencionar que también podría haber un efecto de alelos nulos en la población de Loreto. Este efecto es posible debido a mutaciones en la zona de empalme del ADN con el oligo del microsatélite, creando homocigotos falsos (Shaw *et al.*, 1999). Su efecto fue nulo para el Portugués debido a que cuando se quitó el efecto de la clonación este alcanzó el EHW.

### 8.3. Estructura genética

La mayoría de los estudios en corales que analizan la estructura poblacional en especies clonales no remueven los genotipos multilocus replicados de sus bases de datos (Ayre y Willis, 1988; Adjeroud y Tsuchiya, 1999; Ayre y Miller, 2004; Ridgway *et al.*, 2001; Chávez-Romo *et al.*, 2008; Paz-García *et al.*, 2008; Souter *et al.*, 2009). Esto conlleva a sesgos en la sobreestimación de las medidas de diferenciación genética en base a estimadores tipo  $F_{ST}$  (Baums *et al.*, 2005; Whitaker *et al.*, 2006). Por tanto, como se

observó en el presente estudio, si no se interpretan estos análisis con cautela pueden indicar resultados muy contradictorios al no considerar el tipo de reproducción imperante y no hacer distinción entre las distintas bases de datos. El análisis de las dos bases de datos (genotipos totales y genotipos únicos) permitió vislumbrar la importancia intra e inter-poblacional de las distintas estrategias de reproducción que presenta *P. verrucosa* en la región, como es la reproducción sexual mediante la liberación de gametos (Glynn *et al.*, 1991) y la asexual por fragmentación (Reyes-Bonilla, 2003).

Al analizar todos los individuos resultó que la estructura poblacional fue muy significativa entre todas las poblaciones ( $F_{ST}= 0.108$ ;  $p=0.0000$ ), y además ningún genotipo se compartió entre las localidades. Este resultado *per se* indicaría que se tienen cinco poblaciones genéticamente divergentes, pudiendo deberse a un flujo genético muy limitado entre las mismas e indicando un reclutamiento muy local, generando endogamia y fijación de alelos; y/o a diferentes tipos de estrategias reproductivas dominantes en las poblaciones (Chávez-Romo y Reyes-Bonilla, 2007; Chávez-Romo *et al.*, 2009). La mayoría de las poblaciones presentaron desviaciones del EHW, esto deja una huella genética en donde se obtienen tanto déficits como excesos de heterocigotos (Willis y Ayre, 1985). Por otro lado, Cabo Pulmo fue la única población con los genotipos totales en EHW, indicando que en este sitio la reproducción es principalmente sexual, y se encuentra en panmixia, explicándose además porque se observó la mayor riqueza genotípica ( $N_g=37$ ) y alélica ( $A = 6.33$ ).

Al remover las clonas del análisis ocurrió un resultado inverso, dejó de existir estructura poblacional ( $F_{ST}=0.0007$ ;  $p=0.42$ ), lo cual indica que existe una sola población

genética de *P. verrucosa* para la región del Golfo de California (GC). Esta inversión en los resultados no fue encontrada en otros estudios que también removieron los genotipos multilocus repetidos del análisis (Whitaker *et al.*, 2006; Baums *et al.*, 2005; Ridgway *et al.*, 2008), lo que indica que existen grandes diferencias en las contribuciones de la reproducción sexual/asexual en cada subpoblación, pero todos los sitios están conectados genéticamente por la dispersión de larvas producidas por reproducción sexual. Este resultado también es apoyado por el hecho que ningún genotipo multilocus único fue repetido entre sitios y que solo el 0.06% de la diferencia genética total (ver sección 7.3) es adjudicada a individuos de origen sexual, el resto es debido a la reproducción asexual y a las frecuencias alélicas que genera. Existen casos donde la variación causada por organismos de origen sexual puede ser mayor, Whitaker (2006) empleando alozimas encontró en Australia para *P. damicornis* que el 50% ( $F_{ST} = 0.360_{GT} / 0.175_{GU} = 0.48 \approx 50\%$ ) de la variación total  $F_{ST}$  (GT) fue debido a diferencias entre individuos de origen sexual (GU), observando una fuerte estructura genética a escalas de aproximadamente 800km. Para el caso de la región del Golfo de California, *P. verrucosa* aún con elevada reproducción asexual en ciertas localidades, tuvo mayor grado de conectividad genética a escalas menores (350km).

La falta de estructura propuesta por los estadísticos  $F$  ( $F_{ST}$  de 0.0007;  $p=0.42$ ) fue confirmada por el programa STRUCTURE, el cual mediante el asignamiento de los genotipos multilocus por métodos bayesianos a  $k$  poblaciones, indicó una sola población ( $K=1$ , Pritchard *et al.*, 2000). Esta misma estructura fue encontrada para seis poblaciones de *P. verrucosa* ( $\approx 140$ km) en Sudáfrica empleando alozimas (Ridgway *et al.*, 2001) pero

sin hacer diferencia entre genotipos totales y únicos debido a que no encontraron sitios dominados por reproducción asexual (clonas), y sus déficits de heterocigotos reflejaron endogamia. Por otra parte, Ridgway *et al.* (2008) empleando microsátélites, en la misma especie y ampliando la región a 850km, encontraron diferencias significativas entre los arrecifes de Sudáfrica y Mozambique  $F_{ST} = 0.054$  ( $p < 0.05$ ). De igual manera compararon los resultados obtenidos entre su base con genotipos totales ( $n=115$ ) y sin clonas ( $n=101$ ), sin tener diferencias significativas. Esto indica que las subpoblaciones de *P.verrucosa* en la región del GC tienen más inclinación a la reproducción asexual por clonación, por estar sujetos a factores como huracanes y tormentas tropicales (ver sección 8.2).

Por otra parte, ambos valores ( $F_{ST} = 0.022$  y  $0.054$ ) reportados en arrecifes sudafricanos fueron muy superiores al nuestro ( $F_{ST} = 0.0007$ ), y es explicado porque las poblaciones del GC se encuentran en panmixia. En cambio las poblaciones sudafricanas si presentaron mayor divergencia en sus frecuencias causadas por fuertes desviaciones del EHW en sus subpoblaciones (24 de 28 comparaciones), presentando únicamente déficits de heterocigotos, siendo consecuencia de la endogamia ya sea por autogamia o por dispersión restringida de gametos o larvas dentro de las poblaciones, o también por un efecto Wahlund.

El modelo de aislamiento por distancia demostró que mientras más geográficamente alejada esté la población ocurrirá una mayor divergencia genética. Por medio de la distancia se pudo explicar el 62% ( $r^2=0.628$ ;  $p < 0.05$ ) de la variancia de los estimados del flujo genético entre las poblaciones (con un rango de 12 a 344km) a partir de las comparaciones pareadas de los  $F_{ST}$  (Fig.7), donde el nivel de flujo genético será inversamente proporcional

a los índices de fijación ( $F_{ST}$ ) [Bohonak, 1999]. Este patrón es usualmente modelado como un patrón “paso a paso” en inglés denominado *stepping-stone* (Hellberg, 1995; Ayre y Hughes, 2000; Baums *et al.*, 2005; Magalon *et al.*, 2005; Rose *et al.*, 2006), en donde la migración ocurre solo entre subpoblaciones vecinas (Kimura y Weiss, 1964). Este no fue el caso de un verdadero modelo “paso a paso” debido a que la pendiente de la regresión debe obtener valores específicos que demuestren mayor flujo entre poblaciones vecinas (pendiente = -1 o 1 para modelos “paso a paso” de una dimensión o lineales, ó de 0.5 para modelos de dos dimensiones; Hellberg, 1995), el nuestro fue de 0.0001 (Fig.7). Esto puede significar que la dispersión entre localidades vecinas no es tan restringida y, a escalas de 12 a 344km, existe un flujo genético entre la mayoría de las localidades, efecto también observado en el coral *Balanophylla elegans* en Hellberg (1994). En el GC, este efecto podría ser además potenciado por la temporalidad de las corrientes, donde en verano llevan migrantes dirección S → N y en invierno N→S (Hammann *et al.*, 1988; Jimenez-Illescas *et al.*, 1997), conectando a las subpoblaciones como se explica en la sección 8.4 o en la figura 9, disminuyendo el patrón al modelo “paso a paso”.

El periodo de desove es muy importante en especies con liberación de gametos al medio, debido a que el patrón hidrodinámico será de los principales factores responsables de la distribución larvaria. Se ha observado en la región del GC que los desoves masivos en pocilopóridos son principalmente en verano (Glynn *et al.*, 1991; Chaves-Romo y Reyes-Bonilla, 2007) explicando la alta conectividad regional y como cambian sutilmente las frecuencias alélicas en las poblaciones más extremas. Por otro lado, el tiempo planctónico de las larvas es muy variable en corales (Fadlallah, 1983) y en pocilopóridos, como *P.*

*damicornis*, se han reportado hasta 100 días (Richmond 1981); este tiempo es suficiente para brindar un potencial de dispersión muy grande a la especie, explicando la ausencia de estructura genética en la península.

#### 8.4 Patrones de migración y tamaños poblacionales

Los valores más altos de  $\theta$  reportados (tabla IX) indican que los tamaños efectivos poblacionales más grandes son para Cabo Pulmo ( $\theta = 2.3$ ) y para el Portugués ( $\theta = 1.776$ ). Esto va acorde con las poblaciones que mayor número de alelos promedio (A) reportaron (Fig.5) y mayor número de genotipos multilocus únicos (Tabla II), lo que es indicativo de poblaciones con una estrategia reproductiva sexual. A diferencia de las poblaciones dominadas por clonas, donde sus tamaños efectivos resultaron disminuidos como fue el caso del Canal ( $\theta = 0.895$ ) y la Isla ( $\theta = 0.752$ ), donde se reportaron los valores mínimos de A y menor número de genotipos multilocus únicos. Para el caso de Loreto, el valor de  $\theta$  fue intermedio (1.493), relacionado también a su número de A y genotipos multilocus únicos, intermedios comparando con todas las subpoblaciones. Esto pudo ser efecto del esfuerzo en la colecta por obligar a ampliar el rango normal de búsqueda de individuos, los cuales estuvieron separados desde metros hasta varios kilómetros (muy bajas densidades), por lo que los individuos tenían poca probabilidad de ser clonas, lo que sobrestima el valor de diversidad genética en este sitio.

El flujo de inmigrantes por generación ( $Nm = 118.04$ ) fue alto en toda la península (Fig.9; Tabla IX), reafirmado por los valores no significativos del  $F_{ST}$  global (0.0007;  $p = 0.42$ ). El flujo en ambas direcciones fue estadísticamente similar ( $p = 0.1779$ ), aun cuando el valor de verano fue el doble ( $Nm \approx 78$ ) sobre el de invierno ( $Nm \approx 40$ ), lo que confirma que

ocurren desoves fuera de los picos reproductivos en verano reportados para la especie (Glynn, 1991; Chávez-Romo y Reyes Bonilla, 2007). Por otro lado, a nivel subpoblaciones, hubo diferencias de aporte de migrantes entre las poblaciones más extremas, Loreto, Canal y Loreto, Cabo Pulmo ( $P < 0.05$ ), esto apoya lo observado en la prueba de aislamiento por distancia, donde Loreto al ser la población más pequeña, aportará la menor cantidad de inmigrantes al flujo total ( $Nm = 2.5$ ). En teoría pequeñas tasas de migración (aproximadamente un individuo por generación) mantendrán la presencia de los mismos alelos en las subpoblaciones (Kimura y Ohta, 1971). Sin embargo, puede ocurrir divergencia alélica aún con la presencia de migración, como lo demostró Allendorf y Phelps (1981) usando alozimas en distintas poblaciones de peces, donde presenciaron divergencia significativa entre 20 subpoblaciones con un  $Nm = 10$ . Por tanto bajas cantidades de migrantes mantendrán la similaridad “cualitativa” entre subpoblaciones y grandes cantidades de intercambio mantendrán una similaridad “cuantitativa” entre subpoblaciones (Allendorf, 1983).

Roberts (1997) describe un escenario para el Caribe, en el que las subpoblaciones están arregladas de una manera lineal metapoblacional, donde algunas localidades son netamente fuente de larvas para poblaciones río abajo, y otros arrecifes serán netamente sumidero de larvas en las poblaciones río arriba; sin embargo para esta región la dirección de las corrientes marinas es constante todo el año, a diferencia de la zona templada del GC, donde en verano la corriente va en una dirección y en invierno se invierte. De esta manera en el GC cuando las corrientes se dirigen al norte, las poblaciones del sur servirán de poblaciones fuentes de larvas plánulas a las subpoblaciones vecinas más norteñas,

fungiendo Cabo Pulmo como población fuente a las poblaciones del Canal ( $Nm= 1.85$ ), Isla (3.58) y Portugués (13.6 migrantes) y a Loreto (8 migrantes); y a su vez las poblaciones dentro de la Bahía de la Paz también servirán de fuente larvaria a Loreto con una magnitud de 21 migrantes, de este modo la única población netamente sumidero en verano fue Loreto. Por otro lado, en invierno las corrientes invierten su curso y desplazan las larvas al sur, donde Loreto envía 2.5 migrantes totales repartidos entre el Portugués (1.17 migrantes) y Cabo Pulmo (1.14 migrantes), las subpoblaciones centrales envían a Cabo Pulmo 34 migrantes, donde ahora las poblaciones centrales funcionan como población fuente y Cabo Pulmo como sumidero. Watkinson y Sutherland (1995) acuñan el término de “seudo-sumidero” a las poblaciones viables que aparecen como sumideros, como resultado de la dispersión de inmigrantes hacia ellos. Bajo este esquema todas las poblaciones resultan ser pseudo-sumideros exceptuando Loreto, que se presenta como un verdadero sumidero. Por otra parte, hay que resaltar que no todas las poblaciones fueron muestreadas, y existen más poblaciones al sur de Cabo Pulmo que pudieran servir como fuentes y sumideros de esta.

Las poblaciones mayormente clonales, tuvieron diferentes aportes de larvas a la región, donde el Canal fue la subpoblación que mayor larvas aportó en el estudio ( $Nm=52$ ), y la Isla fue la segunda subpoblación que menos larvas aportó ( $Nm= 15$ ). Estas diferencias tal vez se deban a la zona donde cada una está establecida, ya que el Canal se encuentra en la boca secundaria de la Bahía de la Paz, donde las corrientes pasan directamente sobre las cabezas de coral, pudiendo llevarse los gametos a los demás sitios; en cambio el sitio de la Isla Espíritu Santo se encuentra dentro de la bahía de San Gabriel, la cual está protegida

directamente de las corrientes. Por otro lado, ambas fueron las que menos larvas importaron, el Canal con 4 inmigrantes y la isla con 8 inmigrantes. Esto tal vez sea un reflejo directo de la gran densidad de colonias de coral presentes en estos sitios, la mayoría producto de clonas por fragmentación, las cuales limitarán el espacio para el asentamiento de nuevos reclutas sexuales (larvas plánulas) [Coffroth y Lasker, 1998].

Loreto fue un sumidero verdadero, posiblemente porque se localiza en donde las condiciones ambientales no son favorables, dependiendo únicamente de la inmigración de poblaciones fuente del sur para subsistir (Hanski y Gilpin, 1991). Estas condiciones ambientales adversas juegan un papel importante al mantener a los individuos con las tallas mínimas observadas y densidades muy bajas (anexo D), esto afecta directamente la tasa reproductiva de la subpoblación, produciendo menos propágulos y reduciendo la probabilidad de migración larvaria entre subpoblaciones, resultando en el flujo genético más bajo del estudio ( $Nm=2.5$ ). Sin embargo, al reportarse migrantes provenientes de esta localidad se pone de manifiesto que si ocurre reproducción y no se trata de una “pseudopoblación”, o población estéril (Richmond, 1987).

## 9. Conclusiones

1. Se demostró empleando los genotipos multilocus únicos (individuos de origen sexual) la existencia de una sola población genética ( $F_{ST}= 0.0007$ ,  $p=0.42$ ) de la especie *Pocillopora verrucosa* en el Golfo de California, cuyas subpoblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW); así mismo empleando los genotipo totales (todos los individuos) se observó una estructura genética local ( $F_{ST}= 0.108$ ,  $p< 0.001$ ) debida a la presencia de clonas en todos los sitios, con desviaciones al EHW (déficits y excesos de heterocigotos).
2. Los sitios genéticamente más diversos fueron en primer lugar Cabo Pulmo con un promedio de alelos (A) 6.33 y una diversidad genotípica ( $G_o/G_e$ ) del 70%, y el Portugués con 6.17 A y  $G_o/G_e= 73\%$ .
3. Las subpoblaciones mantenidas por reproducción sexual o mayormente sexuales fueron Cabo Pulmo, el Portugués y Loreto, promediando una diversidad genotípica ( $G_o/G_e$ ) del 55% y una equidad genotípica ( $G_o/N_g$ ) del 72%. En cambio las subpoblaciones del Canal de San Lorenzo y la Isla Espíritu Santo resultaron ser muy asexuales por medio de fragmentación, promediando una diversidad genotípica del 4.5% y una equidad genotípica del 40%.
4. La frecuencia de los huracanes por sitio mostró una correlación negativa significativa con la diversidad genotípica la riqueza genotípica y la equidad genotípica en las poblaciones del Golfo de California, explicando casi el 90% de la variación entre sitios muy clonales y sexuales.

5. Se obtuvo un aislamiento por distancia significativo entre todas las poblaciones ( $R^2=0.62$ ;  $p<0.05$ ), mostrando como las subpoblaciones vecinas son más genéticamente similares a diferencia de las más lejanas.
6. El número total de inmigrantes por generación ( $Nm$ ) estimado para la región fue de 118.04. En donde no hubo diferencias significativas entre las magnitudes totales de flujo en dirección norte ( $Nm =78.12$ ) y en dirección sur ( $Nm =40.15$ ); indicando que existen otros desoves de gametos fuera del *pico* reproductivo de verano. Pero si se presentaron diferencias significativas en el aporte de migrantes de las localidades geográficamente *más* alejadas ( $p<0.05$ ): Loreto ( $Nm =2.5$ ) y Cabo Pulmo ( $Nm =27$ ).
7. Las subpoblaciones se comportaron como una unidad metapoblacional, la cual presenta tasas de inmigración y tamaños efectivos poblacionales relativos diferenciales, donde dependiendo de su localización y la dirección de la corriente se comportaron como fuente, pseudo-sumidero o sumidero. La única población verdaderamente sumidero fue Loreto, evidenciado por su posición geográfica y su mínima contribución de migrantes ( $Nm= 2.5$ ).

## 10. Recomendaciones

- 1) Se recomienda para futuros análisis en poblaciones de pocilóporos emplear tamaños de colecta de más individuos ( $N=80-100$ ), debido a que la alta tasa de clonalidad reportada podría sesgar la diversidad genética del sitio.
- 2) Se recomienda para futuros trabajos de repoblamiento coralino hacer un estudio genético previo, donde se pueda tener un control de la diversidad genética de las colonias o fragmentos empleados para evitar la siembra de clonas y/o colonias con baja diversidad alélica.
- 3) Se recomienda aumentar los sitios de colecta con los fines de:
  - a. Analizar la participación de otros sitios con densidades importantes de coral para determinar su participación como sitios fuentes o sumidero dentro de la región.
  - b. Ampliar la zonas de colectas más al Norte y buscar el verdadero límite de distribución de la especie, la cual debería estar conformada por especies estériles (pseudopoblaciones).
- 4) El presente estudio es una herramienta para plantear el manejo y conservación de la especie, incluyendo la base genética. La alta conectividad larvaria observada en la región, nos indica que todos los sitios con densidades coralinas son importantes para el mantenimiento de las demás subpoblaciones. Lo anterior se apoya y demuestra por una dispersión larvaria tanto en dirección  $S \rightarrow N$  como  $N \rightarrow S$ ; teniendo el caso

extremo de la subpoblación de Loreto la cual depende en gran medida de la migración de las larvas más sureñas para mantener sus densidades poblacionales.

- 5) Otro enfoque que brinda el trabajo es abrir la posibilidad de usar como otra herramienta de conservación en estas poblaciones, el trasplante de colonias ya sea en sitios donde ocurrió una mortalidad muy alta o como medida para desplazar poblaciones enteras de un sitio a otro que será afectado por actividades antropogénicas.
- 6) Con el alza continua de las temperaturas de los mares (calentamiento climático) en el Golfo de California se proyecta que las poblaciones de *P. verrucosa* migren más al Norte. Se recomienda establecer un programa de seguimiento en cuanto a las tasas de reclutamiento de las larvas colonizadoras y establecer genéticamente sus orígenes de tal modo que ayude a conservar los sitios fuente más importantes y proteger a los nuevos reclutas a estas “nuevas” subpoblaciones. Así, se ayudaría a conservar poblaciones coralinas saludables y genéticamente diversas que puedan soportar y adecuarse a los nuevos regímenes ambientales venideros.
- 7) La composición genética detectada en los sitios con elevada clonalidad debería de ser evaluada después de eventos de re-colonización posteriores a disturbios ambientales con grandes mortalidades (blanqueamiento), para determinar la persistencia o cambios en el sistema de reproducción y estructura genética.

## 11. Bibliografía

- Adjeroud, M. y M. Tsuchiya .1999. Genetic variation and clonal structure in the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* in the Ryukyu Archipelago, southern Japan. *Mar. Biol.* 134 (4): 753–760.
- Allendorf, F.W. 1983. Isolation, gene flow and genetic differentiation among populations. En: Cummings, B., C.M. Schonewald-Cox, S.M. Chambers, B. MacGryde, y W.L. Thomas (eds.) *Genetics and conservation*. Menlo Park, California. 51-65p.
- Allendorf, F.W. 1986. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo. Biol.* 5:181–190.
- Allendorf F.W. y S.R. Phelps. 1981. Use of allelic frequencies to describe population structure. *C.J.F.A.S.* 38: 1507-1514.
- Atoda, K. 1947. The larva and postlarval development of some reef-building corals. I. *Pocillopora damicornis* (Dana). *Sci. Rep. Tohoku Univ.* 18: 24-47.
- Avice, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Ayre, D.J. y T.P. Hughes. 2000. Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the Great Barrier Reef, Australia. *Evolution.* 54: 1590–1605.

- Ayre, D.J. y T.P. Hughes. 2004. Climate change, genotypic diversity and gene flow in reef-building corals. *Eco.Let.* 7: 273–278.
- Ayre, D.J. y K.J. Miller. 2004. Where do clonal larvae go? Adult genotypic diversity conflicts with reproductive effort in the brooding coral *Pocillopora damicornis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 277:95–105
- Ayre, D. J. y B. L. Willis, 1988. Population structure in the coral *Pavona cactus*: clonal genotypes show little phenotypic plasticity. *Mar. Biol.* 99: 495-505.
- Baird, A .1998. The length of the larval phase in corals: new insights into patterns of coral connectivity. *A.C.R.S.A.N.* June 1998: 6-8.
- Balart, E.F. 2001. Evaluación Del Impacto Sobre Fondos Marinos Coralinos Producido Por El Encallamiento Del Buque-Tanque Lázaro Cárdenas, Al Sur De La Isla Espíritu Santo, Baja California Sur. Informe Final para PROFEPA. *Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.* 15 p.
- Baums I.B., M.W. Miller y M.E. Hellberg. 2005. Regionally isolated populations of an imperiled Caribbean coral, *Acropora palmata*. *Mol. Ecol.* 14:1377–1390
- Baums I.B., M.W. Miller, y M.E. Hellberg. 2006. Geographic variation in clonal structure in a reef building Caribbean coral, *Acropora palmata*. *Ecol. Monogr.* 76:503–519.
- Beerli, P. 2008. MIGRATE-n a maximum likelihood program to estimate gene flow using the coalescent. <http://popgen.scs.fsu.edu/Migrate-n.html>.

- Beerli, P. y J. Felsenstein. 1999. Maximum-Likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using coalescent approach. *Genetics*.152: 763-773.
- Beerli, P. y J. Felsenstein. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *P.N.A.S.*. 98:4,563–4,568.
- Bellwood, D.R., T.P. Hughes, C. Folke, y M. Nystrom. 2004. Confronting the coral reef crisis. *Nature*. 429: 827–833.
- Benzie, J. A. H., A. Haskell, y H. Lehman. 1995. Variation in the genetic composition of coral (*Pocillopora damicornis* and *Acropora palifera*) populations from different reef habitats. *Mar. Bio.* 121:731–739.
- Bohonak, A.J. 1999 Dispersal, gene flow, and population structure. *Q.R.B.* 74: 21–45
- Brusca, R.C. y D.A. Thomson. 1975. Pulmo reef: the only “coral reef” in the Gulf of California. *C.Mar.*1: 37-53.
- Chávez-Romo HE, y H Reyes-Bonilla. 2007. Sexual reproduction of the coral *Pocillopora damicornis* in the southern Gulf of California, Mexico. *Cienc. Mar.* 33(4): 495-501.
- Chávez-Romo, H.E, F. Correa-Sandoval, D.A. Paz-García, H. Reyes-Bonilla, R.A. López-Pérez, P. Medina-Rosas y M.P. Hernández-Cortés. 2008. Genetic structure of a scleractinia coral, *Pocillopora damicornis*, in the Mexican Pacific. *Proc 11th Int Coral Reef Sym.* 429-433.

- Cortés, J. 1997. Biology and geology of coral reefs of the eastern Pacific. *Coral Reefs*. 16: S39–S46.
- Cortés, J. y H.M. Guzmán. 1998. Organismos de los arrecifes coralinos de Costa Rica: Descripción, distribución geográfica e historia natural de los corales zooxantelados (Anthozoa: Scleractinia) del Pacífico. *Rev. Biol. Trop.* 46: 55-92.
- Coffroth MA, y H.R. Lasker. 1998. Population structure of a clonal gorgonian coral: the interplay between clonal reproduction and disturbance. *Evolution* 52:316–330.
- Edmunds P.J., R.D. Gates, y D.F. Gleason. 2003. The tissue composition of *Montastraea franksi* during a natural bleaching event in the Florida Keys. *Coral Reefs*. 22:54–62.
- DeWoody J.A, y J.C. Avise. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish. Biol.* 56:461–73.
- Excoffier, L., G. Laval, y S. Schneider .2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evo. Bio. Onl.* 1:47-50.
- Fabricius, K.E. 2005. Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: Review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 50: 125–146.
- Fadlallah, Y.H. 1983. Sexual reproduction, development and larval biology in scleractinian corals. *Coral Reefs*. 2:129-150.
- Foster N.L., I.B. Baums y P.J. Mumby. 2007. Sexual vs. asexual reproduction in an ecosystem engineer: the massive coral *Montastraea annularis*. *J. Anim. Ecol.* 76:384–391.

- Glynn P.W. 1997. Assessment of the present health of coral reefs in the eastern Pacific. In: Grigg RW, Birkeland C (eds). Status of coral reefs in the Pacific. *Sea Grant*, Hawaii, pp 33–40.
- Glynn P.W. 2002. An overview of the effects of the 1997-1998 El Niño-Southern Oscillation on eastern Pacific coral communities and coral reefs: an overview. In: Proceedings of the Ninth International Coral Reef Symposium, Bali. Editor: M, Kasim Moosa. *Bali: Ministry of Environment Indonesian Institute of Science*. 2: 1169-1174.
- Glynn, P.W., N.J. Gassman, C.M. Eakin, J. Cortés, D.B. Smith y H.M. Guzmán. 1991. Reef coral reproduction in the eastern Pacific: Costa Rica, Panama, and Galapagos Islands (Ecuador), Part I- Pocilloporidae. *Mar. Biol.* 109: 355-368.
- Grosberg, R.K. y C.W. Cunningham. 2001. Genetic structure in the sea: from populations to communities. En: Bertness M.D., S. Gaines y M.E. Hay (eds.) *Marine Community Ecology*, pp. 61–84. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Guo, S. y E. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48:361-372.
- Hammann, M.G., T.R. Baumgartner y A. Badan-Dangon. 1988. Coupling of the pacific sardine (*Sardinops sagax caeruleus*) life cycle with the Gulf of California Pelagic environment. *CALCOFI REP.* (29):102-109.
- Hanski, I. y M. Gilpin. 1991. Metapopulation Dynamics: brief history and conceptual domain. Pp. 3–16. En: Gilpin, M. y I. Hanski (eds). *Metapopulation Dynamics: Empirical and Theoretical Investigations*. London: Academic Press.

- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 2007. Principles of population genetics. SINAUER. 4<sup>th</sup> Ed. Sunderland, Massachussetts. 652pp.
- Harrison, P., y C. C. Wallace. 1990. Reproduction, dispersal, and recruitment of scleractinian corals. En: Dubinsky, Z. (ed). Ecosystems of the world: coral reefs. Elsevier. EU. 133–207.
- Hedgecock, D. 1986. Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates?. *Bull. Mar. Sci.* 39: 550–564.
- Hedgecock, D. 1994. Does variance in reproductive success limit effective population size of marine organisms? pp. 122–134 . En: A. Beaumont, (ed.) Genetics and evolution of aquatic organisms. Chapman and Hall, London.
- Hedgecock, D., P.H. Barber, y S. Edmands. 2007. Genetic approaches to measuring connectivity. *Oceanography*. 20: 70–79.
- Hellberg, M.E. 1994. Relationships between inferred levels of gene flow and geographic distance in a philopatric coral, *Balanophyllia elegans*. *Evolution*. 48:1829–54.
- Hellberg, M.E. 1995. Stepping stone gen flow in the solitary coral *Balanophyllia elegans*: equilibrium and nonequilibrium at different spatial scales. *Mar. Biol.* 123:573–81.
- Hellberg, M.E., R.S. Burton, J.E. Neigel, y S.R. Palumbi . 2002. Genetic assessment of continuity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*. 70: 273–290.
- Highsmith, R. C. 1982. Reproduction by fragmentation in corals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 7: 207-226
- Hunter, C.L. 1993. Genotypic variation and clonal structure in coral populations with different disturbance histories. *Evolution*. 47(4): 1213–1228.

- Iglesias-Prieto, H., H. Reyes-Bonilla, y R. Riosmena-Rodríguez. 2003. Effects of 1997-1998 ENSO on coral reef communities in the Gulf of California, Mexico. *Geof. Intern.* 42(3): 467-471.
- Jackson, J.B.C. 1977. Competition on marine hard substrata: the adaptive significance of solitary and colonial strategies. *Am. Nat.* 111, 743-767.
- Jiménez-Illescas A.R., M. Obeso-Nieblas y D.A. Salas-De León. 1997. Oceanografía física de la bahía de La Paz, B.C.S. En: Urbán RJ & M Ramírez (eds): La bahía de La Paz, Investigación y Conservación. pp. 31-41. *Universidad Autónoma de Baja California Sur, Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas*. México.
- Johnson, M. S. y R. Black. 1984. Pattern beneath the chaos: The effect of recruitment on genetic patchiness in an intertidal limpet. *Evolution*. 38: 1371-1383.
- Kendall, M. y A. Stuart. 1977. The advances theory os Statistics.I. Distribution and theory. 4<sup>th</sup> ed. Macmillan. EU.
- Kimura, M. y T. Ohta. 1971. Protein Polymorphism as a phase of molecular Evolution. *Nature*. 229: 467-469.
- Kimura, M. y G. H. Weiss. 1964. The stepping stone model of population structure and thde ecrease of genetic correlation with distance. *Genetics*. 49: 561-576.
- Knowlton, N. y J. B. C. Jackson. 1993. Inbreeding and outbreeding in marine invertebrates. In: N. W. Thornhill (ed.), The natural history of inbreeding and outbreeding: Theoretical and empirical perspectives. University of Chicago Press, Chicago. 200-249 pp.

- LaJeunesse T.C., H. Reyes-Bonilla, M.E. Warner. 2007. Spring “bleaching” among *Pocillopora* in the Sea of Cortez, Eastern Pacific. *Coral Reefs*. 26:265–270.
- Lesica, P., y F. W. Allendorf. 1995. When are peripheral populations valuable for conservation?. *Conserv. Biol.* 9:753–760.
- Lirman, D. 2000. Fragmentation in the branching coral *Acropora palmata* (Lamarck): growth, survivorship, and reproduction of colonies and fragments. *J. Exp. Mar. Biol. Eco.* 251:41–57.
- Long, J.C. 1986. The allelic correlation structure of Gainj- and Kalam-speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright’s F-statistics. *Genetics*. 112:629-647.
- Magalon H., S. Samadi, M. Richard, d M. Adjerou y M. Veuille. 2004. Development of coral and zooxanthella-specific microsatellites in three species of *Pocillopora* (Cnidaria, Scleractinia) from French Polynesia. *Mol. Ecol. Notes*. 4, 206–208.
- Magalon H., M. Adjeroud, y M. Veuille. 2005. Patterns of genetic variation do not correlate with geographical distance in the reef-building coral *Pocillopora meandrina* in the South Pacific. *Molec. Ecol.* 14: 1861–1868.
- Manel, S., O.E. Gaggioti, y R.S. Waples. 2005. Assignment methods: Matching biological questions with appropriate techniques. *TREE*. 20:136–142.
- Miller K.J., D.J. Ayre. 2004. The role of sexual and asexual reproduction in structuring high latitude populations of the reef coral *Pocillopora damicornis*. *Heredity*. 92:557–568.

- Mundy C. y M.J. Babcock. 1998. Role of light intensity and spectral quality in coral settlement: implications for depth-dependent settlement? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 223: 235–255.
- Nei M, T. Maruyama, y R. Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution.* 29: 1–10.
- Paetkau .D, y C. Strobeck. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Mol. Ecol.* 3, 489–495.
- Paetkau, D., W. Calvert, I. Stirling, y C. Strobeck. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molec. Ecol.* 4:347–354
- Paz-García D.A., F. Correa-Sandoval, H.E. Chávez-Romo, H. Reyes-Bonilla, A. López-Pérez, P. Medina-Rosas y M.P. Hernández-Cortés. 2009. Genetic structure of the massive coral *Porites panamensis* (Anthozoa:Scleractinia) from the Mexican Pacific. *Proc 11th Int Coral Reef Sym.* 449-453
- Pritchard J.K., P. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155: 945–959.
- Raymond, M., y F. Rousset. 1995. GENEPOP(ersion 1.2):a population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- Reyes-Bonilla, H. 1993. Coral reef bleaching at Cabo Pulmo Reef, Gulf of California, México. *Bulletin of Marine Science.* 52(2): 832-837.
- Reyes Bonilla, H. 2001. Effects of the 1997–1998 El Niño Southern Oscillation on coral communities of the Gulf of California, Mexico. *Bull Mar Sci.* 69(1): 251–266.

- Reyes-Bonilla H. 2003. Coral reefs of the Pacific coast of México. En: J Cortés (ed.), Coral reefs of Latin America. Elsevier, Amsterdam. Pp. 331–349.
- Reyes-Bonilla H., y G. Cruz-Piñón G. 2000. Biogeografía de los corales ahermatípicos (Scleractinia) del Pacífico de México. *Cienc. Mar.* 26: 511–531.
- Reyes Bonilla H, J.D. Carriquiry, G.E. Leyte-Morales, y A.L. Cupul-Magaña. 2002. Effects of the El Niño-Southern Oscillation and the anti-El Niño event (1997-1999) on coral reefs of the western coast of México. *Coral Reefs* 21: 368-372.
- Reyes-Bonilla H., L.E. Calderón-Aguilera, G. Cruz-Piñón,, P. Medina-Rosales, A.L. Cupul Magaña y J.D. Carriquiry-Beltrán. 2005. Atlas de los corales pétreos (Scleractinia) del Pacífico Mexicano. CICESE/CONABIO/CONACYT/UABCS/UdG/UMAR. 124pp.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution.* 43: 223-225.
- Richmond, R.H. 1981. Energetic considerations in the dispersal of *Pocillopora damicornis* (Linnaeus) planulae. *Proc 4th Int Coral Reef Symp.* 2:153-156.
- Richmond, R.H. 1987. Energetic relationships and biogeographical differences among fecundity, growth and reproduction in the reef coral *Pocillopora damicornis*. *Bull. Mar. Sci.* 41(2): 594-604.
- Ridgway, T.O. Hoegh-Guldberg, D.J. Ayre. 2001. Panmixia in *Pocillopora verrucosa* from South Africa. *Mar Biol.* 139:175–181.
- Ridgway, T., C. Riginos, J. Davis, and O. Hoegh-Guldberg. 2008. Genetic connectivity patterns of *Pocillopora verrucosa* in southern African Marine Protected Areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 354:161-168.

- Roberts, C.M. 1997. Connectivity and management of Caribbean coral reefs. *Science*. 278:1454-1457.
- Rose, C.G., K.T. Paynter, y M.P. Hare. 2006. Isolation by distance in the eastern oyster *Crassostrea virginica* in Chesapeake Bay. *J. Hered.* 97:158–170.
- Saavedra-Sotelo, N.C. 2007. Estructura y flujo genético de *Pavona gigantea* (Anthozoa: Scleractinia) en las costas del Pacífico mexicano. MS Thesis. CICESE. Ensenada, BC, México.
- Selkoe K.A. y R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* .9: 615–629.
- Sherman, C.D.H., Ayre, D.J., y Miller, K.J. 2006. Asexual reproduction does not produce clonal populations of the brooding coral *Pocillopora damicornis* on the Great Barrier Reef, Australia. *Coral Reefs*. 25: 7-18.
- Shearer T.L., M.J.H. van Oppen, S.L.R. Romano, y G. Worheide. 2002. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Mol Ecol*. 11:2475–2487.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*. 47: 264-279.
- Slatkin, M. 2005. Seeing ghosts: The effect of unsampled populations on migration rates estimated for sampled populations. *Molec. Ecol*. 14:67–73.
- Schmidt, P. S. y D.M. Rand. 2001. Adaptive maintenance of genetic polymorphism in an intertidal barnacle: Habitat- and lifestage- specific survivorship of Mpi genotypes. *Evolution*. 55: 1336–1344.

- Shaw P.W., G.J. Pierce y P.R. Boyle. 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Mol. Eco.* 8 : 407–417.
- Solano, O. D., G. R. Navas, y S. K. Moreno-Forero. 1992. Blanqueamiento coralino de 1990 en el Parque Nacional Natural Corales del Rosario (Caribe Colombiano). *An. Inst. Inv. Mar Punta de Betín.* 22:97-111.
- Souter P., O. Henriksson, N. Olsson y M. Grahn. 2009. Patterns of genetic structuring in the coral *Pocillopora damicornis* on reefs in East Africa. *B.M.C. Ecol.* 26: 9-19.
- Squires, D.F. 1959. Corals and coral reefs in the Gulf of California. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 118: 367-432.
- StatSoft, Inc. 2007. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).
- Starger C.J., S.S.R. Yeoh, C.F. Dai, A.C. Baker y R.Desalles. 2008. Ten polymorphic STR loci in cosmopolitan reef coral, *Pocillopora damicornis*. *Mol. Ecol. Res.* 8: 619-621.
- Stoddart J.A. 1983. Asexual production of planulae in the coral *Pocillopora damicornis*. *Mar Biol.* 76:279–284.
- Stoddart, J.A. y J. F. Taylor. 1988. Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics.* 118: 705-711.
- Templeton, A. R. 1980. The theory of speciation via the founder principle. *Genetics.* 94: 1011-1038.

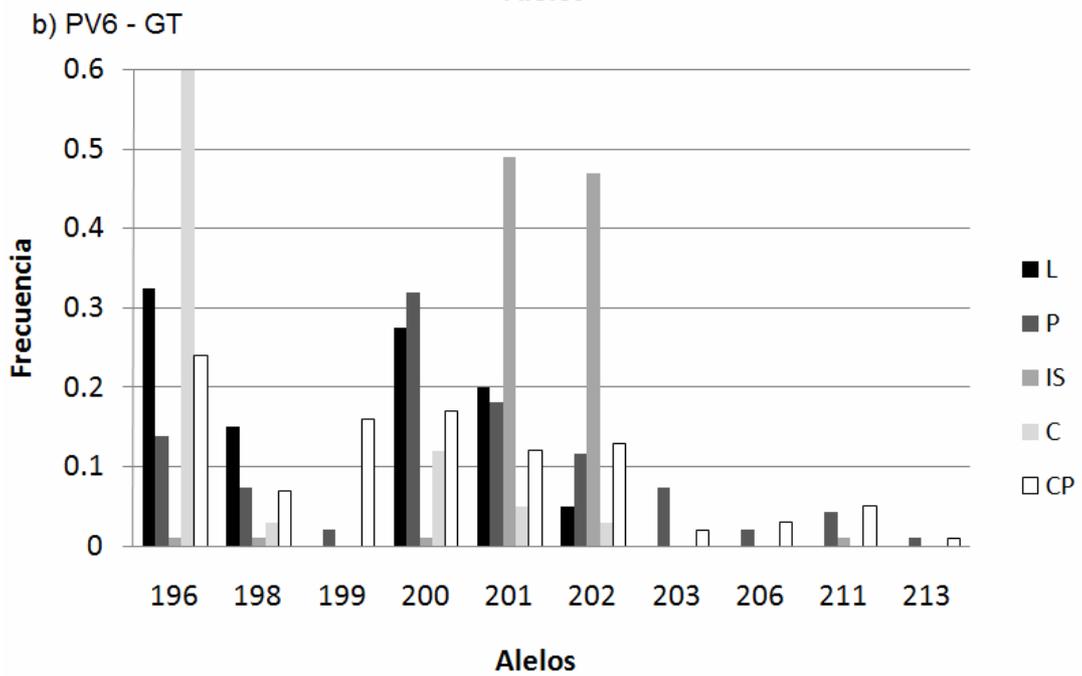
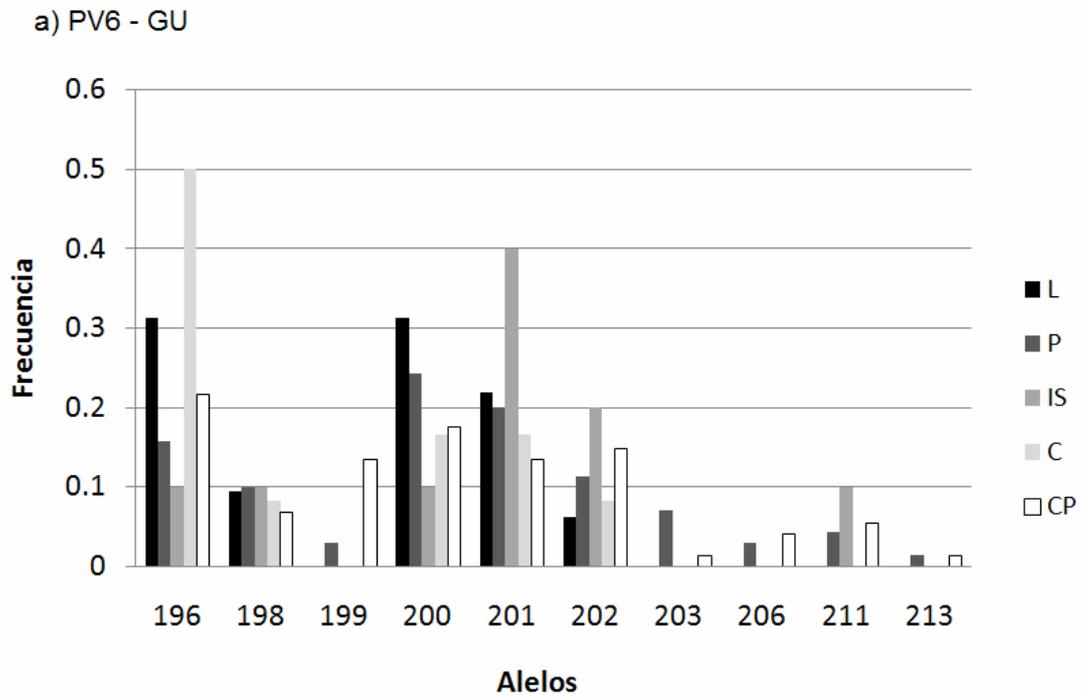
- Thorrold, S.R., D.C. Zacherl, y L.A. Levin. 2007. Population connectivity and larval dispersal: Using geochemical signatures in calcified structures. *Oceanography*, 20(3): 80–89.
- Underwood J.N., L.D. Smith, M.J.H. van Oppen, y J. Gilmour. 2007. Multiple scales of genetic connectivity in a brooding coral on isolated reefs following catastrophic bleaching. *Mol.Ecol.* 16, 771–784.
- Valière, N. 2002. Gimlet: a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Mol Ecol.* 2: 377–379.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. y Shipley, P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes*, 4, 535–538.
- Veron, J.E.N., 1986. Corals of Australia and the Indo-Pacific. *Angus and Robertson*. Australia. 644 pp.
- Veron, J.E.N . 1995. Corals in space and time. The biogeography and evolution of the Scleractinia. Comstock/Cornell University Press, Ithaca, NY, 321pp.
- Veron, J.E. N. y M. Pichon. 1976. Scleractinia of Eastern Australia, part I. Families Thamnasteriidae, Astrocoeniidae, Pocilloporidae. *Aust. Inst. Mar. Sci., Mon. Ser.* 1: 1-86.
- Waples, R. S. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity.* 89:438–450.
- Weber J.L. y C. Wong. 1993. Mutation in human short tandemrepeat polymorphisms. *Hum. Mol. Genet.* 2:1123–1128.

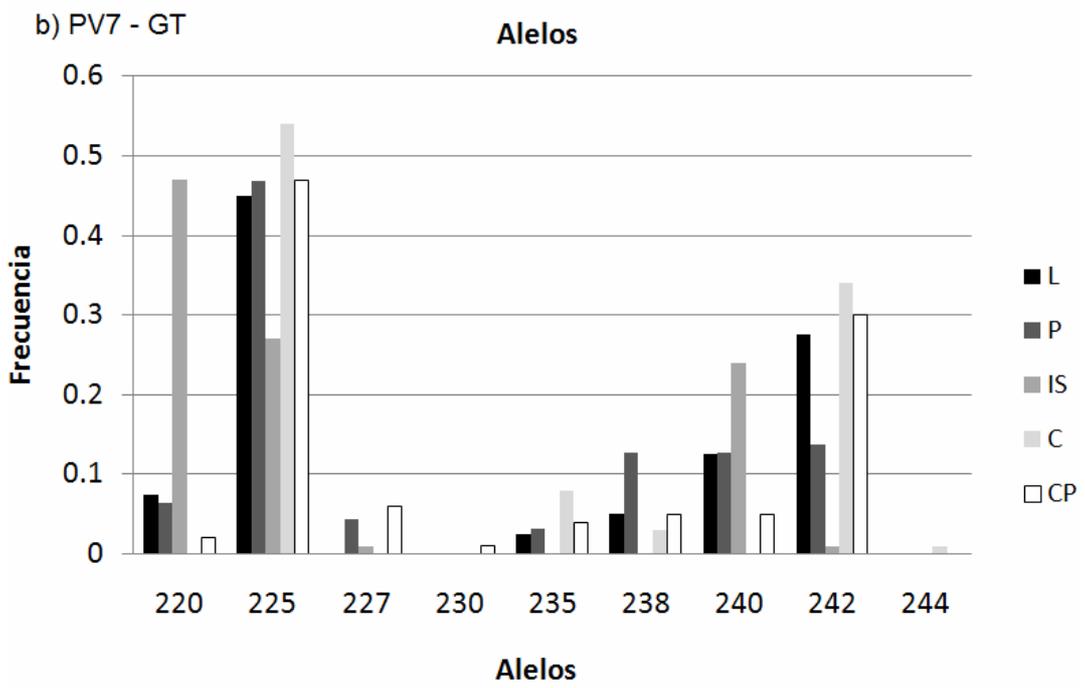
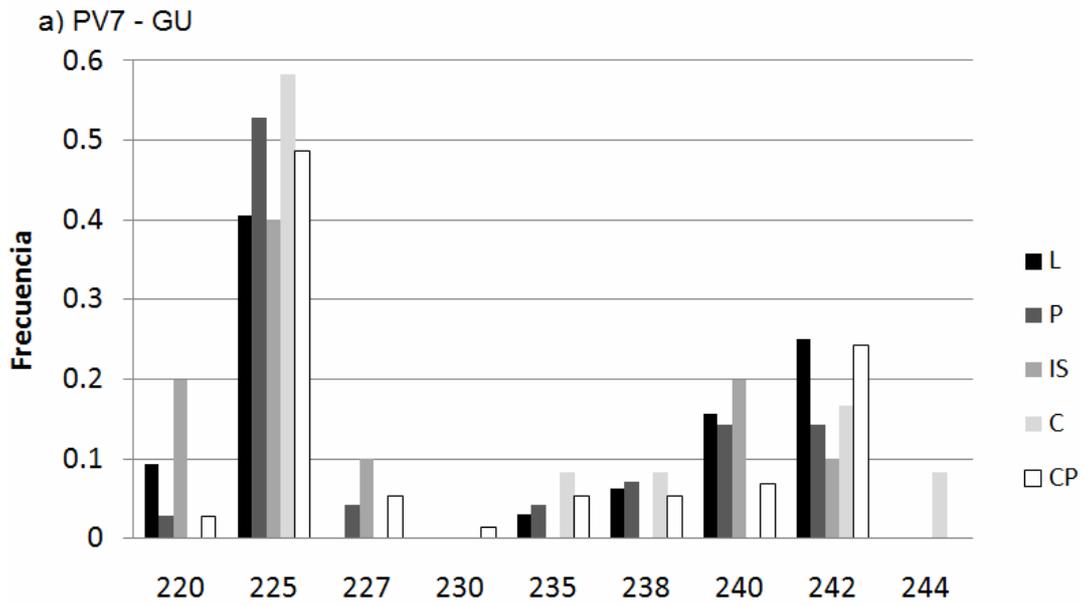
- Weir, B.S. y W.G. Hill. 2002. Estimating F-statistics. *Annu. Rev. Genet.* 36: 721-750.
- Whitaker, K. 2006. Genetic evidence for mixed modes of reproduction in the coral *Pocillopora damicornis* and its effect on population structure. *Mar. Eco. Pro. Ser.* 306:115-124.
- Whitlock M.C. y D.E. McCauley. 1999. Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST} \neq 1/(4Nm + 1)$ . *Heredity.* 82: 1385–70.
- Williams, G.C. 1975. Sex and evolution. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Willis, B. L. y D. J. Ayre., 1985. Asexual reproduction and genetic determination of growth form in the coral *Pavona cactus*: biochemical genetic and immunogenetic evidence. *Oecologia.* 65: 516–525.
- Willis, B. I. A y J. K. Oliver. 1990. Direct tracking of coral larvae: Implications for dispersal in topographically complex environments. *Ophelia.* 32: 145–162.
- Wilson, G.A., y B. Rannala. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics.* 163:1,177–1,191.
- Yoshida, K., M. Nakagawa y S. Wada. 2005. Multiplex PCR system applied for analyzing microsatellite loci of Schlegel's black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Mol. Ecol. Notes.* 5(2): 416-418.
- Wolanski, E .1994. Physical Oceanographic Processes of the Great Barrier Reef. CRC Press, Boca Raton.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F statistics with special regard to systems of mating. *Evolution.* 19:395-420.

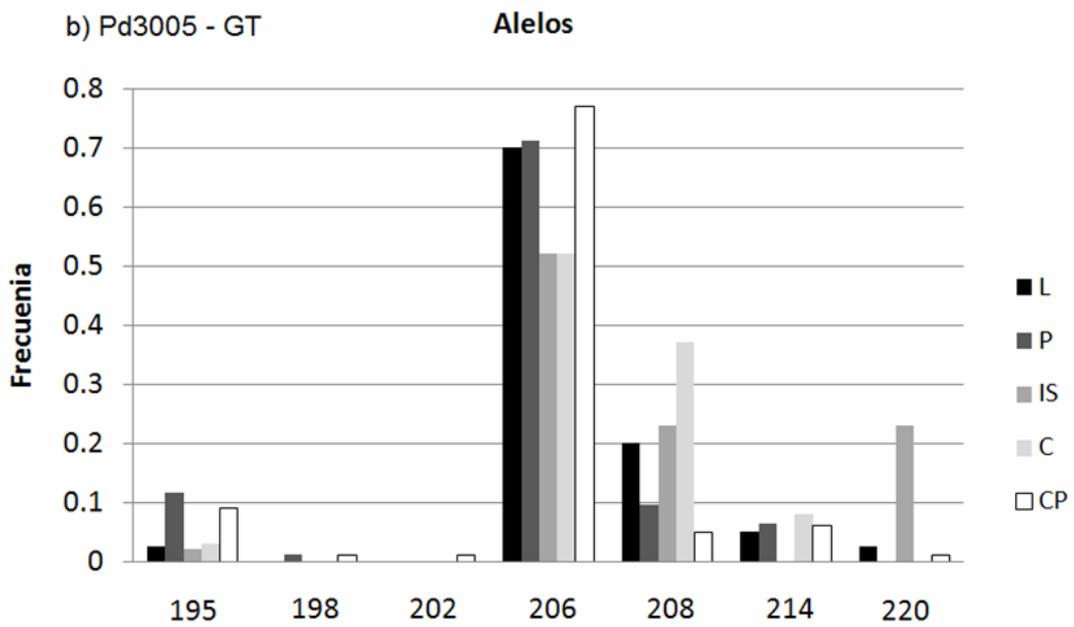
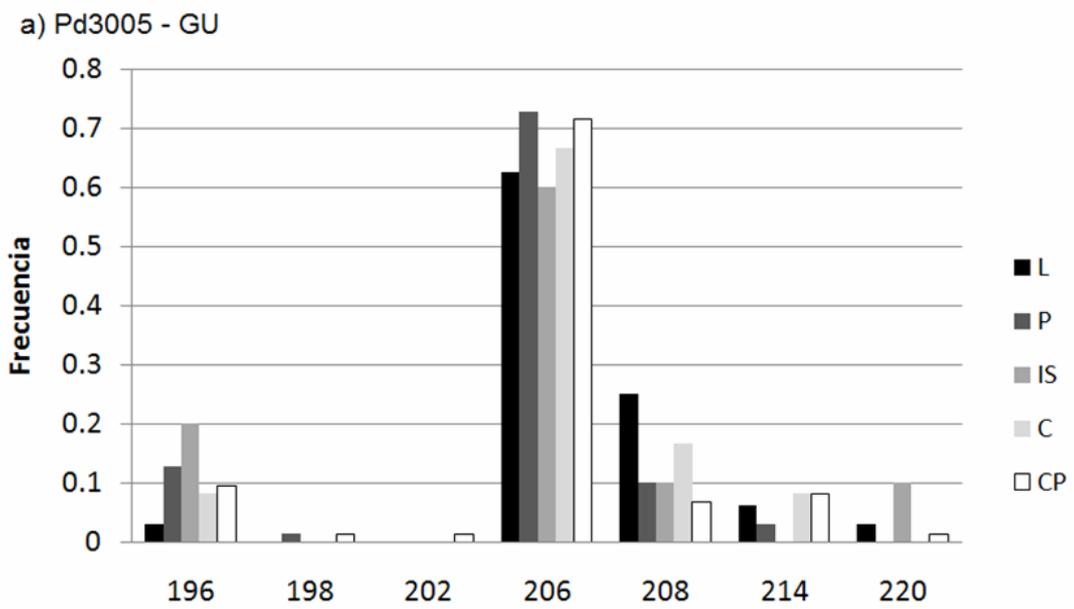
## 12. ANEXOS

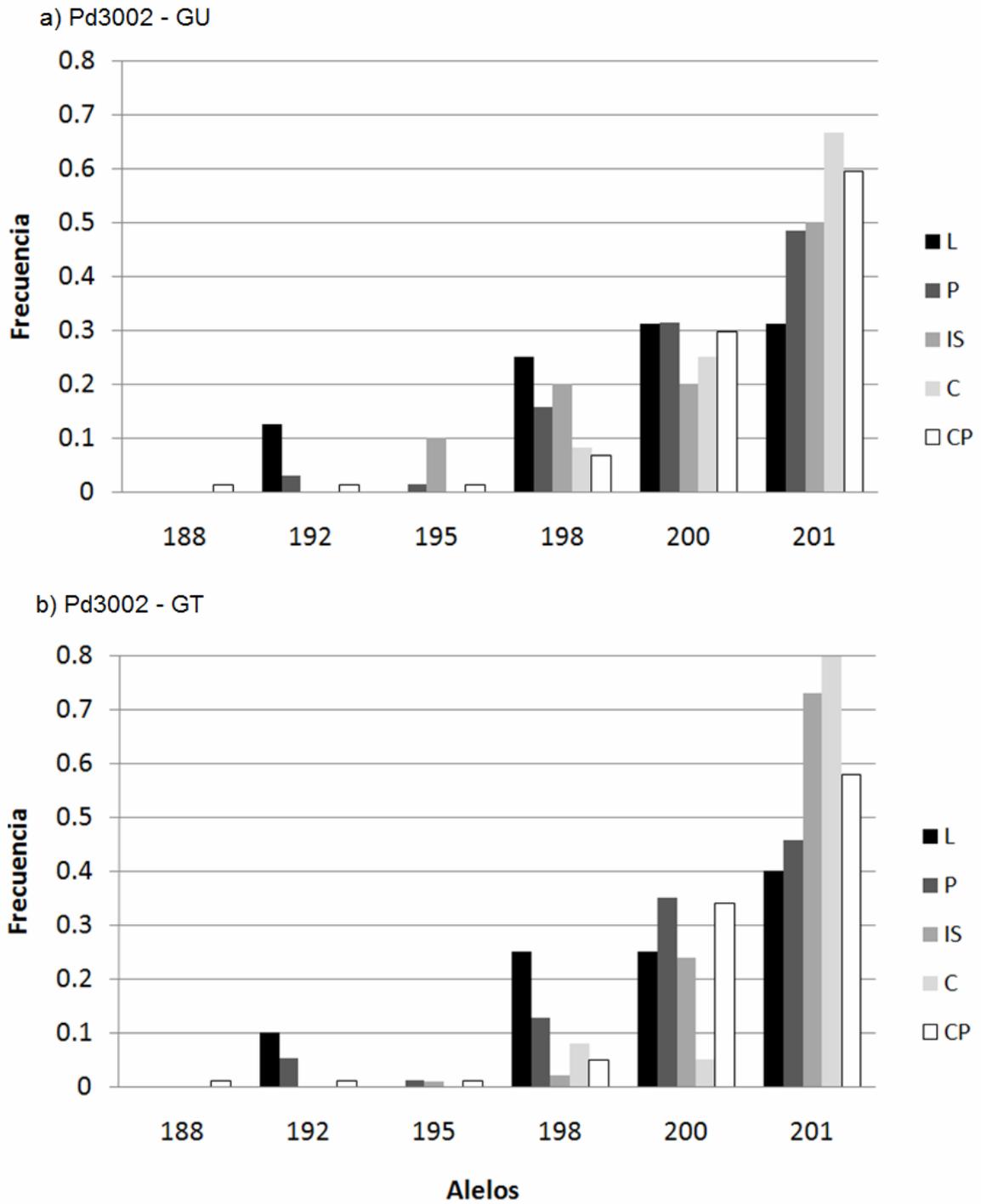
### ANEXO A.

Figuras con las frecuencias alélicas de cada microsatélite tomando en cuenta los genotipos totales (GT) vs los genotipos únicos (GU).

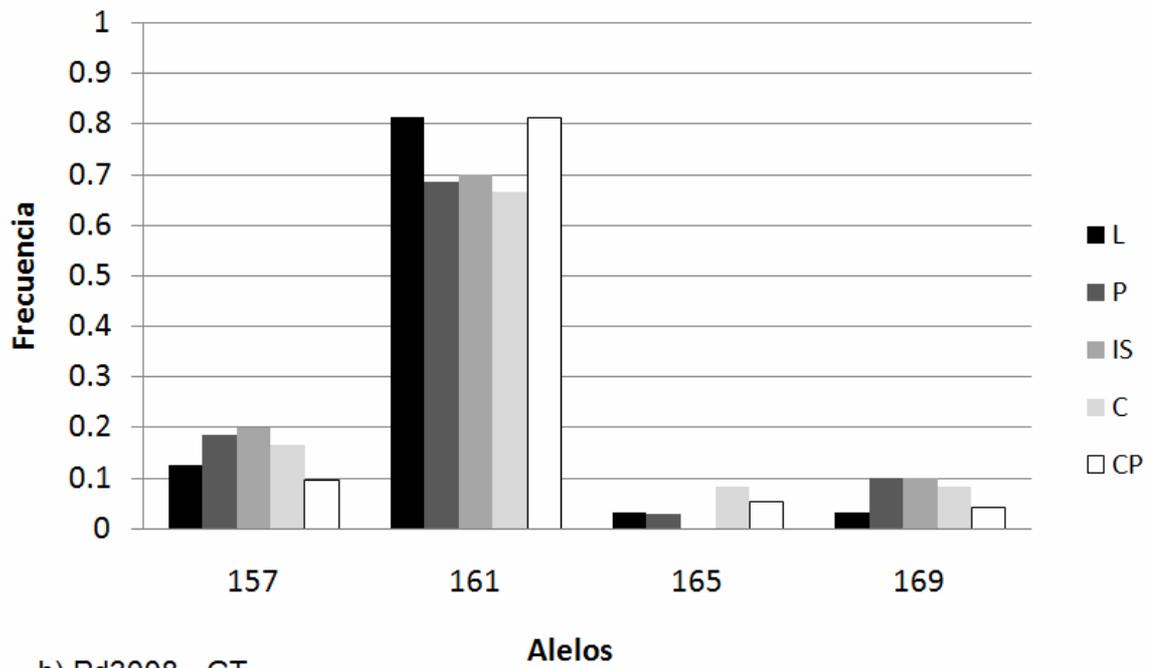




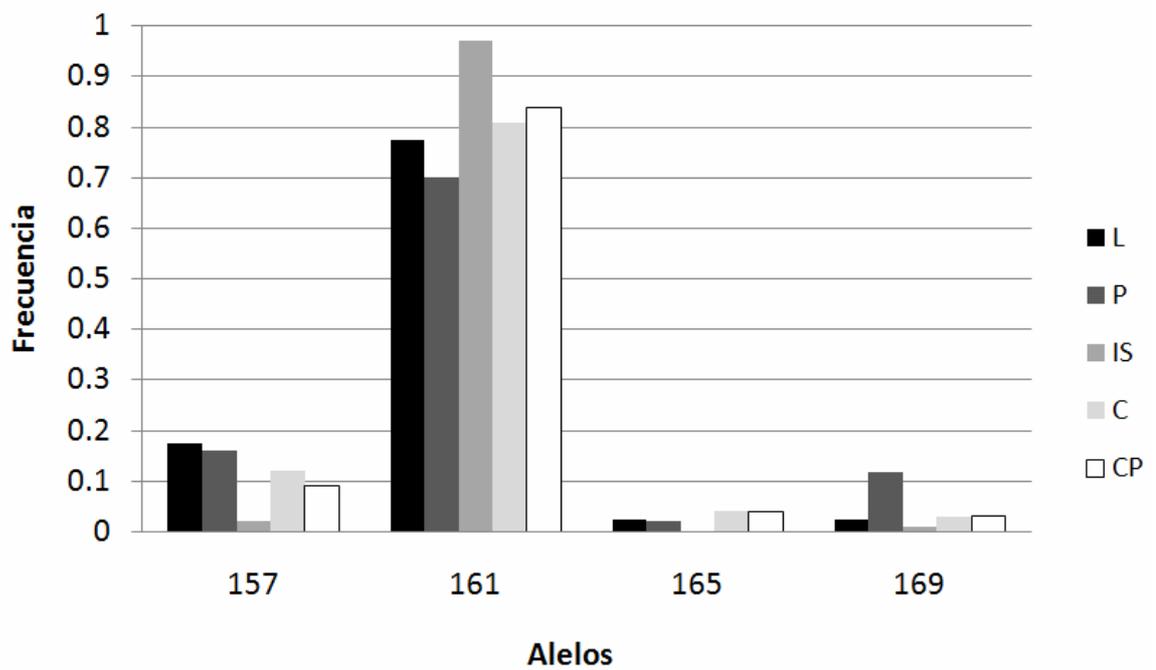


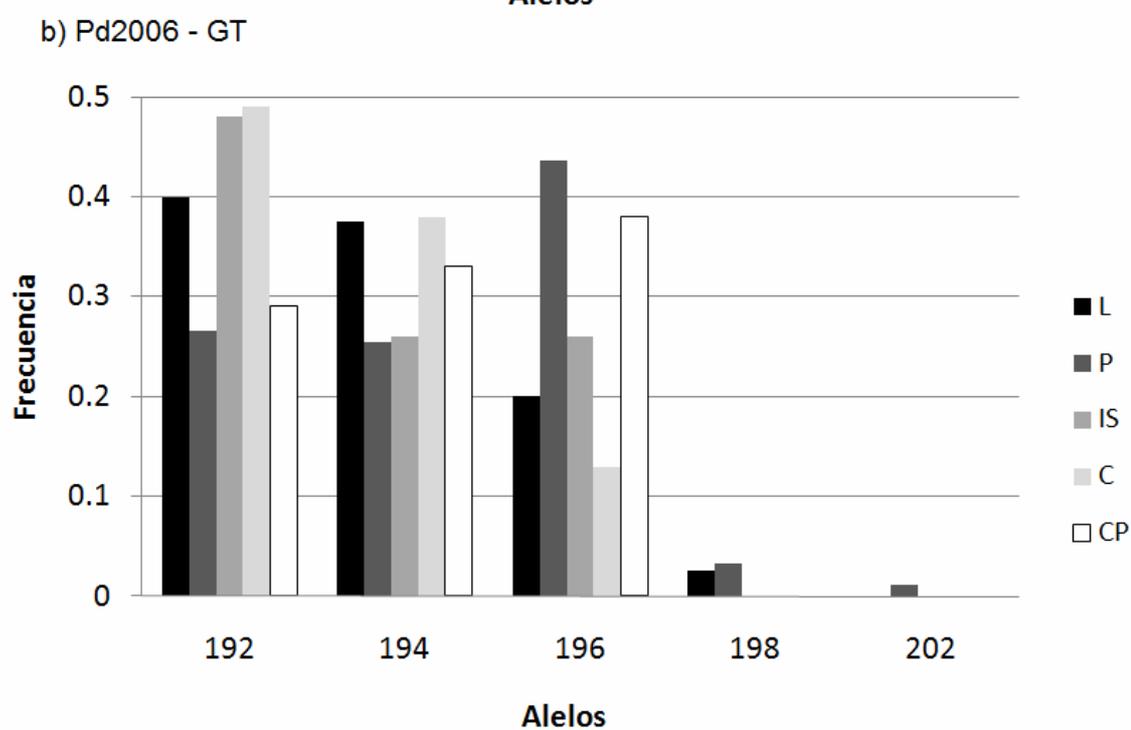
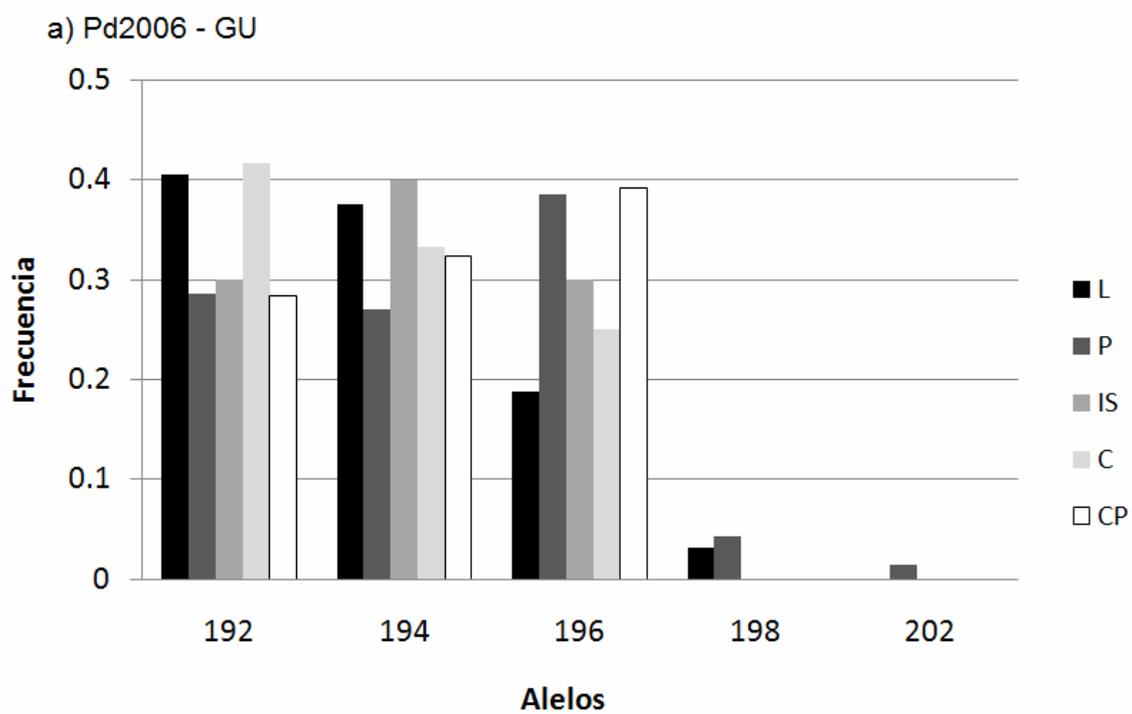


a) Pd3008 - GU



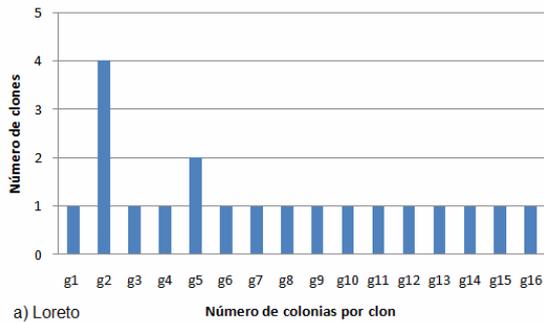
b) Pd3008 - GT



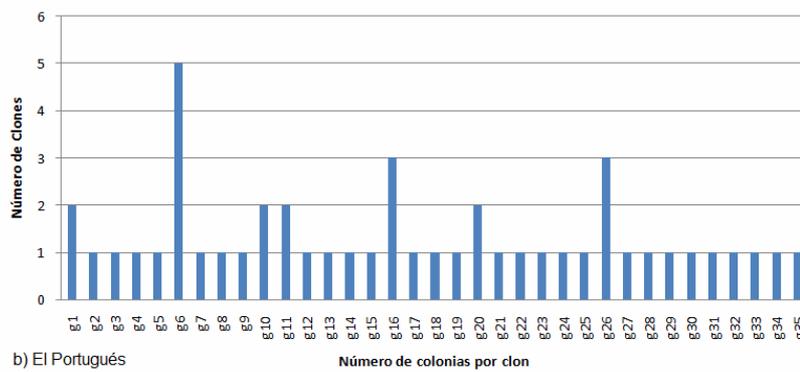


ANEXO B.

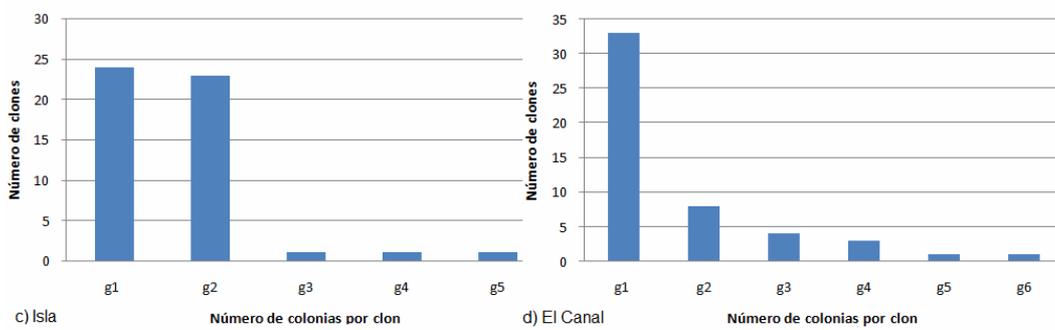
Figuras con número de clones y número de colonias por clon por cada localidad a) Loreto, b) Portugués, c) Isla, d) Canal y e) Cabo Pulmo.



a) Loreto

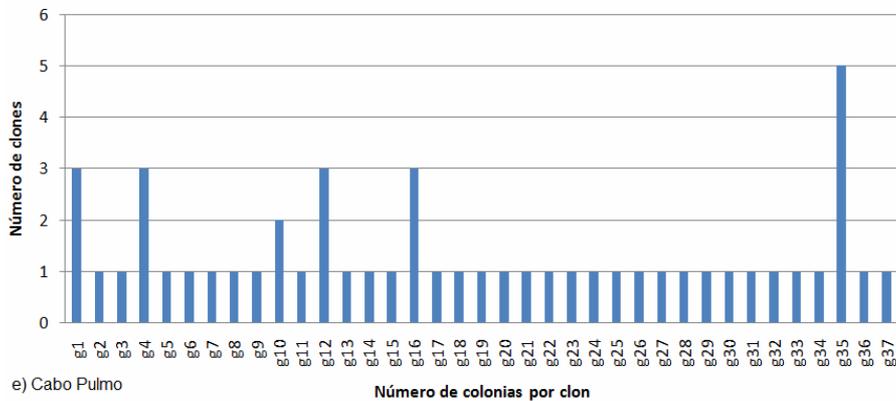


b) El Portugués



c) Isla

d) El Canal



e) Cabo Pulmo

## ANEXO C.

Tabla de datos de los huracanes empleados para el estudio por cada sitio de 1958 al 2007.

<b>Sitio</b>	<b>Año</b>	<b>Mes</b>	<b>Nombre</b>	<b>Viento (nudos)</b>	<b>Catergoria</b>
Cabo Pulmo	1976	9	LIZA	120	H4
	1982	9	PAUL	95	H2
	1989	8	KIKO	100	H3
	1998	9	ISIS	65	H1
	2006	9	JOHN	85	H2
El Canal de San	1958	10	Sin Nombre	75	H1
Lorenzo	1959	9	Sin Nombre	75	H1
y	1960	8	DIANA	75	H1
La Isla Espiritu	1973	9	IRAH	65	H1
Santo	1976	10	LIZA	120	H4
	1986	9	NEWTON	65	H1
	1996	9	FAUSTO	70	H1
	2003	8	IGNACIO	70	H1
	2003	9	MARTY	80	H1
	2007	9	HENRIETTE	65	H1
El Portugués	1959	9	Sin Nombre	75	H1
	2003	9	MARTY	80	H1
	2003	8	IGNACIO	70	H1
Loreto	1967	9	KATRINA	75	H1
	1967	10	OLIVIA	75	H1
	2003	9	MARTY	80	H1

## ANEXO D.

Tablas de tallas de los individuos colectados en el Canal, la Isla, y Loreto.

<b>Canal de San Lorenzo</b>								
<b>Individuo</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>m<sup>2</sup></b>	<b>Individuo</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>m<sup>2</sup></b>	
1	0.25	0.2	0.05	26	0.5	0.4	0.2	
2	0.3	0.2	0.06	27	0.6	0.35	0.21	
3	0.3	0.2	0.06	28	0.6	0.35	0.21	
4	0.35	0.2	0.07	29	0.6	0.35	0.21	
5	0.3	0.25	0.075	30	0.6	0.4	0.24	
6	0.3	0.25	0.075	31	0.6	0.4	0.24	
7	0.3	0.3	0.09	32	0.6	0.4	0.24	
8	0.4	0.25	0.1	33	0.7	0.4	0.28	
9	0.4	0.25	0.1	34	0.6	0.5	0.3	
10	0.4	0.3	0.12	35	0.6	0.5	0.3	
11	0.4	0.3	0.12	36	0.6	0.5	0.3	
12	0.4	0.3	0.12	37	0.65	0.5	0.325	
13	0.4	0.3	0.12	38	0.7	0.5	0.35	
14	0.4	0.3	0.12	39	0.7	0.5	0.35	
15	0.45	0.3	0.135	40	0.8	0.5	0.4	
16	0.45	0.3	0.135	41	0.7	0.6	0.42	
17	0.4	0.35	0.14	42	0.8	0.6	0.48	
18	0.45	0.35	0.1575	43	0.85	0.7	0.595	
19	0.4	0.4	0.16	44	1	0.6	0.6	
20	0.5	0.35	0.175	45	1.1	0.6	0.66	
21	0.5	0.35	0.175	46	1	0.7	0.7	
22	0.6	0.3	0.18	47	1.3	1.2	1.56	
23	0.65	0.3	0.195	48	1.3	1.2	1.56	
24	0.65	0.3	0.195	49	1.5	1.2	1.8	
25	0.5	0.4	0.2	50	1.8	1.2	2.16	
				<b>Promedio total</b>				<b>0.36</b>

<b>Isla Espiritu Santo</b>							
<b>Individuo</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>m<sup>2</sup></b>	<b>Individuo</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>m<sup>2</sup></b>
1	0.21	0.12	0.03	26	0.3	0.28	0.08
2	0.19	0.14	0.03	27	0.4	0.22	0.09
3	0.2	0.14	0.03	28	0.37	0.24	0.09
4	0.19	0.16	0.03	29	0.33	0.27	0.09
5	0.19	0.17	0.03	30	0.34	0.27	0.09
6	0.2	0.19	0.04	31	0.37	0.28	0.10
7	0.23	0.17	0.04	32	0.4	0.26	0.10
8	0.23	0.17	0.04	33	0.38	0.28	0.11
9	0.24	0.17	0.04	34	0.34	0.32	0.11
10	0.23	0.19	0.04	35	0.37	0.3	0.11
11	0.21	0.21	0.04	36	0.34	0.34	0.12
12	0.22	0.21	0.05	37	0.35	0.35	0.12
13	0.29	0.17	0.05	38	0.4	0.31	0.12
14	0.25	0.2	0.05	39	0.38	0.33	0.13
15	0.28	0.18	0.05	40	0.37	0.36	0.13
16	0.26	0.2	0.05	41	0.38	0.36	0.14
17	0.24	0.22	0.05	42	0.42	0.33	0.14
18	0.28	0.2	0.06	43	0.5	0.28	0.14
19	0.25	0.23	0.06	44	0.44	0.33	0.15
20	0.33	0.2	0.07	45	0.47	0.35	0.16
21	0.34	0.2	0.07	46	0.55	0.34	0.19
22	0.3	0.24	0.07	47	0.51	0.4	0.20
23	0.28	0.28	0.08	48	0.47	0.44	0.21
24	0.3	0.27	0.08	49	0.57	0.38	0.22
25	0.31	0.27	0.08	50	0.52	0.45	0.23
<b>Promedio total</b>							<b>0.09</b>

<b>Loreto</b>			
<b>Individuo</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>m<sup>2</sup></b>
1	0.02	0.02	0.0004
2	0.07	0.06	0.0042
3	0.08	0.06	0.0048
4	0.07	0.1	0.007
5	0.13	0.07	0.0091
6	0.12	0.1	0.012
7	0.13	0.11	0.0143
8	0.18	0.1	0.018
9	0.16	0.12	0.0192
10	0.15	0.13	0.0195
11	0.16	0.13	0.0208
12	0.21	0.1	0.021
13	0.2	0.13	0.026
14	0.24	0.2	0.048
15	0.26	0.19	0.0494
16	0.21	0.25	0.0525
17	0.4	0.3	0.12
18	0.4	0.35	0.14
19	0.45	0.35	0.1575
20	0.41	0.43	0.1763
<b>Promedio total</b>			<b>0.046</b>

## ANEXO E.

Tabla con las pruebas de Bonferroni para pruebas de desequilibrio de ligamiento.

<b>Portugués</b>				<b>Cabo Pulmo</b>			
<b>p</b>	<b>k</b>	<b><math>\alpha/k</math></b>	<b>S / NS</b>	<b>p</b>	<b>k</b>	<b><math>\alpha/k</math></b>	<b>S / NS</b>
0.00718764	15	0.00333333	NS	0.00353392	15	0.00333333	NS
0.067194	14	0.00357143	NS	0.01287785	14	0.00357143	NS
0.106337	13	0.00384615	NS	0.1000579	13	0.00384615	NS
0.12802	12	0.00416667	NS	0.1053488	12	0.00416667	NS
0.214012	11	0.00454545	NS	0.12094198	11	0.00454545	NS
0.219542	10	0.005	NS	0.22917582	10	0.005	NS
0.255231	9	0.00555556	NS	0.25417282	9	0.00555556	NS
0.256698	8	0.00625	NS	0.257557	8	0.00625	NS
0.280937	7	0.00714286	NS	0.29798746	7	0.00714286	NS
0.289083	6	0.00833333	NS	0.34489678	6	0.00833333	NS
0.299355	5	0.01	NS	0.40257757	5	0.01	NS
0.444226	4	0.0125	NS	0.80271932	4	0.0125	NS
0.462844	3	0.01666667	NS	0.81492832	3	0.01666667	NS
0.500908	2	0.025	NS	0.8173841	2	0.025	NS
0.882612	1	0.05	NS	0.85160524	1	0.05	NS

<b>Canal</b>				<b>Isla Espíritu Santo</b>			
<b>p</b>	<b>k</b>	<b><math>\alpha/k</math></b>	<b>S / NS</b>	<b>p</b>	<b>k</b>	<b><math>\alpha/k</math></b>	<b>S / NS</b>
0.02531646	15	0.00333333	NS	0.03794474	15	0.00333333	NS
0.03692649	14	0.00357143	NS	0.16618416	14	0.00357143	NS
0.03961187	13	0.00384615	NS	0.25301481	13	0.00384615	NS
0.14228527	12	0.00416667	NS	0.27426826	12	0.00416667	NS
0.21299365	11	0.00454545	NS	0.31912111	11	0.00454545	NS
0.50007986	10	0.005	NS	0.37942738	10	0.005	NS
0.51406581	9	0.00555556	NS	0.48557481	9	0.00555556	NS
0.54869624	8	0.00625	NS	0.52158288	8	0.00625	NS
0.58318692	7	0.00714286	NS	0.69245897	7	0.00714286	NS
0.58635148	6	0.00833333	NS	0.72607116	6	0.00833333	NS
0.68804656	5	0.01	NS	0.81317135	5	0.01	NS
0.76700076	4	0.0125	NS	0.86463283	4	0.0125	NS
0.78544903	3	0.01666667	NS	0.97393483	3	0.01666667	NS
0.90250769	2	0.025	NS	1	2	0.025	NS
1	1	0.05	NS	1	1	0.05	NS

**Loreto**

<b>p</b>	<b>k</b>	<b><math>\alpha</math> /k</b>	<b>S / NS</b>
0.02574572	15	0.00333333	NS
0.03841393	14	0.00357143	NS
0.18692848	13	0.00384615	NS
0.28111648	12	0.00416667	NS
0.41671325	11	0.00454545	NS
0.43763726	10	0.005	NS
0.58822825	9	0.00555556	NS
0.60759494	8	0.00625	NS
0.69305794	7	0.00714286	NS
0.73279958	6	0.00833333	NS
0.74002715	5	0.01	NS
0.74814319	4	0.0125	NS
0.8437787	3	0.01666667	NS
0.84664377	2	0.025	NS
0.96925289	1	0.05	NS

\*75 / 75 comparaciones resultaron no significativas

p: valor de significancia; k= pruebas;  $\alpha$ /k= nivel de significancia de la prueba de Bonferroni; S= Significativo;  
NS= No significativo

## B) Todos los individuos del estudio o Genotipos totales (GT)

Portugués				Cabo Pulmo			
p	k	alfa/k	NS/S	p	k	alfa/k	NS/S
<b>0</b>	<b>15</b>	<b>0.003333333</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>0.003333</b>	<b>S</b>
<b>0.00059405</b>	<b>14</b>	<b>0.003571429</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>0.003571</b>	<b>S</b>
<b>0.00485149</b>	<b>13</b>	<b>0.003846154</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>0.003846</b>	<b>S</b>
<b>0.00485149</b>	<b>12</b>	<b>0.004166667</b>	<b>S</b>	0.00297	12	0.004167	NS
0.00564356	11	0.004545455	NS	0.02079	11	0.004545	NS
0.00891089	10	0.005	NS	0.02446	10	0.005	NS
0.0142574	9	0.005555556	NS	0.03525	9	0.005556	NS
0.029703	8	0.00625	NS	0.05069	8	0.00625	NS
0.0314851	7	0.007142857	NS	0.08614	7	0.007143	NS
0.0335644	6	0.008333333	NS	0.08634	6	0.008333	NS
0.069802	5	0.01	NS	0.10822	5	0.01	NS
0.0756436	4	0.0125	NS	0.17188	4	0.0125	NS
0.0779208	3	0.016666667	NS	0.27248	3	0.016667	NS
0.199901	2	0.025	NS	0.57564	2	0.025	NS
0.500891	1	0.05	NS	0.72168	1	0.05	NS
Canal				Isla Espiritu Santo			
p	k	alfa/k	NS/S	P	k	alfa/k	NS/S
<b>0</b>	<b>15</b>	<b>0.003333333</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>0.003333</b>	<b>S</b>
<b>0</b>	<b>14</b>	<b>0.003571429</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>0.003571</b>	<b>S</b>
<b>0</b>	<b>13</b>	<b>0.003846154</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>13</b>	<b>0.003846</b>	<b>S</b>
<b>0</b>	<b>12</b>	<b>0.004166667</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>12</b>	<b>0.004167</b>	<b>S</b>
<b>0</b>	<b>11</b>	<b>0.004545455</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>0.004545</b>	<b>S</b>
<b>0</b>	<b>10</b>	<b>0.005</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>10</b>	<b>0.005</b>	<b>S</b>
<b>0</b>	<b>9</b>	<b>0.005555556</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>9</b>	<b>0.005556</b>	<b>S</b>
<b>0</b>	<b>8</b>	<b>0.00625</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>0.00625</b>	<b>S</b>
<b>0</b>	<b>7</b>	<b>0.007142857</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>0.007143</b>	<b>S</b>
<b>0</b>	<b>6</b>	<b>0.008333333</b>	<b>S</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>0.008333</b>	<b>S</b>
<b>0</b>	<b>5</b>	<b>0.01</b>	<b>S</b>	<b>0.00158</b>	<b>5</b>	<b>0.01</b>	<b>S</b>
<b>0.00554</b>	<b>4</b>	<b>0.0125</b>	<b>S</b>	<b>0.00198</b>	<b>4</b>	<b>0.0125</b>	<b>S</b>
<b>0.00921</b>	<b>3</b>	<b>0.016666667</b>	<b>S</b>	0.02921	3	0.016667	NS
<b>0.02099</b>	<b>2</b>	<b>0.025</b>	<b>S</b>	0.06297	2	0.025	NS
0.27772	1	0.05	NS	0.09683	1	0.05	NS

<b>Loreto</b>			
<b>P</b>	<b>k</b>	<b>alfa/k</b>	<b>NS/S</b>
<b>0</b>	<b>15</b>	<b>0.003333333</b>	<b>S</b>
<b>0.0005</b>	<b>14</b>	<b>0.003571429</b>	<b>S</b>
0.08396	13	0.003846154	NS
0.09307	12	0.004166667	NS
0.15416	11	0.004545455	NS
0.18079	10	0.005	NS
0.19901	9	0.005555556	NS
0.22772	8	0.00625	NS
0.31406	7	0.007142857	NS
0.44782	6	0.008333333	NS
0.48901	5	0.01	NS
0.51446	4	0.0125	NS
0.58604	3	0.016666667	NS
0.65337	2	0.025	NS
0.73198	1	0.05	NS

\* 35 /75 comparaciones totales resultaron significativas

p: valor de significancia; k= pruebas;  $\alpha/k$ = nivel de significancia de la prueba de Bonferroni; S= Significativo;  
NS= No significativo