



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**CONECTIVIDAD GENÉTICA ENTRE
POBLACIONES DE ABULÓN AMARILLO (*Haliotis
corrugata*; Wood, 1828)**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales (Orientación en Pesquerías)

p r e s e n t a

Noé Díaz Viloría

La Paz, B.C.S. Agosto de 2009

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 6 del Mes de Agosto del 2009, 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:

"CONECTIVIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES DE ABULÓN AMARILLO (*Haliotis corrugata*; Wood, 1828)"

Presentada por el alumno:

Noé Díaz Viloría

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Pesquerías

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

LA COMISION REVISORA



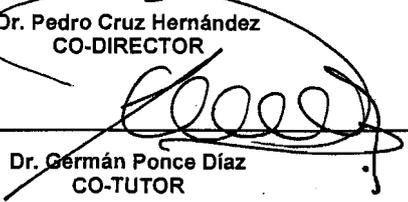
Dr. Ricardo Pérez Enríquez
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Pedro Cruz Hernández
CO-DIRECTOR



Dr. Sergio Antonio Guzmán del Prío
CO-TUTOR



Dr. Germán Ponce Díaz
CO-TUTOR



Dr. Ron S. Burton
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL

Co-directores de tesis:

Dr. Ricardo Pérez Enríquez CIBNOR, La Paz, B.C.S.

Dr. Pedro Cruz Hernández CIBNOR, La Paz, B.C.S.

Co-tutores:

Dr. Sergio Antonio Guzmán del Prío Instituto Politécnico Nacional, Escuela
Nacional de Ciencias Biológicas, México, D.F.

Dr. Germán Ponce Díaz Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas,
La Paz, B.C.S.

Dr. Ron S. Burton Scripps Institution of Oceanography,
University of California, San Diego.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Ricardo Pérez Enríquez

Dr. Germán Ponce Díaz

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Ron S. Burton

Dr. Sergio Antonio Guzmán del Prío

JURADO DE EXÁMEN DE GRADO

Dr. Ricardo Pérez Enríquez

Dr. Germán Ponce Díaz

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Ron S. Burton

Dr. Sergio Antonio Guzmán del Prío

Dr. Salvador Emilio Lluch Cota (Suplente)

RESUMEN

La historia de la pesquería del abulón amarillo (*Haliotis corrugata*) ha mostrado una tendencia hacia la disminución en las capturas, por lo que es recomendable un manejo adecuado para su recuperación. El entendimiento de la conectividad de las poblaciones marinas es vital para la conservación y manejo de las pesquerías. Las estimaciones de conectividad se obtienen de la estimación del flujo genético a partir de las diferencias genéticas entre poblaciones ó mediante el cálculo probabilístico del origen de un individuo. Un estudio de conectividad podría aportarnos información sobre escalas espaciales de dispersión larvaria y presencia de poblaciones fuente y sumidero. En *H. corrugata* algunos aspectos de su biología y ecología, tales como la escasa movilidad en juveniles y adultos, una fase larvaria planctónica relativamente breve, la presencia de giros, corrientes atenuadas por la topografía costera y mantos de *Macrocystis pyrifera*, así como estudios en donde se ha reportado divergencia genética-poblacional en varias especies de abulón (a diferentes escalas geográficas), han llevado a hipotetizar que el intercambio larvario entre bancos de *H. corrugata* es bastante limitado. Por ello, la estimación de la conectividad entre bancos constituye un aspecto importante. El objetivo del presente estudio fue determinar mediante el uso de marcadores genéticos si existe conectividad entre poblaciones de abulón amarillo a dos escalas: una a lo largo de la distribución de la especie y la otra, a nivel local, entre y dentro de bancos. El trabajo se dividió en dos partes: la obtención de marcadores genéticos tipo microsatélites y la aplicación de estos para el análisis de la conectividad entre poblaciones silvestres.

Se obtuvieron trece marcadores moleculares, diez mediante el aislamiento de microsatélites especie-específico y tres por amplificación de microsatélites diseñados en *H. kamtschatkana*. De estos, nueve microsatélites presentaron equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) y/o herencia Mendeliana, tres presentaron desequilibrio de HW y un locus mostró proporciones genotípicas que no se ajustaron a herencia Mendeliana, corroborándose en este último la presencia de alelos nulos. De acuerdo a esas características, se determinó la aplicación mas adecuada de cada uno de los microsatélites (loci) en términos de su calidad para estimaciones de frecuencias alélicas o para análisis de parentesco.

El estudio de la conectividad se realizó a través de dos métodos: indirecto y directo. En el método indirecto la conectividad en la escala del intervalo de distribución del abulón amarillo, se estimó a través de las diferencias genéticas entre poblaciones empleando siete loci (*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco97*, *Hco194* y *Hka56*). Se obtuvieron muestras de abulones adultos de una localidad norteamericana (San Clement Island, California) y cuatro localidades mexicanas localizadas en la península de Baja California (Isla Cedros, Isla Natividad, La Bocana y San Juanico). Se observó divergencia poblacional ($F_{ST} = 0.021$, $P = 0.0008$) entre San Clemente Island y las localidades mexicanas y homogeneidad genética entre las localidades mexicanas. La principal explicación de la conectividad restringida entre San Clemente Island y las localidades mexicanas fue el aislamiento histórico por distancia, mientras que la fuerte conectividad entre las localidades mexicanas se explica por la sincronización de eventos de desove durante la aparición de la contracorriente de California sobre una escala de cientos de generaciones.

Mediante el método indirecto también se obtuvieron estimaciones de conectividad genética entre localidades vecinas (El Riíto y La Bocana). Se analizaron muestras de adultos y juveniles de *H. corrugata*, con ocho loci (*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco97*, *Hco194*, *Hka3* y *Hka56*). Los resultados no revelaron diferencias significativas entre El Riíto y La Bocana ($F_{ST} = -0.0058$; $P = 0.9964$) indicando una fuerte conectividad genética entre ellas.

Para estimar la conectividad de *H. corrugata* sobre una escala local (dentro de bancos) se aplicó el método directo. Se realizaron pruebas de parentesco con las muestras de adultos y juveniles de El Riíto, empleando cinco loci (*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22* y *Hka56*). La asignación de siete juveniles (16.3%) como descendientes potenciales de adultos colectados en la misma localidad (El Riíto), sugiere un cierto grado de retención larvaria ó autoreclutamiento sobre una escala de un número reducido de generaciones.

Tanto el autoreclutamiento como la conectividad entre bancos juegan un papel muy importante dentro de la dinámica poblacional de *H. corrugata*. La fuerte conectividad entre poblaciones cercanas plantea la posibilidad de recuperación de poblaciones disminuidas, a través del aporte larvario al reclutamiento total de cada población local. Por tal razón el manejo de la pesquería no solo debe considerar el efecto de la reducción poblacional a nivel local, sino también debe considerar las posibles consecuencias sobre los patrones de conectividad entre localidades.

Palabras clave: *Halotis corrugata*, microsatélites, conectividad genética, diversidad genética, diferenciación genética.

ABSTRACT

The pink abalone (*Haliotis corrugata*) fishery has steadily declined. A management plan for its recovery is recommended. Understanding genetic connectivity is vital to this procedure. Connectivity is obtained by estimating gene flow, genetic differences among populations or probabilistic assessment of individual origin. A connectivity study could provide information of larval dispersal over several spatial scales and the presence of source and sink populations. Some of biological and ecological aspects of pink abalone, such as low mobility in juveniles and adults, relatively short planktonic larval phase, presence of eddies, attenuated currents near local reef topography or kelp canopies, and genetic population divergence over different geographic scales in other abalone species, have led to the hypothesis that interchange of pink abalone larvae among reefs is very limited. This is the main reason why it is important to estimate connectivity among locations. The major objective of this study was to estimate genetic connectivity among pink abalone populations using genetic markers at two scales: one dealing with the geographic distribution interval of the species and the other at the local level, between and within abalone beds. This study is in two parts: the development of genetic markers and the application of the markers for the connectivity analyses among several wild populations.

Thirteen molecular markers were obtained, ten by isolating species-specific microsatellites and three by cross-amplification of *H. kamtschatkana* microsatellites. Of those, nine showed Hardy-Weinberg equilibrium and/or Mendelian inheritance, three showed Hardy-Weinberg disequilibrium, and one locus showed genotype ratios that were not Mendelian, demonstrating the existence of null alleles. Based on their characteristics, the quality of each microsatellite locus was determined for its suitability for allelic frequencies estimates or for parentage analysis.

The connectivity study used an indirect and a direct method. Connectivity with the indirect method was estimated by genetic differences among populations, using seven loci (*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco97*, *Hco194*, and *Hka56*). Samples of adult abalones were obtained from San Clemente Island, California and four Mexican locations (Isla Cedros, Isla Natividad, La Bocana, and San Juanico). Population divergence between San Clemente Island and the Mexican locations was significant ($F_{ST} = 0.021$; $P = 0.0008$), but genetic homogeneity among Mexican locations was observed. Over a scale of hundreds of generations, the main explanation for the restricted genetic connectivity between San Clemente Island and the Mexican locations is the historic isolation over distance, while the strong connectivity among Mexican locations was explained by the synchronized spawning events when the California Countercurrent was present.

Estimates of connectivity between neighbor locations (El Riíto and La Bocana) were obtained with the indirect method. Samples of adults and juveniles were analyzed with eight loci (*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco97*, *Hco194*, *Hka3* and *Hka56*). Results did not show significant differences between El Riíto and La Bocana ($F_{ST} = -0.0058$; $P = 0.9964$), demonstrating strong genetic connectivity between them.

Estimate of connectivity over a local scale (within reefs) were obtained with the direct method. A parentage analysis of adults and juveniles samples from El Riíto used five loci (*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, and *Hka56*). Seven juveniles (16.3%) were assigned as

putative descendants of adults collected in the same location, suggesting a small proportion of larval retention or self-recruitment over a few generations.

Self-recruitment, as well as connectivity among sites plays a very important role in the population dynamics of pink abalone. Strong connectivity among neighboring populations suggests the possibility of restoration of depleted populations through larval contributions to the total recruitment of each local population. Consequently, fishery management should account for the local causes for reduction of populations, but also consider the consequences of connectivity patterns among locations.

Key words: *Haliotis corrugata*, microsatellites, genetic connectivity, genetic diversity, genetic differentiation.

DEDICATORIA

A Dios, quien me ha permitido llegar a este momento, sin el nada sería.

A mi madre Bricia María Viloría González, quien me ha enseñado el verdadero significado del amor de una madre.

A mi padre Ramón Porfirio Díaz Cruz, de quien tomo mi modelo de esfuerzo y perseverancia.

A mi tía Guadalupe Díaz Cruz, por el apoyo incondicional que me ha brindado.

A mi hija Tania María Díaz Jiménez, quien es mi fortaleza y templanza.

A mi hija Sofía Areli Díaz Jiménez, quien es mi corazón y energía interminable.

A Vianey, quien ha estado luchando a mi lado día a día y a quien debo mucho. Sin tu apoyo no lo hubiera logrado.

A mis hermanos: Bricia, Delfino y Héctor

A Carito, María y Moncho que junto con mis hijas representan la continuación de mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios.

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización de mi doctorado.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, que permitió que continuara con mi formación académica. Un agradecimiento especial al departamento de posgrado del CIBNOR.

Al Dr. Ricardo Pérez Enríquez y al Dr. Pedro Cruz Hernández, por la dirección de esta tesis, el inmenso apoyo brindado y por su amistad.

Al comité tutorial de esta tesis quienes semestre a semestre fueron ajustando y redefiniendo el trabajo de tesis. Además por sus asesorías, observaciones precisas, sus comentarios y sugerencias.

A Susana Avila Alvarez, técnico responsable del laboratorio de Genética Acuícola, así como a Norma Angélica Ochoa Álvarez y María Sofía Ramos Galván, técnicos del laboratorio de Diagnóstico Microbiológico.

A Horancio Sandoval y Manuel Melero, encargados del centro de cómputo de posgrado.

A quienes contribuyeron en alguna medida al desarrollo de la tesis: Giovanni, Santiago y Kristen, así como a todos mis compañeros de laboratorio: Fide, Gabi, Clarissa, Rosi, Karina, Miguel Tripp, Armando, Manuel y Fernando.

Por último agradezco a mis compañeros del posgrado por el apoyo brindado: Horacio, Claudia, Gabi, Jorge Ramos, Alejandro Ramos, Alfonso Medel, Miguel Correa, Alfonso Galicia, Liliana, Berenice, Gustavo, Jorge Vasquez, Vanessa, Nacho, Alberto y Monica.

CONTENIDO

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. MARCO GENERAL	1
1.1.1. Historia de la pesquería del abulón en México	1
1.1.2. Distribución y biología de <i>Haliotis corrugata</i>	3
1.1.3. Variación genética y eficacia biológica en poblaciones naturales	5
1.1.4. Conectividad entre poblaciones naturales	5
1.1.5. Marcadores moleculares.....	8
1.2. ANTECEDENTES.....	9
1.2.1. Estudios de biología y ecología.....	9
1.2.2. Desarrollo de marcadores moleculares tipo microsatélites y determinación de herencia Mendeliana.....	10
1.2.3. Estudios genético-poblacionales	12
1.2.4. Estudios de conectividad genética mediante el análisis de nuevos reclutas.....	12
1.3. JUSTIFICACIÓN	13
2. HIPÓTESIS.....	15
3. OBJETIVOS	15
3.1. GENERAL	15
3.2. PARTICULARES.....	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. OBTENCIÓN DE MICROSATÉLITES EN <i>H. corrugata</i>	16
4.1.1. Extracción de ADN	16
4.1.2. Microsatélites	17
4.1.2.1. Amplificación cruzada	17
4.1.2.2. Aislamiento de Microsatélites.....	17
4.1.3. Optimización de PCR.....	19
4.1.4. Caracterización de microsatélites.....	20
4.1.5. Análisis de diversidad genética	20
4.1.6. Equilibrio de Hardy-Weinberg y Desequilibrio de Ligamiento	20
4.2. DETERMINACIÓN DE HERENCIA MENDELIANA EN MICROSATÉLITES DE <i>H. corrugata</i>	21
4.2.1. Obtención de familias	21
4.2.2. Extracción de ADN.....	21
4.2.3. Amplificación de microsatélites.....	22
4.2.4. Pruebas de segregación Mendeliana	22
4.3. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE <i>H. corrugata</i>	23
4.3.1. Colecta de muestras silvestres.....	23
4.3.2. Extracción de ADN y amplificación de microsatélites	25
4.3.4. Análisis de datos	25
4.3.4.1. Análisis de tallas	25
4.3.4.2. Análisis genético	26
4.4. CONECTIVIDAD GENÉTICA ENTRE DOS LOCALIDADES.....	29
4.4.1. Experimento de repoblamiento de abulón amarillo en “El Riíto”.....	29
4.4.2. Obtención de muestras de La Bocana	31
4.4.3. Definición de los grupos de edad	32
4.4.4. Extracción de ADN	33

4.4.4.1 El Riíto	33
4.4.4.2. La Bocana.....	34
4.4.5. Amplificación de microsatélites.....	34
4.4.6. Diversidad genética.....	34
4.4.7 Diferenciación genética entre muestras de adultos y juveniles de la misma localidad ...	35
4.4.8. Diferenciación entre localidades	36
4.4.9. Análisis de Parentesco en El Riíto	36
5. RESULTADOS	39
5.1. OBTENCIÓN DE MICROSÁTELITES EN <i>H. corrugata</i>	39
5.1.1. Microsatélites.....	39
5.1.1.1. Amplificación cruzada	39
5.1.1.2. Aislamiento de Microsatélites.....	39
5.1.2. Optimización de Microsatélites.....	45
5.1.3. Estimación de la diversidad genética de los microsatélites, en una muestra silvestre ...	46
5.1.4. Equilibrio de Hardy-Weinberg y Desequilibrio de Ligamiento.....	46
5.2. DETERMINACIÓN DE HERENCIA MENDELIANA EN MICROSÁTELITES DE <i>H. corrugata</i>	47
5.2.1. Pruebas de segregación mendeliana.....	47
5.2.1.1. Familia A.....	48
5.2.1.2. Familia B.....	50
5.2.1.3. Familia C.....	52
5.3. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE <i>H. corrugata</i>	55
5.3.1. Análisis de tallas	55
5.3.1.1. Diferencias entre localidades	55
5.3.1.2. Diferencias entre sexos	56
5.3.2. Análisis genético	57
5.3.2.1. Diversidad genética.....	57
5.3.2.2. Diferencias entre localidades	60
5.3.2.4. Aislamiento por distancia y flujo genético.....	63
5.4. CONECTIVIDAD ENTRE DOS LOCALIDADES.....	63
5.4.1. Definición de grupos de edad.....	63
5.4.2. Análisis genético	64
5.4.2.1. El Riíto	64
5.4.2.2. La Bocana.....	64
5.4.3. Diferenciación genética entre adultos y juveniles de la misma localidad	75
5.4.4. Diferenciación genética entre localidades.....	76
5.4.5. Análisis de parentesco en El Riíto	77
6. DISCUSIÓN	82
6.1. OBTENCIÓN DE MICROSÁTELITES EN <i>H. corrugata</i>	82
6.2. DETERMINACIÓN DE HERENCIA MENDELIANA EN MICROSÁTELITES DE <i>H. corrugata</i>	87
6.3. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL	90
6.4. CONECTIVIDAD GENÉTICA ENTRE DOS LOCALIDADES.....	98
7. CONCLUSIONES	108
7.1. OBTENCIÓN DE MICROSÁTELITES EN <i>H. corrugata</i>	108
7.2. DETERMINACIÓN DE HERENCIA MENDELIANA EN MICROSÁTELITES DE <i>H. corrugata</i>	109
7.3. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL	110
7.4. CONECTIVIDAD GENÉTICA ENTRE DOS LOCALIDADES.....	111

8. RECOMENDACIONES	113
LITERATURA CITADA	117
APÉNDICES	131
Apéndice I.....	131
Apéndice II.....	132
Apéndice III	138
DATOS	140
PUBLICACIONES	152

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tendencia histórica de la captura de abulón en la Península de Baja California México (a), y composición por especies en la pesquería mexicana de abulón (Temporada 1990-2003) (b), gráficas tomadas de Sierra-Rodríguez <i>et al.</i> (2006).	3
Figura 2. Diagrama general del aislamiento de microsátelites. PCR, reacción en cadena de la polimerasa (de sus siglas en ingles).	18
Figura 3. Localidades seleccionadas para el análisis poblacional.	24
Figura 4. Sitios de colecta de juveniles de <i>H. corrugata</i> .	31
Figura 5. Patrones de bandeo de microsátelites polimórficos en <i>H. corrugata</i> , que resultaron de la amplificación cruzada de microsátelites diseñados en <i>H. kamtschatkana</i> (<i>Hka3</i> , <i>Hka40</i> y <i>Hka56</i>).	39
Figura 6. Geles de agarosa (1%) en donde se aprecian: (A) ADN de buena calidad, (B) ADN sin digerir (pozo 1) y ADN digerido con la enzima de restricción <i>Rsa I</i> (pozo 2), (C) productos de PCR del ADN digerido-ligado y (D) productos de PCR de ADN enriquecido, el último pozo a la derecha de los geles C y D corresponden a un marcador de tamaño y masa conocido.	40
Figura 7. Geles de agarosa (1%) en donde se muestran algunas clonas obtenidas con la sonda (GT) ₁₅ (A), algunas clonas obtenidas con la sonda (CT) ₁₅ (B) y algunas clonas obtenidas con la mezcla de sondas (GT) ₁₅ y (CT) ₁₅ (C), el último pozo a la derecha corresponde a un marcador de tamaño y masa conocido.	41
Figura 8. Diagrama porcentual del rendimiento de genotecas generadas en <i>H. corrugata</i> .	42
Figura 9. Patrones de bandeo en 10 nuevos microsátelites de <i>H. corrugata</i> .	44
Figura 10. Genotipos de la misma larva en la familia A, con tres alelos (flecha negra) en tres loci diferentes.	50
Figura 11. Genotipos en una misma larva (flecha negra), de la familia C detectados en la familia B.	52
Figura 12. Genotipos de la misma larva en la familia C, con tres alelos (flecha negra) en dos loci diferentes.	54
Figura 13. Gráfico de Caja con bigotes para las medias de longitud de concha de las localidades San Clemente Island (1), Isla Cedros (2), Isla Natividad (3), La Bocana (4) y San Juanico (5).	56
Figura 14. Gráfico del promedio de la longitud de concha por sexo para la muestra de Isla Cedros. 1; Hembras, 2; Machos.	56

Figura 15.	Frecuencias alélicas de <i>Haliotis corrugata</i> con siete microsátélites en cinco localidades: San Clemente Island (SCI), Isla Cedros (IC), Isla Natividad (IN), La Bocana (LB) y San Juanico (SJ). Los loci <i>Hco15</i> y <i>Hco19</i> únicamente muestran los cinco alelos más comunes de 28 y 26 alelos, respectivamente.	58
Figura 16.	Dendograma UPGMA de las relaciones entre muestras basado en las distancias de Reynolds. Los valores de las ramas se sustentaron en 5,000 réplicas bootstrap.	62
Figura 17.	Estimados de poder estadístico bajo condiciones simuladas con el programa POWSIM y evaluado por pruebas exactas de Fisher para: (a) Tamaño de muestra y (b) Número de loci polimórficos.	62
Figura 18.	Frecuencias alélicas en adultos y juveniles de El Riíto	66
Figura 19.	Frecuencias alélicas en adultos y juveniles de La Bocana	69
Figura 20.	Probabilidades de exclusión de falsos padres en la asignación de juveniles a adultos de El Riíto.	78
Figura 21.	Parejas de padres obtenidas a través del análisis de parentesco con tres, cuatro y cinco loci. En cuadrados los adultos de <i>H. corrugata</i> trasplantados (marcados), en elipses los adultos residentes (no marcados) y en círculos los juveniles. Cada número denota el secuencial de la marca en el caso de los adultos trasplantados ó el sucesivo de colecta en el caso de adultos residentes y juveniles. En color gris las asignaciones que prevalecieron después del análisis de cinco loci.	80

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I.	Adultos y juveniles de <i>H. corrugata</i> colectados en el Riíto, fechas de colecta, números de marcas y tallas.	30
Tabla II.	Resumen de regiones microsatélites encontradas en <i>H. corrugata</i> entre las seis genotecas.	43
Tabla III.	Temperaturas de acoplamiento (T_a), concentraciones de $MgCl_2$ (mM) y Número de ciclos empleados en la amplificación de microsatélites de abulón amarillo <i>Haliotis corrugata</i>	45
Tabla IV.	Caracterización de microsatélites en el abulón amarillo <i>Haliotis corrugata</i> . n , tamaño de muestra; N_A , número de alelos; H_O , heterocigosidad observada; H_E , heterocigosidad esperada. * Desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.006$).	47
Tabla V.	Segregación de loci de microsatélites en larvas de <i>Haliotis corrugata</i> de la familia A.	49
Tabla VI.	Segregación de loci de microsatélites en larvas de <i>Haliotis corrugata</i> de la familia B.	51
Tabla VII.	Segregación de loci de microsatélites en larvas de <i>Haliotis corrugata</i> de la familia C.	53
Tabla VIII.	Prueba de Kruskal-Wallis: $H(4, N= 327) = 121.6486 P = 0.000$. Valores de P para comparaciones múltiples (2 colas), en negritas las diferencias significativas.	55
Tabla IX.	Diversidad genética de <i>Haliotis corrugata</i> , usando siete microsatélites en cinco localidades: San Clemente Island (SCI), Isla Cedros (IC), Isla Natividad (IN), La Bocana (LB) y San Juanico (SJ). Los simbolos son: Tamaño de muestra (n), Número de alelos (N_A), Número de alelos efectivos (N_{EA}), Heterocigosidades observadas (H_O), Heterocigosidades esperadas (H_E), y probabilidades de pruebas exactas de Fisher (P).	59
Tabla X.	Estimados de F_{ST} pareados entre localidades (arriba de la diagonal) y sus valores de P respectivos (debajo de la diagonal). Localidades: San Clemente Island (SCI), Isla Cedros (IC), Isla Natividad (IN), La Bocana (LB), y San Juanico (SJ).	61
Tabla XI.	Resultados del AMOVA jerárquico de diferencias poblacionales con siete loci en dos grupos: (1) Localidad de E.U. (San Clemente Island) y (2) Localidades mexicanas (Isla Cedros, Isla Natividad, La Bocana y San Juanico).	61
Tabla XII.	Composición de grupos de edad por tallas en juveniles de <i>H. corrugata</i> de El Riíto y La Bocana.	64

Tabla XIII.	Tamaño de muestra (n), número de individuos de los cuales se extrajo ADN y número de individuos en los que se amplificaron los ocho loci vía PCR.	65
Tabla XIV.	Estimadores de diversidad genética en adultos y juveniles de El Riíto y La Bocana. (n), Tamaño de muestra; N_A , Número de alelos; H_E , Heterocigosidad esperada; H_O , Heterocigosidad observada.	74
Tabla XV.	Desequilibrio de ligamiento en 8 de 28 pares de loci, para las muestras de adultos y juveniles de <i>H. corrugata</i> de El Riíto y La Bocana, gpos. I, II, respectivamente.	75
Tabla XVI.	Estimados de F_{ST} y valores de P (50,175 permutaciones) de AMOVAs globales entre adultos y juveniles de El Riíto y La Bocana con ocho y siete loci (excluyendo <i>Hka3</i>).	76
Tabla XVII.	Estimados de F_{ST} pareados, arriba de la diagonal, y valores de P respectivos (10,100 permutaciones) debajo de la diagonal, entre adultos y juveniles de El Riíto y La Bocana con ocho (parte superior) y siete loci (parte inferior).	76
Tabla XVIII.	Índices de fijación de AMOVA jerárquicos con ocho y siete loci, y pruebas de significancia P (50,175 permutaciones).	77
Tabla XIX.	Caracterización genética de los loci candidatos a emplearse en el análisis de parentesco. Tamaño de muestra (n), número de alelos (N_A), contenido de información polimórfica (PIC), Heterocigosidades observadas (H_O) y esperadas (H_E), frecuencias de alelos nulos (f nulos) y pruebas de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW).	78
Tabla XX.	Análisis de parentesco en El Riíto con cinco loci, en donde los juveniles fueron asignados a una pareja de adultos con marca y/o sin marca como posibles padres.	79
Tabla XXI.	Estimadores de diversidad genética; número de alelos (N_A) y heterocigosidad observada (H_O), obtenidos en poblaciones naturales de <i>Haliotis</i> spp., mediante el uso de microsatélites.	92

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MARCO GENERAL

1.1.1. Historia de la pesquería del abulón en México

A lo largo de la costa oeste de la Península de Baja California, México se encuentran distribuidas siete de las ocho especies de Haliótidos ó abulones de Norteamérica; *Haliotis fulgens* (abulón azul), *H. corrugata* (amarillo), *H. cracherodii* (negro), *H. rufescens* (rojo), *H. sorenseni* (chino), *H. assimilis* (rayado) y *H. walallensis* (aplanado) (Sierra-Rodríguez *et al.*, 2006); sin embargo la pesquería del abulón se sustenta principalmente en dos especies: azul y amarillo. Esta pesquería tuvo sus inicios desde 1860 con la incursión de pescadores chinos, quienes tenían su base en San Diego, Cal., E.U.A. y que posteriormente fueron remplazados por buzos japoneses. En 1940 incursionaron los pescadores mexicanos, constituyéndose las primeras organizaciones cooperativas (León-Carballo y Muciño-Díaz, 1996). De 1956 a 1984 la pesquería se manejó por tallas mínimas y vedas estacionales. Después de 1984 se introdujeron controles más estrictos y evaluaciones del stock más rigurosas, con las que se reforzaron por primera vez las longitudes mínimas legales (145 mm de longitud de concha para *H. fulgens* y 135 mm para *H. corrugata*). Después de estudios preliminares en 1985, se hicieron estudios anuales a partir de 1988, con buzos de las cooperativas supervisados por personal de investigación. De 1990 a 1995 se fijaron cuotas anuales de captura para cada Cooperativa, permitiendo extraer el 30% de abulón de tamaño legal. En 1996, las cuotas se basaron en los estimados de biomasa de pre-reclutas, proximos a reclutarse en la pesquería durante el año. En 1997 fue usado el modelo de producción de excedente, modificado para incluir

el efecto ambiental de las anomalías de la temperatura promedio del mar, para estimar el exceso disponible a captura. Las cuotas fueron fijadas por negociación entre el Instituto Nacional de la Pesca (INP) y las cooperativas. En 1997, por regulación interna de los buzos de las cooperativas, los tamaños límites en las dos principales especies incrementaron 5 mm (Shepherd *et al.*, 1998).

La tendencia histórica de la captura de abulón es la siguiente. De 1947 en adelante las capturas presentaron incrementos hasta llegar a 5,993 t (su registro más alto) en 1950, en años subsecuentes los volúmenes declinaron. Entre 1956 y 1976 la captura se mantuvo alrededor de las 3000 t. De 1977 a 1984 la pesquería se caracterizó por una notoria disminución en sus capturas hasta un nivel de poco más de 400 t. A partir de 1985 se observó un incremento, alcanzando las 900 t en 1990. Entre 1993 y 1995 las cuotas de captura descendieron a 520 t. Entre 1999 y 2003, las capturas de abulón se mantuvieron por debajo de las 300 t (Sierra-Rodríguez *et al.*, 2006) (Fig. 1a,b). Cabe señalar que hasta 1970 el abulón amarillo comprendía 70–80% de la captura, mientras que de 1990 a 2003 solo tuvo una aportación promedio del 19.8% en las capturas totales (Shepherd *et al.*, 1998; Sierra-Rodríguez *et al.*, 2006) (Fig. 1b), lo que significa que las capturas de esta especie disminuyeron drásticamente en las últimas tres décadas y no se han recuperado en comparación a sus aportaciones históricas.

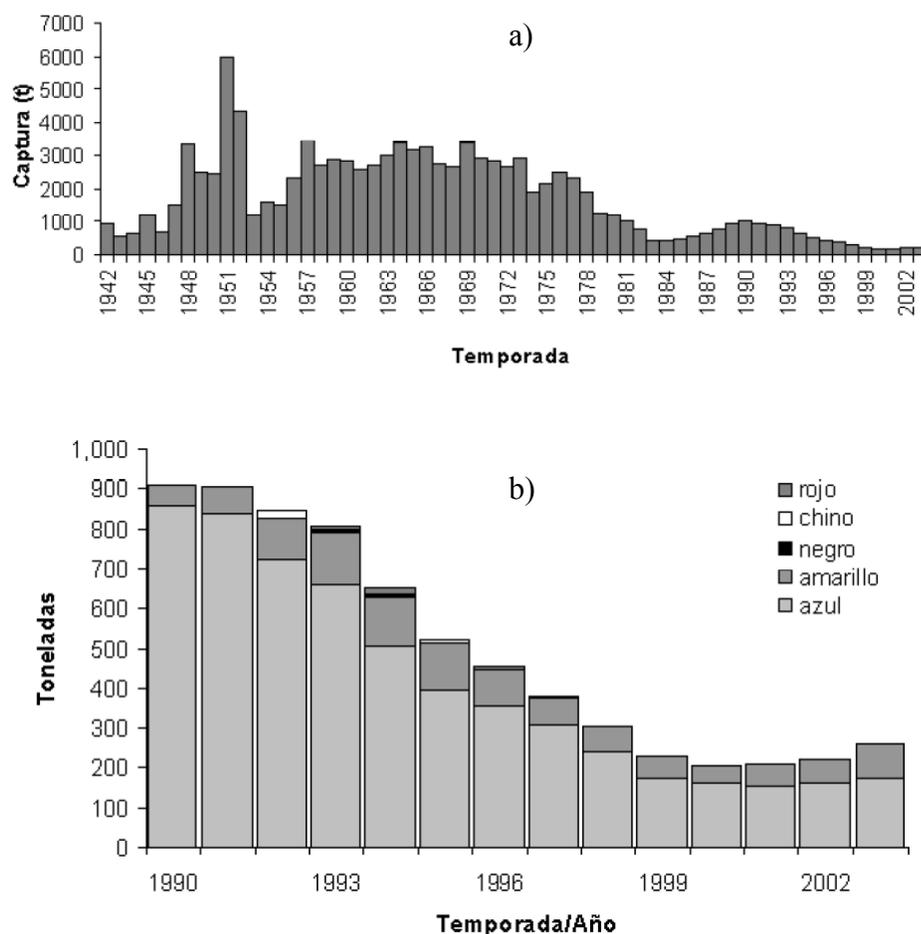


Figura 1. Tendencia histórica de la captura de abulón en la Península de Baja California México (a), y composición por especies en la pesquería mexicana de abulón (Temporada 1990-2003) (b), gráficas tomadas de Sierra-Rodríguez *et al.* (2006).

1.1.2. Distribución y biología de *Haliotis corrugata*

El abulón amarillo se distribuye desde Point Conception, California (34.5°N, 120.5°W) hasta Isla Margarita, Baja California Sur (25.4°N, 111.8°W) (Cox, 1962). Su distribución batimétrica va de de 3 a 30 m de profundidad, presentando sus mayores densidades entre los mantos de *Macrocystis pyrifera* de los 8 a los 24 m. Esta especie sirve como hábitat y alimento (Maeda-Martínez *et al.*, 1994; Guzmán-del Próo *et al.*, 2000). Las

poblaciones de abulón amarillo se distribuyen en agregaciones discontinuas, esta discontinuidad se relaciona con la heterogeneidad de los sustratos arrecifales rocosos y a la discontinuidad de los mantos de macroalgas. El periodo reproductivo de *H. corrugata* generalmente se presenta desde los meses de verano, con mayor intensidad en otoño e inicio de invierno (Ortíz-Quintanilla *et al.*, 1990). Los abulones son dioicos, desovadores externos, liberando sus gametos directamente en el agua para su fertilización. Los abulones presentan desoves sincronizados como respuesta a estímulos extrínsecos que podrían ser químicos (desencadenantes bioactivos) ó físicos (cambios de temperatura abruptos) (Leighton, 2000). Después de la fertilización los huevos presentan flotabilidad negativa y después de 12 a 18 h eclosionan las larvas trocoforas. Inmediatamente después de que eclosionan, las larvas trocoforas nadan a la superficie (geotaxis negativa) y permanecen cerca de la superficie (10 cm). Después de las 24–30 h de la fertilización las larvas veliger nadan en la capa superficial de los 10 m. El desarrollo larvario planctónico de *H. corrugata* va de 4–17 días, dependiendo principalmete de la temperatura (Leighton, 1974; Leighton, 2000). Después de este periodo las larvas inician el asentamiento, un periodo de exploración y reconocimiento del fondo marino, entrando en contacto con el sustrato y respondiendo a pistas químicas, dando paso a la metamorfosis de una forma pelágica a una béntica (McShane, 1992; Maeda-Martínez *et al.*, 1994). Después del asentamiento y en su estadio juvenil sus movimientos son muy limitados (5 m en una noche). Los abulones adultos aunque se pueden mover libremente y son capaces de viajar como caracoles, usualmente permanecen inmóviles a la espera de fragmentos de algas que se encuentran a la deriva (Leighton, 2000).

1.1.3. Variación genética y eficacia biológica en poblaciones naturales

Las ciencias pesqueras modernas demandan un manejo holístico de las pesquerías ó hacer acopio de toda aquella información que caracterice los procesos poblacionales de la especie en su medio; este concepto incluye el mantenimiento de la diversidad genética y estructura poblacional, que son críticos para asegurar la supervivencia de la pesquería a largo plazo (De La Rosa-Velez y Rodríguez-Romero, 1989; Shepherd y Brown, 1993 en Zúñiga *et al.*, 2000). El teorema fundamental de la selección natural establece que la tasa de eficacia biológica de una población es igual a su varianza genética en eficacia biológica en un momento determinado (Fisher, 1930 en De La Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989). Si la eficacia biológica de una especie, en términos de adaptabilidad, depende de la cantidad de variación genética presente en sus poblaciones, dentro del intervalo de distribución de la especie, entonces el mantenimiento de un nivel de variabilidad genética alto proporcionará una ventaja adaptativa a sus poblaciones ante las fluctuaciones ambientales. Por lo tanto, para el desarrollo de planes de manejo y conservación de las pesquerías se ha venido incorporando el conocimiento de la diversidad genética, estructura de la población y conectividad (Hamm y Burton, 2000; Zúñiga *et al.*, 2000; Hedgecock *et al.*, 2007). El entendimiento de la conectividad de las poblaciones marinas es vital para la conservación y manejo de las pesquerías, particularmente para el diseño estratégico de sistemas de reservas (Hedgecock *et al.*, 2007).

1.1.4. Conectividad entre poblaciones naturales

La conectividad es el alcance en el que las poblaciones de una especie están ligadas por intercambio de larvas, reclutas, juveniles ó adultos (Palumbi, 2003). Sin embargo tal

intercambio, conocido como migración, significa no solo dispersión de un lugar a otro sino también la supervivencia y reproducción de migrantes, de tal forma que contribuyan a la poza genética local que se perpetua hacia las siguientes generaciones (Hedgecock *et al.*, 2007).

Existen dos métodos para estimar la conectividad genética entre poblaciones marinas; los métodos indirectos y los métodos directos. Los métodos indirectos estiman el flujo genético a partir de las diferencias genéticas entre poblaciones y se basan en los modelos teóricos de estructura poblacional, tales como el “Modelo de Islas” de Sewall Wright. Estos métodos emplean la varianza estandarizada de las frecuencias alélicas entre poblaciones (F_{ST}), para medir la diferenciación entre subpoblaciones y a partir del valor de F_{ST} se hacen las estimaciones de flujo genético (Hedgecock *et al.*, 2007). Sin embargo tales estimaciones de conectividad son sobre escalas de tiempo evolutivas (cientos de miles de generaciones) y no necesariamente reflejan patrones de intercambio genético en las poblaciones actuales. Por ejemplo, si una barrera a la dispersión repentinamente divide a una población, las dos poblaciones resultantes completamente aisladas divergirán a través del tiempo por deriva genética y selección diversificadora, sin embargo la tasa de divergencia puede ser lenta, dependiendo de los tamaños efectivos de las dos poblaciones. La ausencia de varianza en las frecuencias alélicas podría simplemente reflejar tiempo insuficiente desde la separación para establecer el equilibrio deriva-migración (Hedgecock *et al.*, 2007).

Los métodos directos, por otro lado, se enfocan a la asignación de individuos a poblaciones de origen ó a padres específicos y de esta manera son similares conceptualmente a la evidencia obtenida por marcas ambientales, físicas ó químicas. Los

estimados directos de conectividad vía pruebas de asignación ó parentesco toman ventaja de los marcadores moleculares variables para calcular la probabilidad de que un individuo haya sido originado de una fuente particular ó un conjunto de padres. Los métodos directos sobresalen en estimar la conectividad ó retención sobre una ó varias generaciones (Hedgecock *et al.*, 2007).

La percepción de la conectividad poblacional en escalas de tiempo ecológicamente relevantes se logra con programas de muestreo que incluyan nuevos reclutas. La variación natural en el éxito reproductivo puede algunas veces marcar a los nuevos reclutas con marcas genéticas distintivas. Se puede tomar ventaja de tal variación genética para hacer inferencias sobre los patrones de retención larvaria y conectividad poblacional (Thorrold, *et al.*, 2002). En muchas especies marinas la conectividad se lleva a cabo por el intercambio de larvas (dispersión larvaria). Un estudio de larvas que recientemente ingresaron en una población (nuevos reclutas), podría aportarnos información sobre conectividad en poblaciones actuales, las escalas espaciales de dispersión larvaria y la presencia de poblaciones fuente y sumidero.

Aunque el panorama ofrecido por los estimados indirectos de flujo genético deben de ser siempre considerados, es probable que los métodos directos genéticos sobresalgan en estudios futuros enfocados a procesos y escalas de tiempo ecológicas (Hedgecock *et al.*, 2007). Además los métodos directos pueden medir las distancias de dispersión larvaria, apoyándose en la identificación de la localidad de los padres de un individuo, mediante el uso de marcadores genéticos altamente polimórficos y técnicas de asignación basadas en probabilidad (Planes *et al.*, 2009).

1.1.5. Marcadores moleculares

En genética de poblaciones un marcador molecular es cualquier diferencia bioquímica ó molecular de ADN que nos permite identificar individuos y poblaciones. Los marcadores moleculares son requeridos para conocer la diversidad genética, cuantificar cómo se encuentra distribuida entre stocks (estructura genética–poblacional) y para seguir la pista de movimientos de individuos entre stocks (conectividad) (Shaklee y Currens, 2003; Freeland, 2007). Los avances en la biología molecular y bioquímica han permitido el desarrollo de una variedad de marcadores genéticos que pueden ser utilizados para dirigir preguntas de relevancia en el manejo y conservación de las especies (Ferguson y Danzmann, 1998). Los marcadores genéticos comunes incluyen a las alozimas, ADN mitocondrial, Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórfico amplificado azarosamente (RAPD), polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), microsatélites y polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP) (Liu y Cordes, 2004). Dentro de estos marcadores genéticos los microsatélites ó repeticiones de secuencias sencillas (SSR) son fracciones de ADN de 1 a 6 bases (motivo de repetición) que se repiten sucesivamente varias veces. Están presentes en regiones codificantes y no codificantes y usualmente se caracterizan por un alto grado de polimorfismo en tamaño. El origen de tal polimorfismo se piensa es producto de eventos de deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN, resultando en diferencias en el número de unidades de repetición (Zane *et al.*, 2002; Liu y Cordes, 2004). Los microsatélites presentan herencia Mendeliana y son marcadores codominantes (Liu y Cordes, 2004).

Los microsatélites debido a su elevado polimorfismo y su relativamente fácil lectura son marcadores moleculares de interés para muchos estudios de genética, sin embargo, la principal desventaja de estos marcadores es que necesitan aislarse *de novo* en la mayoría de las especies que están siendo examinadas por primera vez. Los microsatélites se encuentran en regiones no codificantes donde la tasa de sustitución es más alta que en regiones codificantes, de tal forma que el diseño de iniciadores es más problemático (Zane *et al.*, 2002).

Para la obtención de microsatélites en una nueva especie existen tres posibles alternativas: 1) pagar por la elaboración de genotecas para la especie de interés, sin embargo los precios oscilan entre los \$5,000–\$10,000 dólares estadounidenses (y el precio es mucho más alto si los microsatélites son optimizados) (Zane *et al.*, 2002), 2) amplificación cruzada de microsatélites, debido a que se ha observado que microsatélites para una especie ocasionalmente amplifican en especies relacionadas (Evans *et al.*, 2001; Sekino y Hara, 2007) y 3) el aislamiento de microsatélites especie-específicos.

1.2. ANTECEDENTES

1.2.1. Estudios de biología y ecología

Existen varios trabajos en abulón que han señalado algunos factores biológicos y ecológicos como posibles fuentes de diferenciación poblacional. Prince y colaboradores (1987, 1988), mediante un experimento de control de la densidad de abulones adultos demostraron que la densidad del reclutamiento esta relacionada a la abundancia de abulones desovantes y sugirieron una dispersión larvaria extremadamente restringida en *Haliotis*

rubra. En contraparte, Shepherd y colaboradores (1992) rechazaron la hipótesis de que la densidad local de adultos tenía un efecto positivo sobre el reclutamiento local en *H. laevigata*, sugiriendo mecanismos de dispersión larvaria y factores que afectaban el reclutamiento, como la topografía costera (Ensenadas, Bahías, sistemas de giros con contracorrientes y zonas de estancamiento). McShane (1992), realizó una revisión de la historia de vida temprana del abulón y concluye que durante su relativamente breve periodo, la larva puede ser retenida en áreas discretas, por giros, corrientes atenuadas, ó por la protección de la topografía de arrecifes locales. Así también que las larvas podrían ser transportadas a mar abierto y no encontrar un hábitat adecuado para el asentamiento, aunque las pocas que lo lograran contribuirían al flujo genético entre poblaciones. Guzmán-del Prío y colaboradores (2000) evaluaron la influencia hidrodinámica sobre el transporte de larvas de abulón (*Haliotis* spp.) en arrecifes cercanos a Bahía Tortugas, B.C.S., México, encontrando que la dispersión larvaria estaba limitada a distancias cortas, pero no rechazaron la posibilidad de transporte distante bajo otras condiciones hidrodinámicas. Referente a la biología de la fertilización Babcock y Keesing (1999), mediante experimentos *in situ* con *H. laevigata*, concluyeron que la tasa de fertilización decrece rápidamente conforme incrementa la distancia; en poblaciones donde los individuos están separados por 1.6 m, la tasa de fertilización es del 50% ó menos.

1.2.2. Desarrollo de marcadores moleculares tipo microsatélites y determinación de herencia Mendeliana

Los microsatélites debido a su alta variabilidad son los marcadores indicados para abordar uno de los grandes retos en las pesquerías como el de discriminar poblaciones

estrechamente relacionadas (Ferguson y Danzmann, 1998; Zane *et al.*, 2002). Las principales aplicaciones de los microsatélites en investigaciones de acuicultura son en la construcción de mapas de ligamiento de alta resolución y asignaciones de parentesco (Liu y Cordes, 2004). Además los microsatélites han sido empleados para la evaluación de la diversidad genética de organismos producidos en laboratorios (Perez-Enriquez *et al.*, 1999), de actividades de repoblamiento (Perez-Enriquez y Taniguchi, 1999, Gutierrez-Gonzalez y Perez-Enriquez, 2005) y certificación de híbridos (Ibarra *et al.*, 2005).

En varias especies de abulón, los microsatélites han sido aislados principalmente con los siguientes objetivos: 1) distinguir entre poblaciones de abulón, 2) evaluar los niveles de variabilidad genética en stocks disminuidos, 3) dar seguimiento al éxito ó fracaso en las actividades de repoblamiento y conservación, y evaluar el impacto a largo plazo del repoblamiento, 4) certificación de especies, 5) análisis de pedigrí, 6) diseño de programas de selección asistida con marcadores en acuicultura y 7) construcción de mapas de ligamiento y determinación de rasgos cuantitativos (QTL) (Kirby *et al.*, 1998; Sekino y Hara, 2001; Miller *et al.*, 2001; Selvamani *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2004; Bester *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2005; Baranski *et al.*, 2006; An y Han, 2006; Sun *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2008; Baranski *et al.*, 2008). A pesar de que existen muchos trabajos que reportan la obtención de microsatélites en abulón, solo en *Halotis discus hannai* se comprobó que los genotipos tuvieran lecturas confiables en tamaños de muestra aceptables ($n \geq 30$) y que los marcadores presentaran herencia Mendeliana (Li *et al.*, 2003).

1.2.3. Estudios genético-poblacionales

Por otro lado, los estudios en especies de abulón que emplearon métodos indirectos para estimar conectividad genética sobre diferentes escalas geográficas, han mostrado resultados contrastantes. Sobre una escala amplia (~1000 km), se ha reportado diferenciación genética en *H. kamtschatkana* (Withler *et al.*, 2003) en *H. midae* (Evans *et al.*, 2004) y *H. rufescens* (Gruenthal *et al.*, 2007). Sobre escalas intermedias (de cientos de km) se ha reportado divergencia poblacional en *H. cracherodii* (Hamm y Burton 2000; Chambers *et al.*, 2006; Gruenthal y Burton, 2008), *H. rubra* (Conod *et al.*, 2002), *H. asinina* (Tang *et al.*, 2004) y *H. fulgens* (Gutiérrez-Gonzalez *et al.*, 2007), pero no en *H. rufescens* (Gaffney *et al.*, 1996; Kirby *et al.*, 1998; Burton y Tegner, 2000). Sobre escalas locales (de decenas metros a decenas de km), ha sido reportada diferenciación poblacional en *H. corrugata* (Del Río-Portilla y González-Avilés, 2001) y en *H. rubra* (Temby *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2009), pero no en *H. fulgens* (Zúñiga *et al.*, 2000).

1.2.4. Estudios de conectividad genética mediante el análisis de nuevos reclutas.

En estudios de dispersión de estadios larvarios de especies marinas, que emplearon métodos directos para estimar conectividad genética, se han encontrado: diferencias genéticas entre larvas y adultos de poblaciones vecinas de cangrejo azul (*Callinectes sapidus*) (Kordos y Burton, 1993) ó entre reclutas y adultos de la misma localidad de erizo rojo (*Strongylocentrotus franciscanus*) (Moberg y Burton, 2000), variación genética espacial y temporal entre reclutas de *S. franciscanus* (Moberg y Burton, 2000), ausencia de diferencias genéticas entre reclutas y adultos de erizo púrpura (*Strongylocentrotus purpuratus*) (Flowers *et al.*, 2002) y un porcentaje mayor (42%) de retención larvaria que

de dispersión larvaria (5–10%) en el pez payaso (*Amphiprion percula*) (Planes *et al.*, 2009). Dentro de este tipo de estudios se encuentra el reportado por Chambers *et al.* (2006) en abulón, el cual reportó homogeneidad genética entre juveniles de abulón negro (*Haliotis cracherodii*) de diferentes islas y diferenciación genética entre adultos y juveniles de una isla.

1.3. JUSTIFICACIÓN

La identificación de stocks de las diferentes especies de abulón es un aspecto crucial, debido a que una población puede estar compuesta de stocks aislados espacial y temporalmente en función de su biología, aspectos ecológicos y procesos históricos (Spangler *et al.*, 1981 en Zúñiga *et al.*, 2000). La comprensión de los mecanismos de flujo genético entre poblaciones ó stocks, es parte fundamental de este trabajo, pues permitirá profundizar en el conocimiento de la dinámica poblacional de la especie abulón amarillo (*Haliotis corrugata*) en diferentes escalas de tiempo. Al respecto, en algunos estudios se ha observado carencia de diferenciación genética–poblacional y los investigadores frecuentemente concluyen que hay suficiente flujo genético en nuestros días para prevenir la diferenciación poblacional. Sin embargo, la mayoría de los estudios genéticos aportan muy poca información concerniente a la dispersión larvaria y reclutamientos recientes, por ejemplo si todo el flujo genético entre dos grandes poblaciones ($N = 10^6$), cesó cientos de generaciones en el pasado, un análisis genético actual podría no mostrar diferencias. Las consecuencias de tal apreciación en biología pesquera, la cual busca delinear stocks para fines de manejo, podría ser tan grave que podría dejar a un manejo inapropiado (un stock

versus dos stocks separados) (Moberg y Burton, 2000). La sobreexplotación de especies marinas, aparte de resultar en una disminución de las poblaciones, puede tener efectos indirectos sobre procesos ecológicos tales como la dispersión larvaria y el reclutamiento, que afectan a la capacidad de recuperación de la población (Miller *et al.*, 2009).

2. HIPÓTESIS

Con base a las características biológicas y ecológicas del abulón amarillo *Haliotis corrugata*, el estado de sobrepesca de la especie y estudios previos de genética poblacional en haliótidos se propuso la hipótesis de la existencia de conectividad restringida entre poblaciones de abulón amarillo a lo largo de su distribución y así la limitación a la dispersión larvaria y al flujo genético.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Determinar si existe conectividad entre poblaciones de abulón amarillo (*Haliotis corrugata*) en el ámbito de su intervalo de distribución, mediante el uso de marcadores genéticos.

3.2. PARTICULARES

- Desarrollar marcadores genéticos tipo microsatélites para *H. corrugata*.
- Determinar si los microsatélites de *H. corrugata* presentan herencia mendeliana.
- Determinar si *H. corrugata* presenta una estructura genético-poblacional a lo largo de Baja California y California.
- Establecer la posible conectividad de *H. corrugata* entre dos localidades mediante el análisis de nuevos reclutas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en cuatro etapas: *i*) la obtención de los marcadores genéticos tipo microsatélites, apropiados para análisis de diferenciación poblacional y de parentesco; *ii*) la verificación de la herencia mendeliana de los microsatélites para determinar su utilidad en el análisis poblacional y de parentesco; *iii*) el análisis de la diversidad y estructura genética a lo largo de la distribución de la especie; *iv*) el análisis de diferenciación genética entre adultos y reclutas para la estimación de la conectividad dentro y entre localidades.

4.1. OBTENCIÓN DE MICROSATÉLITES EN *H. corrugata*

4.1.1. Extracción de ADN

Utilizando tejido muscular de cada uno de los ejemplares de abulón amarillo, se extrajo el ADN genómico siguiendo la técnica propuesta por Sweijd *et al.* (1998), descrita a continuación. Se colocó una porción de tejido de cada individuo en cada tubo de microcentrífuga, se digirió con solución amortiguadora TNES (Tris 100 mM, NaCl 400 mM, EDTA 50 mM, SDS 1%, pH 8) y Proteinasa-K (0.5 mg/ml), en incubación a 55°C por 16 h. El exceso de mucopolisacarido se eliminó con NaCl (2M) y CTAB 12.5% (Sigma), incubándose a 65°C por 1 h. Las proteínas se eliminaron mediante lavados con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) (tres veces) y centrifugaciones a 8,000 rpm (10 min), en cada lavado. Para precipitar el ADN se adicionó etanol absoluto (a -20°C) al sobrenadante y el tubo se colocó en un congelador a -20°C durante toda la noche. Para facilitar la precipitación de ADN se centrifugó a 8,000 rpm (por 10 min). El botón de ADN se lavó

con etanol al 70%, se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 100 μ l de solución amortiguadora TE. Los extractos de ADN se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Para iniciar el aislamiento de microsatélites se emplearon cinco ejemplares de *H. corrugata*, obteniéndose los extractos de ADN de cada individuo por separado.

4.1.2. Microsatélites

Para la obtención de microsatélites se siguieron dos estrategias: *i*) amplificación cruzada y *ii*) aislamiento de microsatélites.

4.1.2.1. Amplificación cruzada

En total se probaron 8 microsatélites diseñados para otras especies, vía reacción en cadena de la polimerasa (ver sección 4.1.3). Seis fueron diseñados para *H. kamtschatkana* (*Hka3*, *Hka28*, *Hka40*, *Hka43*, *Hka56* y *Hka80*; Miller *et al.*, 2001) y dos para *H. fulgens* (*Hful260* y *Hful603*; Gutiérrez-González *et al.*, 2007 y Cruz *et al.*, 2005, respectivamente) (Apéndice I).

4.1.2.2. Aislamiento de Microsatélites

El aislamiento de microsatélites se desarrolló siguiendo los protocolos de enriquecimiento propuestos por Glenn y Schable (2005), con modificaciones. El procedimiento de digestión, ligación de “linkers”, enriquecimiento, transformación y secuenciación se esquematiza en la Fig. 2 y se describe en el Apéndice II. Para el aislamiento de Microsatélites se emplearon extractos individuales de ADN que mostraron integridad (2000–5000 pb), buena concentración ($\geq 200\text{ng}$) y calidad ($\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280} \geq 1.75$).

Se seleccionaron los mejores extractos de ADN por individuo y cada uno se llevó a una concentración de 200ng/μl antes de realizar la digestión.

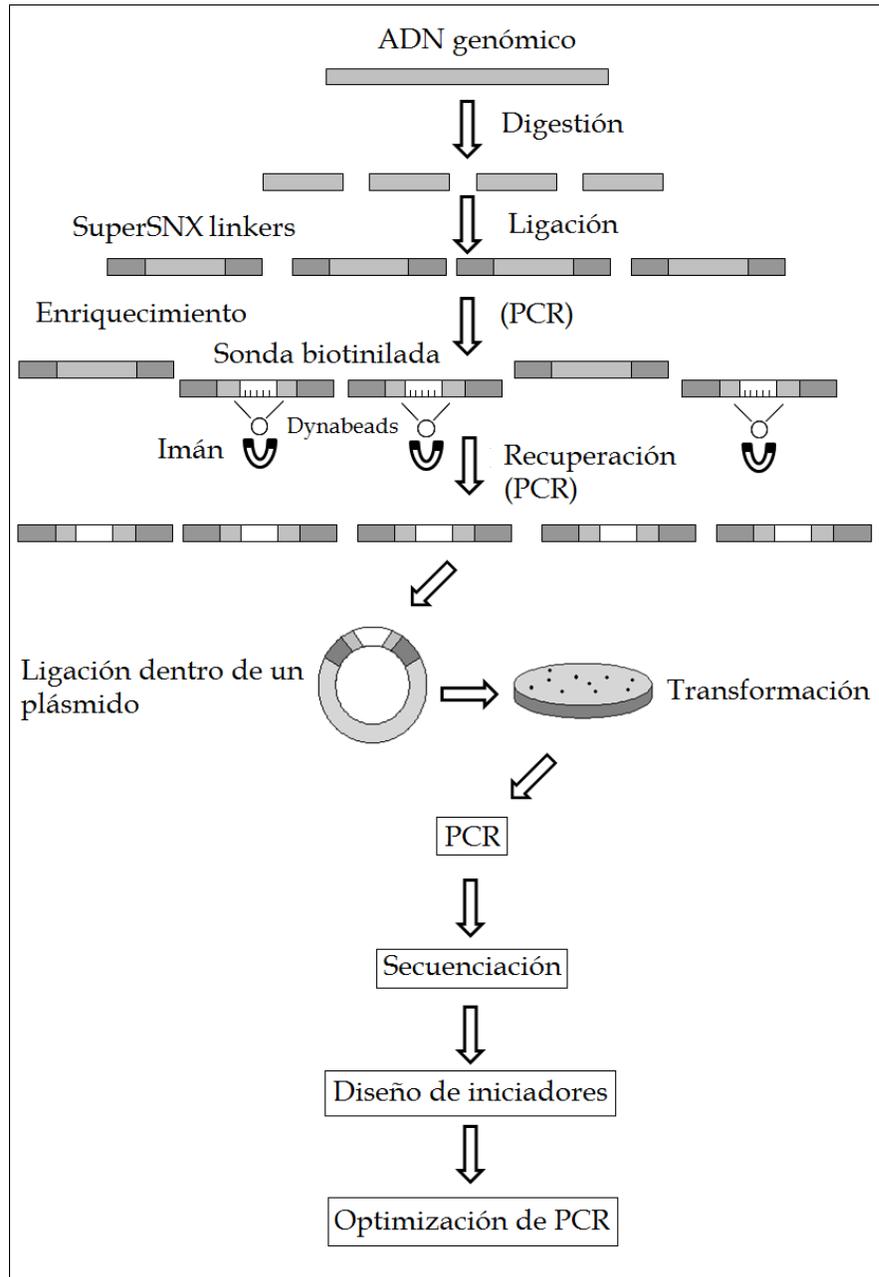


Figura 2. Diagrama general del aislamiento de microsatélites, según Glenn y Schable (2005) y PCR (reacción en cadena de la polimerasa, de sus siglas en inglés).

4.1.3. Optimización de PCR

Los iniciadores candidatos de la amplificación cruzada y los obtenidos del aislamiento de microsatélites se probaron en cinco individuos, mediante una mezcla de reacción general de PCR, en donde las amplificaciones de ADN fueron realizadas en un volumen de 12.5 μ L que contenía 1 μ L de ADN (50 ng), Buffer 1X para Taq (Invitrogen), 2.1 mM de $MgCl_2$, 0.48 μ M de cada iniciador, 0.2 mM dNTP's y 0.0125 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen). Las condiciones termales iniciales de PCR fueron las propuestas por Gutierrez-Gonzalez y Perez-Enriquez (2005), en donde se dio una desnaturalización inicial de 2 min a 95°C, seguidos por 30–35 ciclos de 30s a 94 °C, 30s a la temperatura de acoplamiento y 45s a 72°C, y una extensión final de 2 min a 72°C.

Posteriormente se realizaron gradientes de temperatura, de $MgCl_2$ y de concentración de ADN, con la finalidad de optimizar las condiciones de PCR bajo las cuales amplificaba cada locus, para lo cual empleó un termociclador iCycler (BIO-RAD). Los productos amplificados de microsatélites se llevaron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y urea (7.5 M) (condiciones eléctricas: 1800 V, 100 A, 90 W). La visualización de los microsatélites se realizó mediante tinción de plata (Creste *et al.*, 2001). Los tamaños alélicos fueron determinados por comparación a un ADN control de tamaños conocidos pGEM[®]*3Zf(+) (Promega).

Se seleccionaron aquellos loci que presentaron patrones de lecturas confiables y fueron polimórficos, considerándose como lecturas confiables a productos de tamaño alrededor del esperado (secuencia de la clona) y a la presencia de una ó dos bandas en el caso de individuos homocigotos y heterocigotos, respectivamente.

4.1.4. Caracterización de microsatélites

Una vez optimizadas las condiciones de reacción y establecidas las temperaturas de acoplamiento para todos los iniciadores de la amplificación cruzada y los obtenidos del aislamiento de microsatélites, éstos fueron evaluados y caracterizados en una muestra silvestre de *H. corrugata* ($N=49$) colectada en Isla Natividad durante el 2000, obteniéndose de cada uno sus estimadores de diversidad genética. Las secuencias de los microsatélites optimizados se depositaron en la base de datos “GenBank” del “*National Center for Biotechnology Information*” del Instituto Nacional de Salud de los EE.UU. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.1.5. Análisis de diversidad genética

Para cada locus se obtuvieron las frecuencias alélicas y se evaluó la diversidad genética mediante el número de alelos por locus (N_A), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_E). Las frecuencias alélicas y estimadores de diversidad genética se obtuvieron con la ayuda de los programas ARLEQUIN ver. 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) y GENEPOP ver. 3.4 (Raymond y Rousset, 1995a).

4.1.6. Equilibrio de Hardy-Weinberg y Desequilibrio de Ligamiento

Las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada locus fueron evaluadas mediante pruebas de exactas (cadena de Markov de 1000,000 pasos, 100,000 pasos de desmemorización), con la ayuda del programa ARLEQUIN versión 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). También se realizaron pruebas de desequilibrio de ligamiento (DL) para todos los pares de loci (1000 permutaciones), con el programa ARLEQUIN versión 3.0

(Excoffier *et al.*, 2005). Los valores de significancia para los valores de EHW y DL fueron ajustados mediante una prueba secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

4.2. DETERMINACIÓN DE HERENCIA MENDELIANA EN MICROSATÉLITES DE *H. corrugata*

4.2.1. Obtención de familias

Para confirmar si los alelos de los loci *Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco47*, *Hco97*, *Hco194*, *Hka3* y *Hka56* presentaban segregación Mendeliana se produjeron tres familias de abulón amarillo en Diciembre de 2007. En el laboratorio de producción de semilla de la Sociedad Cooperativa “Progreso” a cargo del Ocean. Daniel Aguilar Osuna se realizaron cruza controladas de abulones maduros en proporciones de sexos de un macho y una hembra. Después de 48 horas del desove se colectaron muestras de larvas (veliger en torsión de 90°) y de tejido de los progenitores (tentáculos epipodiales) por cada familia, las cuales fueron preservadas en etanol al 80%.

4.2.2. Extracción de ADN

Las extracciones de ADN de progenitores se realizaron siguiendo el protocolo de Sweijd *et al.* (1998), descrito en la sección 4.1.1. Las extracciones de ADN de larvas se realizaron siguiendo el protocolo propuesto por Selvamani *et al.* (2001), con algunas modificaciones, descritas a continuación. Las larvas veliger fueron separadas con la ayuda de un estereoscopio y transferidas individualmente a cada uno de los tubos de microcentrifuga. Las larvas se desecaron a temperatura ambiente hasta la evaporación de los restos de etanol y posteriormente se incubaron en buffer de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH

8.3, KCl 50 mM, Tween-20 0.05%) y Proteinasa-K (0.76 mg/ml) a 55°C por 24 h. Subsecuentemente la mezcla homogénea se incubó a 95°C por 10 min para detener la acción de la Proteinasa-K y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.2.3. Amplificación de microsatélites

Previo a cada amplificación las muestras digeridas fueron centrifugadas a 16000 g por 5 min. Una vez centrifugadas solo se utilizó el sobrenadante debido a que este contenía el ADN de la larva. Las amplificaciones de ADN fueron realizadas en un volumen de 11 µL que contenía 1µL de ADN, Buffer 1X para Taq (Invitrogen), 2.1 mM de MgCl₂, 0.41 mg/ml de BSA, 0.48 µM de cada iniciador, 0.2 mM dNTP's y 0.0227 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen). Las condiciones termales de PCR fueron las mismas a las previamente estandarizadas (ver sección 5.1.2) y las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador iCycler BIO-RAD o 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems. Los productos de PCR fueron separados en geles de acrilamida al 5% y 7.5 M de urea y revelados con una capa de agarosa (1.14%) que contenía Sybrgold (0.07X) y con la ayuda de un escáner de luz laser (FMBIOIII-Plus). Los tamaños alélicos fueron determinados por comparación a un ADN control de tamaños conocidos de 10 pb y pGEM[®]*3Zf(+) (Promega). Este último fue revelado con nitrato de plata (Creste *et al.*, 2001).

4.2.4. Pruebas de segregación Mendeliana

Las lecturas de genotipos se basaron en la asignación de alelos de la sección 5.1. Las proporciones genotípicas observadas en las larvas para cada loci se compararon a las

proporciones esperadas bajo segregación Mendeliana con base en los genotipos de los progenitores. Las desviaciones estadísticas significativas de las proporciones esperadas (1:1, 1:2:1 y 1:1:1:1) se evaluaron mediante pruebas Ji-cuadrada (χ^2), una regla de decisión de $P < 0.05$ y con $n - 1$ grados de libertad, donde n = número de clases genotípicas (Ayala, 1982 en Li *et al.*, 2003). Las pruebas χ^2 se realizaron con la ayuda del programa STATISTICA ver. 7. Posteriormente se ajustó el nivel de significancia de pruebas múltiples ($\alpha = 0.05$), usando la aproximación de Bonferroni (Rice, 1989).

4.3. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *H. corrugata*

4.3.1. Colecta de muestras silvestres

De Marzo a Julio de 2006 se colectaron muestras de abulones amarillos adultos en cuatro localidades mexicanas: Isla Cedros (28°23'N, 115°14'W), Isla Natividad (27°51'N, 115°8'W), La Bocana (26°44'N, 113°38'W) y San Juanico (26°16'N, 112°32'W) (Fig. 3). La mayoría de las muestras provinieron de las capturas comerciales de las Sociedades Cooperativas: Pescadores Nacionales de Abulón (Isla Cedros), La Purisma (Isla Natividad), y Progreso (La Bocana), con la excepción de la muestra de la Cooperativa de Puerto Chale (San Juanico), donde la pesquería de abulón estaba en veda, allí se colectaron a los especímenes, se tomaron muestras de algunos tentáculos epipodiales y cada individuo fue regresado a su hábitat. De 48 especímenes de cada localidad se registró la longitud de la concha y se tomaron muestras de tejido (fragmentos del manto ó tentáculos epipodiales) que fueron preservadas en etanol al 80%. Las muestras de ADN ($n = 48$) de individuos

colectados en San Clemente Island, California (33°N , $118^{\circ}30'\text{W}$) en 2003, fueron donadas por el Dr. Ron S. Burton del *Scripps Institution of Oceanography*.

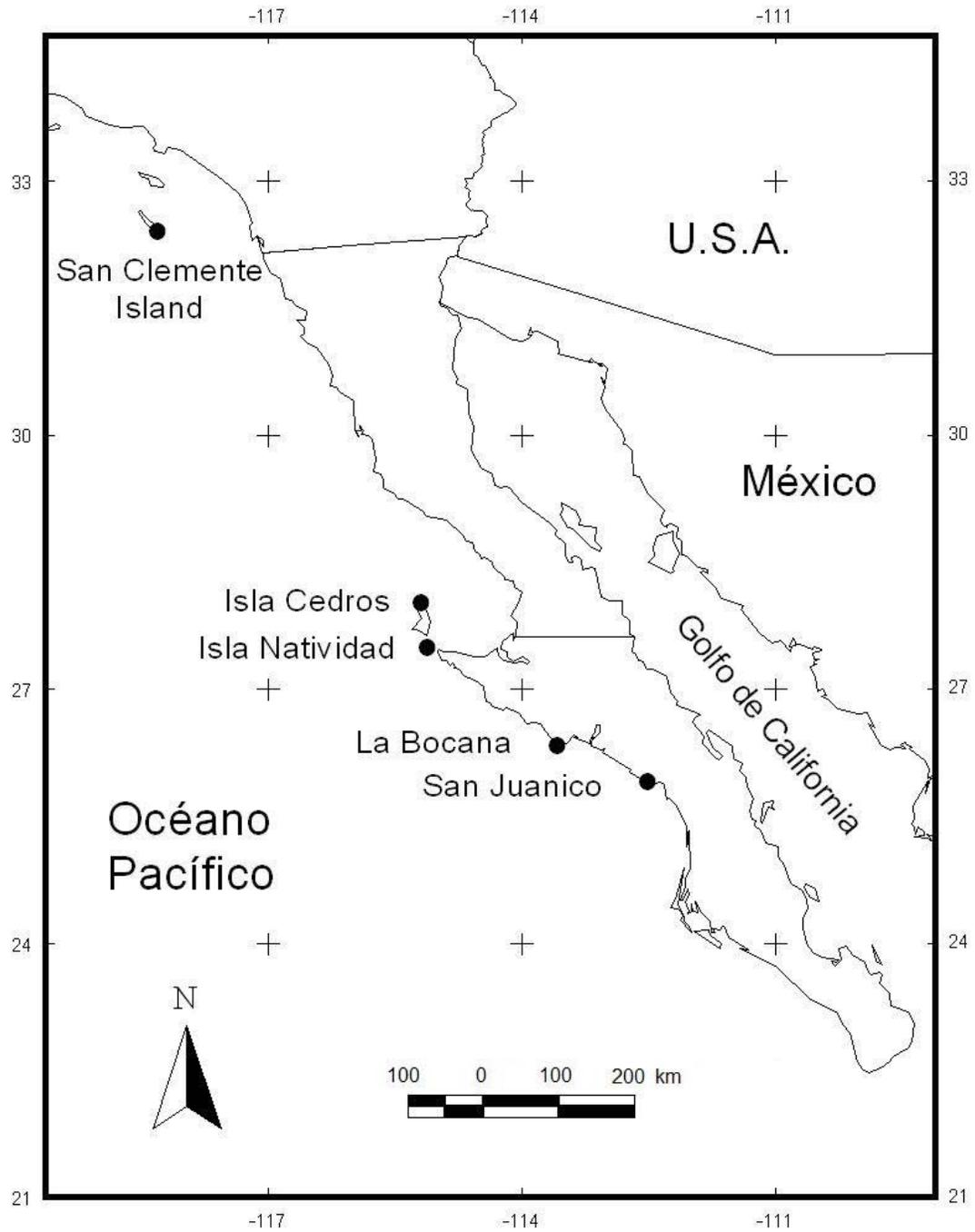


Figura 3. Localidades seleccionadas para el análisis de estructura genética poblacional.

4.3.2. Extracción de ADN y amplificación de microsatélites

Las extracciones de ADN de las muestras mexicanas fueron realizadas siguiendo el protocolo propuesto por Sweijd *et al.* (1998) (ver sección 4.1.1). Las concentraciones de ADN individuales fueron estandarizadas a $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ antes de realizar la PCR.

Un total de 240 individuos fueron examinados genéticamente con ocho loci de microsatélites, de los cuales siete fueron aislados de *Haliotis corrugata* (*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco47*, *Hco97* y *Hco194*) (ver sección 5.1.3) y uno fue originalmente aislado de *H. kamtschatkana* (*Hka56*) (Miller *et al.*, 2001) y amplificado en abulón amarillo (ver sección 5.1.3). Las amplificaciones de ADN fueron realizadas siguiendo la mezcla de reacción y condiciones termales previamente estandarizadas (ver sección 5.1.2). Las amplificaciones via PCR se realizaron en un termociclador iCycler BIO-RAD o 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems. Los productos de PCR fueron separados en geles de acrilamida al 5% y 7.5 M de urea y revelados por tinción con nitrato de plata (Creste *et al.*, 2001). Los tamaños alélicos fueron determinados por comparación a un ADN control de tamaños conocidos pGEM[®]*3Zf(+) (Promega) y siguiendo la nomenclatura establecida en la sección 5.1.

4.3.4. Análisis de datos

4.3.4.1. Análisis de tallas

Diferencias entre localidades

Se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, con la información de las tallas de *H. corrugata* de las localidades: San Clemente Island ($n = 74$), Isla Cedros ($n =$

70), Isla Natividad ($n = 70$), La Bocana ($n = 70$) y San Juanico ($n = 47$), para determinar si existían diferencias entre el promedio de las tallas de todas las localidades.

Diferencias entre sexos

En la muestra de Isla Cedros los datos de tallas fueron tomados determinándose el sexo de cada individuo, esto nos permitió hacer una prueba “t de Student” para determinar si existían diferencias entre los promedios de las tallas entre hembras ($n = 31$) y machos ($n = 39$).

Las diferencias entre localidades y entre sexos se evaluaron mediante pruebas de Kruskal-Wallis y “t de Student” respectivamente, implementadas en STATISTICA ver 7.0.

4.3.4.2. Análisis genético

Se obtuvieron las frecuencias alélicas por locus y localidad con GENETIX ver. 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004). Las desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se evaluaron mediante pruebas exactas de Fisher, empleando la cadena de Markov (1,000,000 pasos y 100,000 pasos de desmemorización), implementadas en ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Posteriormente se ajustó el nivel de significancia de pruebas múltiples ($\alpha = 0.05$), usando la aproximación de Bonferroni (Rice, 1989). Las frecuencias de alelos nulos en loci con desequilibrio de Hardy-Weinberg se estimaron usando el método de Brookfield 1 (Brookfield, 1996), implementado en MICRO-CHECKER (Oosterhout *et al.*, 2004).

La diversidad genética se evaluó a través del número de alelos por locus (N_A) y heterocigosidades observadas (H_O) y esperadas (H_E), usando el programa ARLEQUIN ver.

3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). El número de alelos efectivos por locus (N_{EA}) fue estimado como el recíproco de $\sum p_i^2$ (Hartl y Clark, 1997). Las diferencias genéticas entre localidades en N_A fueron evaluadas por pruebas exactas de Fisher (10,000 desmemorizaciones, 100 lotes y 10,000 interacciones por lote), implementadas en GENEPOP ver 3.4 (Raymond y Rousset, 1995a,b). Las diferencias entre localidades en N_{EA} y H_o , se evaluaron mediante pruebas de Kruskal-Wallis y ANOVA respectivamente, usando STATISTICA ver 7.0.

La diferenciación genética entre localidades se evaluó por medio de F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984) y un análisis global de varianza molecular (AMOVA) de frecuencias alélicas dentro y entre muestras. También se obtuvieron los valores de F_{ST} pareados entre todas las localidades con su significancia. Para evaluar la estructura genética poblacional, se realizó un AMOVA jerárquico con dos grupos: San Clemente Island y las cuatro localidades mexicanas. Los AMOVA global y jerárquico (de 10,100 permutaciones cada uno) se realizaron con la ayuda de ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Los niveles de significancia se ajustaron con la prueba de Bonferroni (Rice, 1989). Para determinar las relaciones genéticas entre poblaciones de abulón amarillo, se generó un dendograma UPGMA usando las distancias de Reynolds y 5,000 réplicas bootstrap con el programa PHYLIP ver. 3.6 (Felsenstein, 2005).

Se evaluó el poder estadístico de las pruebas de diferenciación genética mediante pruebas exactas de Fisher con el programa POWSIM (Ryman y Palm, 2006), la cuales usan la cadena de Markov (1000 desmemorizaciones, 100 lotes y 1000 interacciones). Este programa de computadora basado en la simulación se utilizó para probar la hipótesis nula

de homogeneidad genética para combinaciones opcionales de tamaños de muestra y números de loci. POWSIM genera un gran número de conjuntos azarosos de poblaciones (1000 replicas) que divergieron de una población base común a algún F_{ST} predefinido. De cada conjunto de poblaciones se toma una muestra, se aplica una prueba de homogeneidad genética, y la proporción de resultados significativos es usado como estimador de poder estadístico bajo esas condiciones (Ryman y Palm, 2006; Ryman *et al.*, 2006).

Para determinar si las poblaciones de abulón amarillo se ajustaron al modelo de aislamiento por distancia, se evaluaron las correlaciones entre distancias genéticas y geográficas mediante una prueba de Mantel (10,000 permutaciones), con el programa GENETIX. Las distancias genéticas entre localidades se obtuvieron con GENETIX y las distancias geográficas fueron medidas como las distancias más cortas entre dos localidades a través del océano, usando el sistema de información geográfico (SIG) ArcView ver. 3.1.

Se siguieron dos métodos diferentes para obtener el número de migrantes (Nm), como estimador de flujo genético entre pares de poblaciones: 1) $Nm = (1 - F_{ST}) / 4 \times F_{ST}$, implementado en GENETIX y 2) $Nm = \exp\{[\ln(pl) + 2.44] / -0.505\}$, donde pl es la frecuencia promedio de alelos exclusivos (Slatkin, 1985). El segundo método fue aplicado agrupando todas las localidades mexicanas como una sola población grande y comparándola a la de San Clemente Island.

4.4. CONECTIVIDAD GENÉTICA ENTRE DOS LOCALIDADES

4.4.1. Experimento de repoblamiento de abulón amarillo en “El Riíto”

Las muestras de “El Riíto” provienen de un experimento de repoblamiento de *H. corrugata* realizado por el Dr. Sergio Guzmán del Prío y colaboradores de la E.N.C.B. (IPN), en coordinación con el técnico Fernando López Salas de la Cooperativa “Leyes de Reforma”. A continuación se hace una breve descripción del experimento.

Entre octubre de 2001 y octubre de 2002 se trasplantaron 267 abulones amarillos en el banco de El Riíto ubicado en la localidad de Bahía Asunción (Figura 4). Estos organismos provinieron de bancos próximos (La rama verde y El Bajito). Los especímenes fueron liberados en un núcleo a una profundidad entre 4.5 y 6 brazas (entre 8 y 11 m aprox.) y a una distancia de 520 m de la orilla de la playa. Las tallas de los organismos trasplantados en el núcleo fluctuaron entre 96 y 162 mm de longitud de concha, correspondientes a 3, 4 y 5 años de edad aproximadamente. Para su identificación los abulones fueron marcados individualmente con etiquetas de polietileno numeradas, fijadas a las conchas con pegamento de cianocrilato (Triple ligación TB-1747) (Guzmán del Prío *et al.*, 2004).

En junio de 2004 se realizó una primera revisión en el núcleo de El Riíto, con el objeto de obtener muestras de tentáculos epipodiales y manto de adultos, para el análisis genético. En noviembre de 2004 se hizo una segunda prospección a lo largo de cuatro transectos que fueron orientados a partir del centro del núcleo en dirección hacia los cuatro puntos cardinales, en cada transecto se buscó la presencia de juveniles. La búsqueda se realizó en puntos ubicados del centro de dispersión a los 10, 20, 30, 40, 50, y 100 m de

distancia en cada transecto, por espacio de 15 minutos en cada punto. Búsquedas similares se realizaron entre septiembre y noviembre de 2005.

Los juveniles colectados (2–3 años de iniciado el experimento) mostraron un intervalo de tallas entre 17 y 95 mm de longitud de concha, correspondiente a 1, 2 y 3 años (ver sección 4.4.3). La muestra de juveniles mostró una clara dominancia del grupo de edad más joven. De cada adulto y juvenil se tomaron muestras de tejido y se preservaron en alcohol (70%) para su posterior análisis genético.

Las muestras de juveniles y adultos de *H. corrugata* de El Riíto fueron donadas por el Dr. Sergio Guzmán del Prío y colaboradores al laboratorio de genética acuícola del CIBNOR en donde fueron procesadas. En total se obtuvieron muestras de tejido de 30 adultos marcados (abulones trasplantados al núcleo), 16 adultos sin marcas (abulones residentes de ese banco) y 60 juveniles (Tabla I).

Tabla I. Adultos y juveniles de *H. corrugata* colectados en El Riíto y fechas de colecta.

Fecha de colecta	Adultos con marca	Adultos sin marca	Juveniles
17/11/2004	9	8	
11/2004			9*
3/12/2004	1	8	
3/09/2005	20		3
12/10/2005			13
11/2005			35
Total	30	16	60

* individuos sin registro de talla.

4.4.2. Obtención de muestras de La Bocana

La muestra de adultos de *H. corrugata* en La Bocana fue colectada en Junio 2006 (ver sección 4.3.1). En Mayo de 2007 se hizo la colecta de 63 juveniles de la misma especie en la misma localidad (Fig. 4), los cuales mostraron tallas de 3.1 a 10.4 cm.

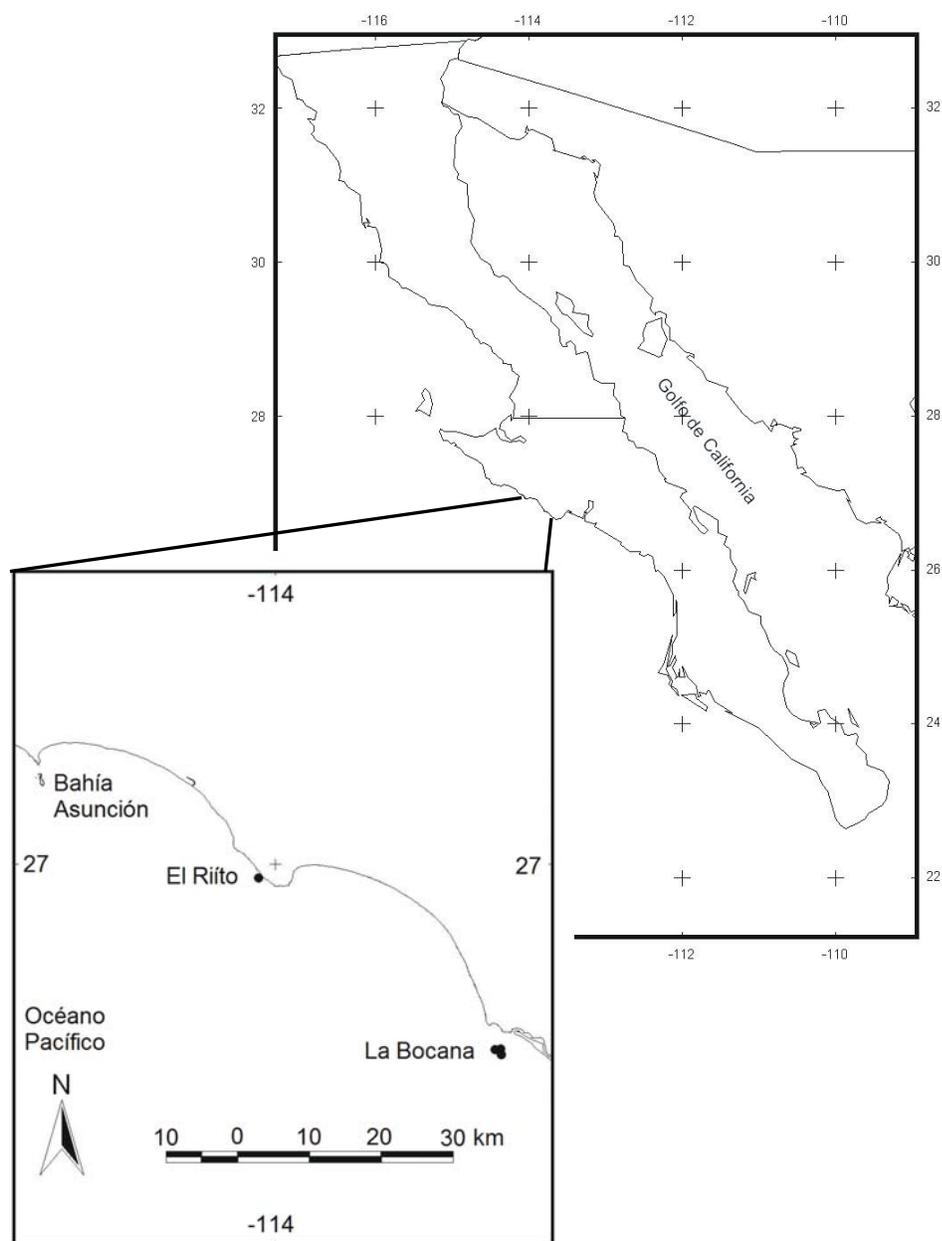


Figura 4. Sitios de colecta de adultos y juveniles de *H. corrugata* en El Riíto y de juveniles en La Bocana.

La colecta de juveniles se llevó a cabo en los sitios conocidos como la Piedra, La Brecha, La Orilla y Medanos con el apoyo de la Sociedad Cooperativa “Progreso”. Los juveniles colectados se trasladaron al laboratorio de producción de semilla de la cooperativa, en donde se fueron acopiando en un tanque provisto de agua limpia, oxígeno y alimento, hasta alcanzar un tamaño de muestra representativo ($n = 50$). Una vez que se contó con un número adecuado de juveniles se procedió a medir la talla de cada uno y a tomarles una muestra de tejido (tentáculos epipodiales) ($n = 53$) o hemolinfa en los individuos más pequeños ($n = 10$). Las muestras de tejido ó hemolinfa se preservaron en etanol (70%), y los juveniles se regresaron al estanque para mantenerse en observación unas semanas antes de su retorno a los bancos naturales.

4.4.3. Definición de los grupos de edad

Primeramente, se hizo una separación entre adultos y juveniles de *H. corrugata* en base a sus tallas. Los adultos fueron aquellos individuos con tallas de 126–169 mm en el caso de El Riíto y de 130–166 mm en La Bocana. Los juveniles estuvieron conformados por individuos con tallas de 9–80 mm en El Riíto y de 31–10.4 mm en La Bocana.

Los criterios seleccionados para la definición de los grupos de edad dentro de las muestras de juveniles de El Riíto y La Bocana fueron: 1) el comportamiento de las modas de tallas, 2) la tasa de crecimiento, y 3) homogeneidad en los criterios 1 y 2, en ambas localidades. Respecto al comportamiento de las modas de tallas, las frecuencias y las mayores diferencias entre tallas definieron los grupos de edad. Referente a la tasa de crecimiento se usaron los parámetros de la ecuación de crecimiento calculados por

Shepherd y Avalos-Borja (1997), según el modelo de Von Bertalanffy en el abulón amarillo. Las tallas estimadas para uno y dos años de edad fueron 21.7 y 54.9 mm. En consideración de estas tallas y asumiendo que el crecimiento es mayor durante el primer año de edad y después disminuye (Guzmán del Prío, com. pers.) se definieron los grupos de edad de los juveniles. Concerniente al punto 3, la asignación de grupos de edad en ambas localidades se basó en los mismos criterios (1 y 2), debido a la falta de información sobre tasas de crecimiento en las localidades analizadas.

4.4.4. Extracción de ADN

4.4.4.1 El Ríto

Se extrajo el ADN de 30 adultos con marca, 16 sin marca y 60 juveniles, mediante el uso del kit “Wizard” (Promega). Sin embargo, debido a que 33 muestras (9 adultos con marca, 11 adultos sin marca y 13 juveniles) presentaron extractos de ADN muy degradados y de bajo peso molecular, se realizó una nueva extracción de ADN con la técnica propuesta por Sweijd *et al.* (1998) (sección 4.1.1), aumentando la cantidad de tejido al momento de la digestión. Posteriormente debido a que la mayoría de las muestras problemáticas siguieron mostrando extractos de ADN de mala calidad, se extrajeron nuevamente con la ayuda de “Dneasy Tissue Kit” (QIAGEN). Cabe señalar que los extractos de ADN obtenidos mediante la técnica de Sweijd *et al.* (1998), fueron estandarizados a una concentración de ADN de 50 ng/μl previo a la amplificación vía PCR.

4.4.4.2. La Bocana

El ADN de 63 juveniles se extrajo mediante el kit “Wizard” (Promega) (el ADN de adultos de esta localidad ya se había extraído y analizado de acuerdo a la sección 4.3).

4.4.5. Amplificación de microsatélites

Se amplificaron en total ocho microsatélites en las muestras de adultos y juveniles de las dos localidades; siete empleados en el análisis poblacional (*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco97*, *Hco194*, y *Hka56*) y un microsatélite adicional *Hka3*, este último debido a su elevado polimorfismo. La mezcla de reacción y las condiciones termales que se emplearon para la amplificación por PCR fueron las mismas a las previamente estandarizadas en la sección 5.1.2. Los productos de PCR fueron separados en geles de acrilamida al 5% y 7.5 M de urea y revelados por tinción con nitrato de plata (Creste *et al.*, 2001). Los tamaños alélicos fueron determinados por comparación a un ADN control de tamaños conocidos pGEM[®]*3Zf(+) (Promega) y siguiendo la nomenclatura establecida en la sección 5.1.

4.4.6. Diversidad genética

Se obtuvieron las frecuencias alélicas para cada localidad por locus y por grupos de edad (Adultos y juveniles). Dentro de juveniles se diferenciaron dos grupos de edad con base en sus tallas y con tamaños de muestra representativos ($n > 30$). La diversidad genética se evaluó mediante número de alelos por locus (N_A) y heterocigosidades observadas (H_O) y esperadas (H_E). Las diferencias genéticas en N_A , entre adultos y juveniles de una misma

localidad, fueron evaluadas por pruebas exactas de Fisher (10,000 desmemorizaciones, 100 lotes y 10,000 iteraciones por lote), implementadas en GENEPOP ver 3.4 (Raymond y Rousset, 1995a,b). Las diferencias en H_o , entre adultos y juveniles de una misma localidad, se evaluaron mediante pruebas “t de Student” implementadas en STATISTICA ver 7.0. Las desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) se evaluaron mediante pruebas exactas de Fisher, empleando la cadena de Markov (1,000,000 pasos y 100,000 pasos de desmemorización). Las frecuencias de alelos nulos en todos los loci se estimaron usando el método de Brookfield 1 (Brookfield, 1996), implementado en MICRO-CHECKER (Oosterhout *et al.*, 2004). También se realizaron pruebas de desequilibrio de ligamiento (DL) para todos los pares de loci (10,100 permutaciones), debido a que puede existir DL si los juveniles fueron producto de un número reducido de progenitores. Todos estos análisis se realizaron con la ayuda del programa ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Posteriormente se ajustó el nivel de significancia de pruebas múltiples ($\alpha = 0.05$), usando la aproximación de Bonferroni (Rice, 1989).

4.4.7 Diferenciación genética entre muestras de adultos y juveniles de la misma localidad

Para determinar si existían diferencias genéticas entre muestras de adultos y juveniles (totales ó por grupo de edad), dentro de cada localidad se obtuvieron los valores de F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984) y se realizaron AMOVA globales, incluyendo o excluyendo a *Hka3*. Los valores de P para los análisis de AMOVA global se obtuvieron después 50,175 permutaciones, con la ayuda de ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

4.4.8. Diferenciación entre localidades

Las diferencias genéticas en frecuencias alélicas entre adultos y juveniles del grupo I de El Riíto y entre adultos y juveniles del grupo II de La Bocana se evaluaron mediante el análisis de F_{ST} pareados y AMOVA jerárquicos, incluyendo y excluyendo a *Hka3*. Los valores de P para los análisis de F_{ST} pareados y AMOVA jerárquico se obtuvieron después de 10,100 y 50,175 permutaciones, respectivamente, con la ayuda de ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). El análisis de AMOVA jerárquico se realizó considerando dos grupos: 1) muestras de adultos y juveniles del grupo I de El Riíto y 2) muestras de adultos y juveniles de los grupos II de La Bocana.

4.4.9. Análisis de Parentesco en El Riíto

En el caso de la localidad de El Riíto, debido a que se tenían muestras de tejido de adultos trasplantados en 2002 y muestras de tejidos de juveniles colectados en los años subsecuentes se realizó un análisis de parentesco, asumiendo previamente que los juveniles colectados cerca del núcleo de adultos muy probablemente fueron hijos de los adultos trasplantados. La asignación de progenitores a las larvas de *H. corrugata* se realizó con el programa CERVUS 3.0 (Slate *et al.*, 2000; Kalinowsky *et al.*, 2007). Primeramente CERVUS caracterizó los loci a emplearse en el análisis de parentesco a través del número de alelos por locus (N_A), heterocigosidades observadas (H_O) y esperadas (H_E), contenido de información polimórfica (PIC), el cual se refiere al valor de un marcador para detectar polimorfismo en una población, pruebas de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y frecuencias de alelos nulos (f nulos). Con esta información decidimos emplear solo aquellos loci que presentaron lecturas de alelos confiables, que se encontraron en EHW, y que

mostraron alelos nulos con frecuencias menores a 0.05 (Bernatchez y Duchesne, 2000; Martinez, 2005). Estos loci fueron *Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22* y *Hka56*. Posteriormente CERVUS simuló los genotipos de 100,000 descendientes y con base al número de padres genotificados (42) y la proporción de padres muestreados (42/267), estimó los valores críticos (LOD) para identificar los progenitores más probables al 80 y 90 % de confianza. Por último CERVUS realizó el análisis de parentesco considerando los valores de LOD de los dos progenitores más probables, con la indicación de que se desconocía el sexo de los progenitores. Conjuntamente se obtuvieron las probabilidades de no exclusión para los dos padres más probables.

LOD es el logaritmo natural de la proporción de probabilidad que usa los datos disponibles para probar hipótesis alternativas. La proporción de probabilidad (Ecuación 1) se refiere a la probabilidad de observar los datos bajo una hipótesis (H_1) comparados con otra hipótesis (H_2):

$$L(H_1, H_2 / D) = \frac{P(D / H_1)}{P(D / H_2)} \quad (1)$$

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

De esta manera se comparó la hipótesis de que el padre (o madre) asignado por CERVUS era el padre (o madre) verdadero, con respecto a la hipótesis de que el padre (o madre) asignado por CERVUS no era el padre (o madre) verdadero. El análisis de parentesco se realizó locus por locus, partiendo de los loci de menor PIC hasta incluir los de mayor PIC. Los valores de LOD fueron cambiando conforme se fueron adicionando los loci y finalmente solo se consideraron los valores de LOD del análisis con cinco loci

(*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22* y *Hka56*). El criterio empleado para confirmar la paternidad fue el mismo empleado por Slate *et al.* (2000), en donde un LOD de 3.0 significa que el padre asignado por CERVUS es cerca de 20 veces más probable que de no serlo. Un valor de LOD igual ó más grande que 3.0 fue usado para confirmar paternidad. Además se verificó que los genotipos multilocus en juveniles coincidieran a los esperados de los genotipos paternos, descartándose cualquier posible asignación cuando no era compartido por lo menos un alelo entre los juveniles y padres potenciales, aún cuando su valor de LOD fuera ≥ 3.0 .

5. RESULTADOS

5.1. OBTENCIÓN DE MICROSÁTELITES EN *H. corrugata*

5.1.1. Microsatélites

5.1.1.1. Amplificación cruzada

De los ocho microsatélites probados tres fueron polimórficos (*Hka3*, *Hka40* y *Hka56*) (Fig. 5), tres fueron monomórficos (*Hka43*, *Hful260* y *Hful603*) y dos mostraron patrones de bandeo difíciles de interpretar (*Hka28* y *Hka80*).

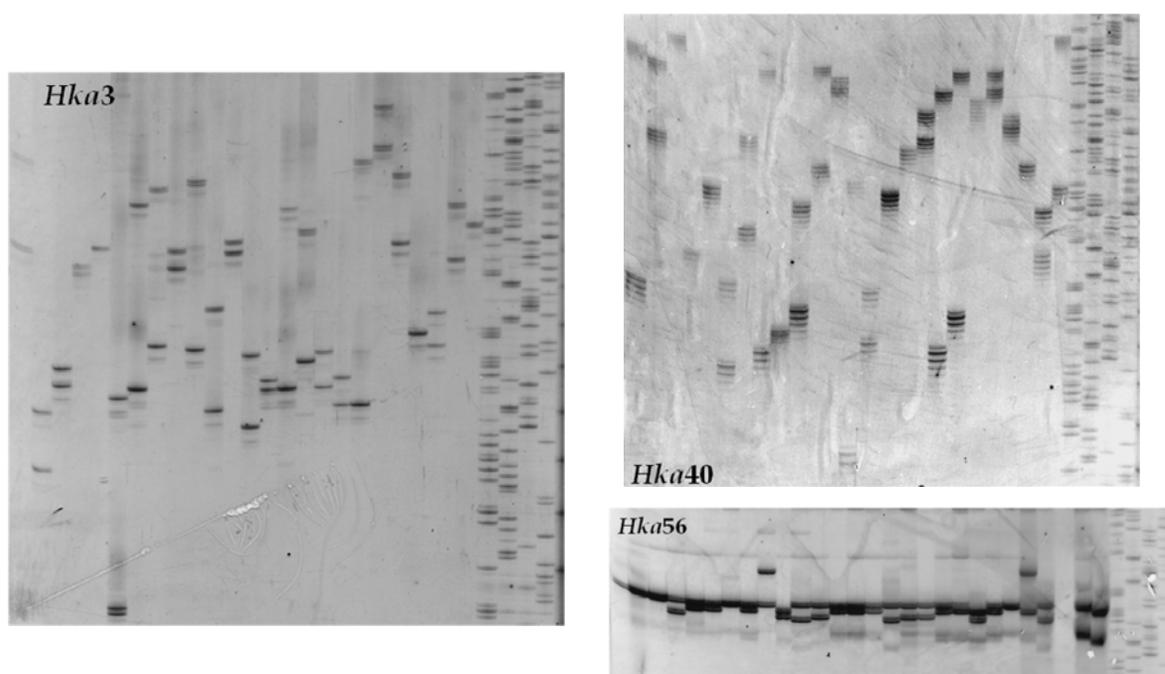


Figura 5. Patrones de bandeo de microsatélites polimórficos en *H. corrugata*, que resultaron de la amplificación cruzada de microsatélites diseñados en *H. kamtschatkana* (*Hka3*, *Hka40* y *Hka56*).

5.1.1.2. Aislamiento de Microsatélites

Para iniciar el aislamiento de microsatélites se emplearon extractos de ADN de buena calidad (Fig. 6A). Se obtuvieron buenos resultados en la digestión (Fig. 6B), ligación

y PCR (Fig. 6C), de cada genoteca, observándose después de la amplificación barridos de ADN alrededor de los 600 pb. Después de cada enriquecimiento con las sondas (CT)₁₅, (GT)₁₅ ó una mezcla de ambas, los productos de PCR corroboraron que se había recuperado ADN con cierto porcentaje de regiones microsátélites (Fig. 6D).

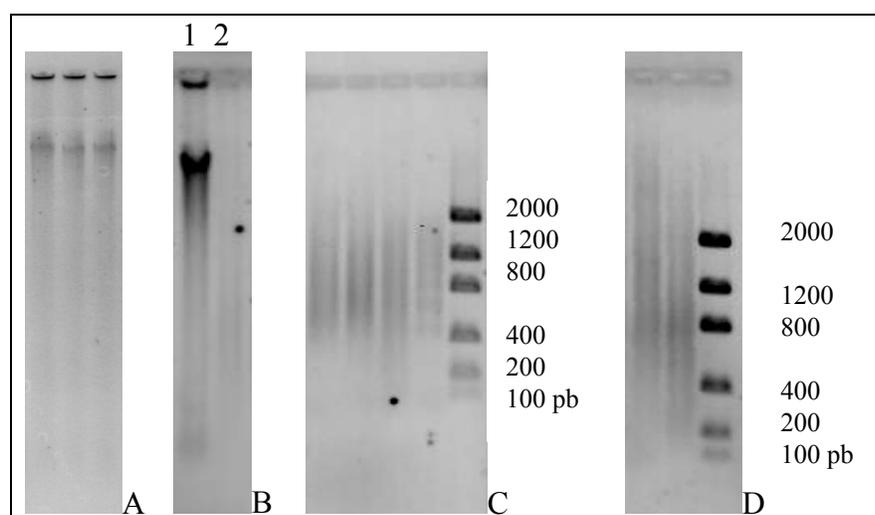


Figura 6. Geles de agarosa (1%) en donde se aprecian: (A) ADN de buena calidad, (B) ADN sin digerir (pozo 1) y ADN digerido con la enzima de restricción *Rsa I* (pozo 2), (C) productos de PCR del ADN digerido-ligado y (D) productos de PCR de ADN enriquecido. El último pozo a la derecha de los geles C y D corresponden al marcador de masa y tamaño conocidos “Low DNA Mass ladder” (Invitrogen).

Dadas las características del ADN enriquecido (barrido alrededor de los 600 pb) (Fig. 6D), se realizó inmediatamente su inserción en los plásmidos. Las inserciones de ADN enriquecido junto con el vector de clonación dentro de bacterias dieron como resultado seis genotecas. Con la sonda (GT)₁₅ se obtuvo una genoteca de 253 clonas, con la sonda (CT)₁₅ se obtuvieron cuatro genotecas con 804 clonas en total y con la mezcla de sondas (GT)₁₅ y (CT)₁₅ se obtuvo una genoteca que produjo 101 clonas (Fig. 7).

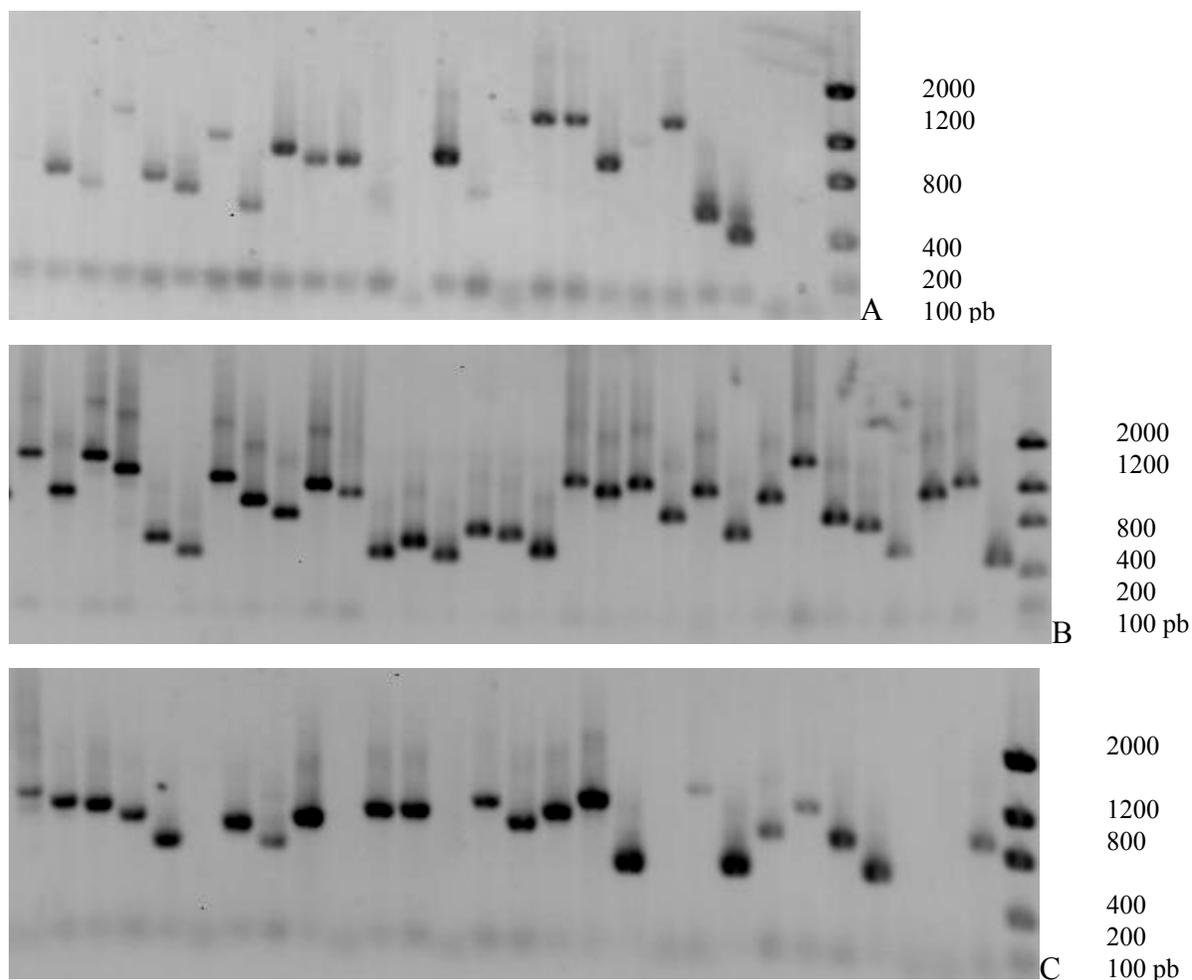


Figura 7. Geles de agarosa (1%) en donde se muestran algunas clonas obtenidas con las sondas: (GT)₁₅ (A), (CT)₁₅ (B) y con la mezcla de sondas (GT)₁₅ y (CT)₁₅ (C), el último pozo a la derecha corresponde al marcador de masa y tamaño conocidos “Low DNA Mass ladder” (Invitrogen).

Entre las seis genotecas se obtuvieron 1,158 clonas, de las cuales se secuenciaron 128. Del total de las clonas secuenciadas 24 (19%) fueron repetidas ó clonas hermanas, 21 (16%) fueron de muy mala calidad y 24 (19%) no presentaron microsatélites. Las secuencias que presentaron microsatélites (considerando secuencias con tres ó más repeticiones), fueron 59 (46 %) (Fig. 8).

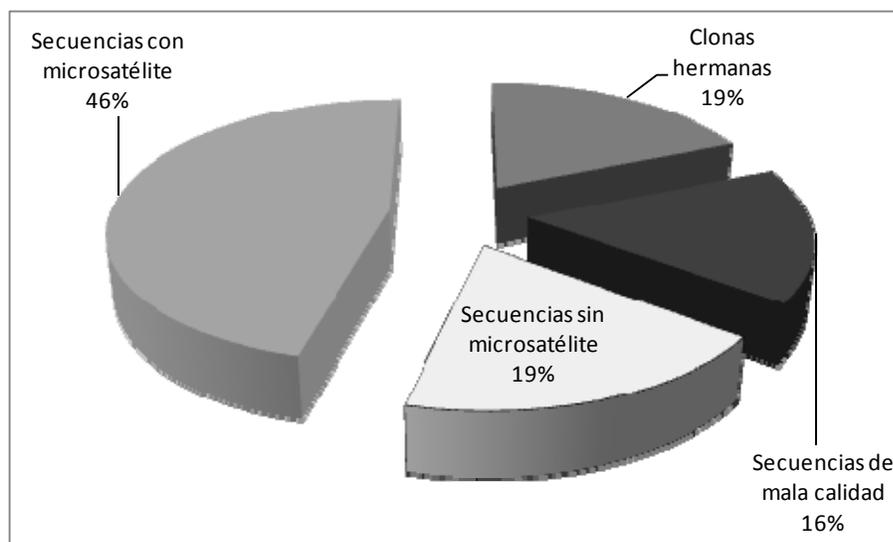


Figura 8. Diagrama porcentual del rendimiento de genotecas generadas en *H. corrugata*.

Entre las seis genotecas se registró un total 83 regiones microsatélites. De éstas la gran mayoría estuvo constituida por dinucleótidos (73.5%), seguidos por los tetranucleótidos (14.5%) y en menor medida por trinucleótidos (10.8 %). Las regiones de microsatélites dinucleótidos con 4 a 10 repeticiones fueron las más abundantes. Dentro de las regiones microsatélite de tri y tetranucleótidos las más abundantes fueron los de tres repeticiones. Solo se detectó una región de pentanucleótidos de tres repeticiones (Tabla II).

En general las regiones microsatélites (GT/AC) estuvieron mejor representadas en las genotecas con 37 dinucleótidos y 5 trinucleótidos. Las segundas mejor representadas fueron las regiones (CT/AG) con 18 dinucleótidos, 2 trinucleótidos y 1 pentanucleótido. Las regiones (GT/AC+CT/AG) se encontraron representadas por 11 tetranucleótidos y las regiones (TA/AT) a pesar de no haber sido seleccionadas durante el enriquecimiento con alguna sonda, se encontraron representadas por 6 dinucleótidos, 2 trinucleótidos y 1 tetranucleótido (Tabla II).

En consideración de los motivos de repetición, los microsatélites dinucleótidos más abundantes fueron los que presentaron GT, seguidos de CT, con 4–10 y 21–40 repeticiones, respectivamente. Los microsatélites trinucleótidos más abundantes fueron TTG, TCA y ATT de tres repeticiones. Los microsatélites tetranucleótidos más abundantes fueron TCAC y GAGT de tres y 4–10 repeticiones (Tabla II).

Tabla II. Resumen de regiones microsatélites encontradas en *H. corrugata* entre las seis genotecas.

Motivo	N. R.					
Di		(GT)	(TA)	(CT)		Σ
	3	9	5	4		18
	4 - 10	16	1	4		21
	11 - 20	8		2		10
	21 - 40	4		8		12
					Subtotal	61 (73.5%)
Tri		(TTG)	(TCA)	(CCA)	(ATT)	
	3	2	2	1	2	7
	4 - 10	1		1		2
						Subtotal
						9 (10.8%)
Tetra		(CTCG)	(TCAC)	(AATT)	(GAGT)	
	3	1	3	1	1	6
	4 - 10		3		2	5
	11 - 20		1			1
						Subtotal
						12 (14.5%)
Penta		(TCACC)				
	3	1				1
						Subtotal
						1 (1.2%)
					Total	83 (100%)

N.R.; Número de repeticiones.

De las 59 secuencias que mostraron regiones microsatélites en 25 no se pudieron diseñar iniciadores por que uno de los extremos no lo permitía (se perdía la señal de la secuencia) ó más comúnmente por que la secuencia del microsatélite se presentaba pegada a la secuencia del plásmido De 34 secuencias de buena calidad y con suficiente espacio flanqueante a la región microsatélite, se diseñaron 40 pares de iniciadores (Apéndice III).

De los 40 pares de iniciadores diseñados 26 pares fueron amplificados exitosamente dentro del tamaño esperado. De éstos, 16 fueron monomórficos y 10 mostraron polimorfismo. En total se obtuvieron 10 nuevos loci para *H. corrugata* (*Hco6*, *Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco23*, *Hco43*, *Hco47*, *Hco97*, *Hco194*) (Fig. 9).

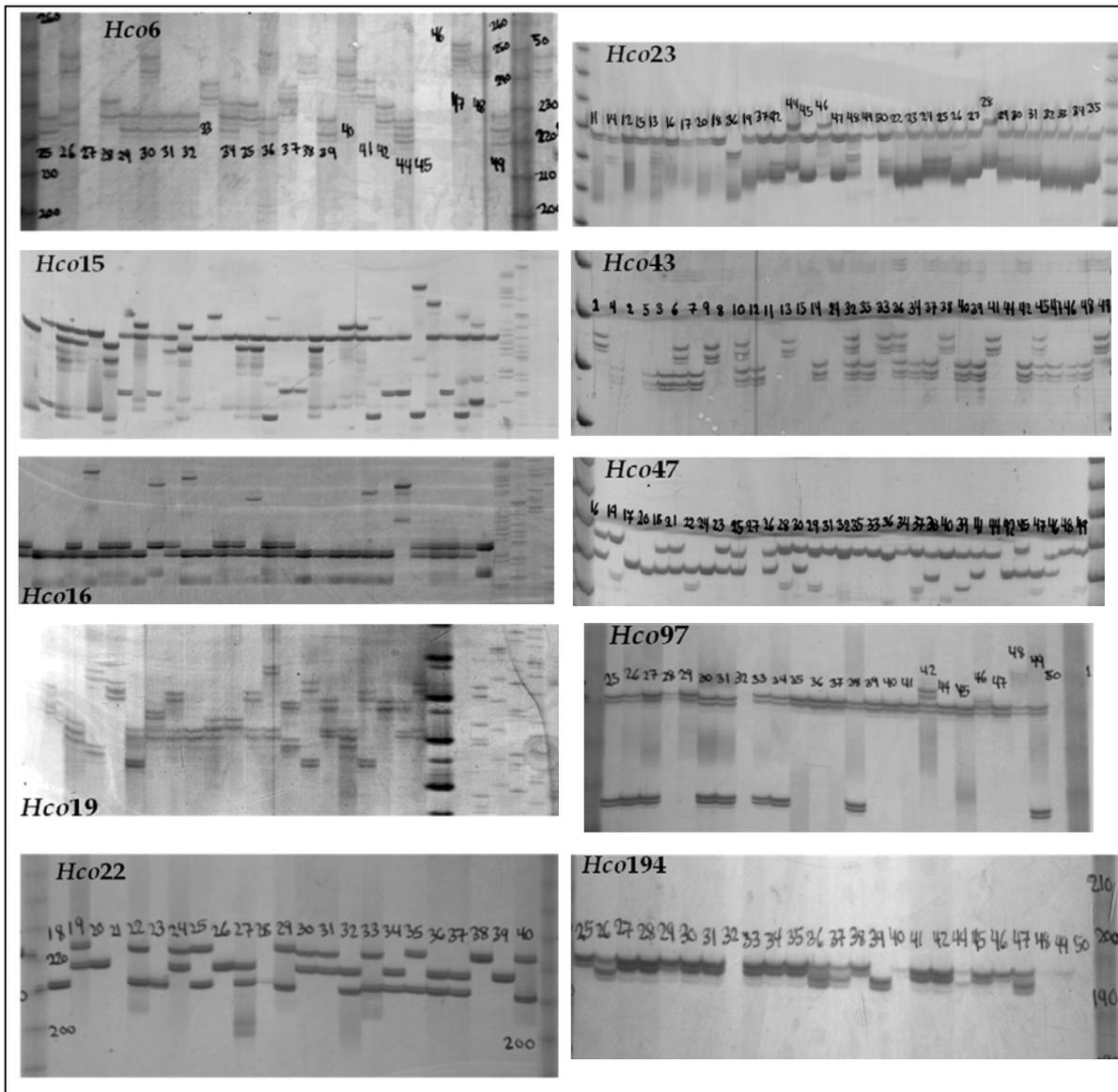


Figura 9. Patrones de bandeo en 10 nuevos microsatélites de *H. corrugata*.

5.1.2. Optimización de Microsatélites

Las condiciones óptimas de amplificación tanto para los microsatélites obtenidos de la amplificación cruzada así como para los del aislamiento, fueron las siguientes; en un volumen final de 12.5 μ L se agregaron 1 μ L de ADN, Buffer 1X para Taq (Invitrogen), 2.1 mM de MgCl₂, 0.48 μ M de cada iniciador, 0.2 mM dNTP's y 0.0125 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen). Las condiciones termales finales de PCR fueron 2 min a 95°C, seguidos por 30–35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a la temperatura de acoplamiento y 45s a 72°C, y una extensión final de 2 min a 72°C. La mayoría de los microsatélites compartieron las condiciones óptimas de amplificación, solo algunos microsatélites tuvieron algunas modificaciones en la concentración final de MgCl₂, el número de ciclos ó duración de la desnaturalización inicial y extensión final (Tabla III).

Tabla III. Temperaturas de acoplamiento (*T_a*), concentraciones de MgCl₂ (mM) y Número de ciclos empleados en la amplificación de microsatélites de abulón amarillo *Haliotis corrugata*

Locus	<i>T_a</i> (°C)	MgCl ₂ (mM)	No. de ciclos
<i>Hco6</i>	61	2.1	30
<i>Hco15</i>	62.3	2.1	30
<i>Hco16</i>	59.5	2.1	35
<i>Hco19</i>	53.1	3.5	35
<i>Hco22</i>	55	2.1	30
<i>Hco23</i>	59	2.1	30
<i>Hco43</i> [†]	51	2.1	35
<i>Hco47</i>	51	2.1	30
<i>Hco97</i>	61	2.1	30
<i>Hco194</i>	59	2.1	30
<i>Hka3</i> [§]	53.1	2.1	35
<i>Hka40</i> [§]	49	2.1	35
<i>Hka56</i> [§]	44.5	2.1	35

[†], microsatélite con una desnaturalización inicial de 15 min y una extensión final de 10 min

[§], microsatélites aislados en *H. kamtschatkana* que fueron amplificados en *H. corrugata*.

5.1.3. Estimación de la diversidad genética de los microsatélites, en una muestra silvestre

Para validar a los 13 microsatélites, obtenidos por amplificación cruzada (3) y directamente del genoma de *H. corrugata* (10), se obtuvieron los índices de diversidad genética en una muestra silvestre ($n = 49$) de *H. corrugata*. La variabilidad, considerando el número de alelos, fue de baja a alta en los 13 loci microsatélites, observándose de dos a cuatro alelos en algunos loci (*Hco43*, *Hco194*, *Hco23* y *Hka56*), mientras que en otros se apreciaron de 55 a 57 alelos (*Hka3* y *Hka40*, respectivamente). La mayoría de los loci presentaron heterocigosidades observadas de moderadas a altas (0.5–0.9), con cuatro loci mostrando valores menores a 0.5 (*Hco6*, *Hco23*, *Hco43*, *Hco194*) (Tabla IV).

5.1.4. Equilibrio de Hardy-Weinberg y Desequilibrio de Ligamiento

Después del ajuste secuencial de Bonferroni se observaron desviaciones ($P < 0.006$) del equilibrio de Hardy-Weinberg en cuatro loci (*Hco6*, *Hco23*, *Hco43*, *Hka40*), debidas a deficiencia de heterocigotos (Tabla IV). Después del ajuste secuencial de Bonferroni ($P > 0.05$) no se apreció desequilibrio de ligamiento entre todos los pares de loci.

Tabla IV. Caracterización de microsatélites en el abulón amarillo *Haliotis corrugata*. n , tamaño de muestra; N_A , número de alelos; H_O , heterocigosidad observada; H_E , heterocigosidad esperada. * Desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.006$).

Locus	Motivo de repetición	Secuencias de iniciadores (5'-3')	n	N_A	Intervalo de tallas (bp)	H_O	H_E	No. de acceso en GenBank
<i>Hco6</i>	(CA) ₁₂	F: CCACGCACATACCAAACACA R: AAGGAGGCAGTGGTGCAAAA	42	17	223–271	0.405*	0.830	EF694951
<i>Hco15</i>	(TCAC) ₆ ...(CT) ₅ ...(TCAC) ₃	F: CTGACGCAACCTCCTATGGT R: CTTCTCAGGGCTTTACACAGG	49	10	195–235	0.510	0.516	EF694952
<i>Hco16</i>	(TTG) ₄	F: TATCAGGCCCTCGATGGCTAC R: TCACGTTATCCATCCGTTCA	49	8	204–246	0.653	0.601	EF694953
<i>Hco19</i>	(TG) ₁₀ (TGCG) ₅ (TG) ₉	F: CGATCCACGCAATTGGAATA R: CACCGAGTCGTGTGAGCATA	48	17	151–191	0.646	0.860	EF694954
<i>Hco22</i>	(CTCG) ₃	F: GTCTCTGTCCGATCCTCCTT R: CACAACCGTAGGCAATATCA	49	6	211–225	0.694	0.754	EF694955
<i>Hco23</i>	(TGAG) ₄	F: GCATGAGCAACGATCTACGA R: TCCCACATTACGTTACACG	48	4	222–233	0.104*	0.213	EF694956
<i>Hco43</i>	(CA) ₇ ...(CA) ₇ .. (CA) ₆	F: GGTATCTCAGTGAGCTTGCAC R: CCTACAATGGACTCCGGTTT	42	2	192–197	0.143*	0.433	EF694957
<i>Hco47</i>	(AC) ₃ (TCAC) ₂ TCAT(TCAC) ₄	F: AGGCTCGCTGACTTGGTT R: CCTCAGGCCGAAAATGTTA	47	6	238–248	0.617	0.686	EF694958
<i>Hco97</i>	(CT) ₅ C(CT) ₂	F: CTTCCACCCGCATTGTTC R: CGAGAGAGCGACAGAAAGAC	49	7	177–211	0.551	0.497	EF694959
<i>Hco194</i>	(TA) ₆	F: TAAGCTCAGGCACCGAAAAGT R: TCAGCCGTATAGCAACGAGA	49	2	196–198	0.224	0.262	EF694960
<i>Hco-Hka3</i> [§]	(GTA) ₁₆ (GAGT) ₁₀	F: GTGAGATGTTGGTGACT R: CCGTTATTCACCTCTTA	49	55	193–332	0.939	0.982	EU090247
<i>Hco-Hka40</i> [§]	(CA) ₃₀	F: CCCTAAACAGATATTGACAAT R: CTAGCAATATTCAAAAATTACAAG	49	57	203–365	0.694*	0.986	NS
<i>Hco-Hka56</i> [§]	(CA) ₂₇	F: CGATAATCGTGTGGTAAGA R: GTGGCATGGTATCTCATT	48	4	237–254	0.500	0.515	EU090246

[§], microsatélites aislados en *H. kamtschatkana* que fueron amplificados en *H. corrugata*
NS, no existe secuencia disponible para *H. corrugata*.

5.2. DETERMINACIÓN DE HERENCIA MENDELIANA EN MICROSATÉLITES DE

H. corrugata

5.2.1. Pruebas de segregación mendeliana

El ADN de las larvas de *H. corrugata* fue amplificado exitosamente en los 10 microsatélites en la mayoría de la muestras ($n = 29–32$) de cada una de las tres familias. Los genotipos de los progenitores, el número de genotipos observados y esperados de los descendientes para cada familia en cada uno de los diez loci se muestran en las tablas V

(familia A), VI (familia B) y VII (familia C). De las 30 proporciones genotípicas observadas (3 familias por 10 loci), siete provienen de cruzas entre padres homocigotos con el mismo alelo (*Hco16* en la familia A, *Hco15* y *Hco16* en la familia B, y *Hco15*, *Hco16*, *Hco97* y *Hka56* en la familia C) que resultaron en descendencia idéntica a los padres. Veinte proporciones genotípicas mostraron segregación Mendeliana ($P > 0.09$). Las tres proporciones genotípicas restantes mostraron segregación Mendeliana cuando se asumió que uno de los padres portaba un alelo nulo en estado de heterocigoto y las clases genotípicas de homocigotos no esperadas eran heterocigotos para alelos nulos.

5.2.1.1. Familia A

En la familia A se corroboró herencia Mendeliana en los loci *Hco15*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco47-2*, *Hco97*, *Hco194*, *Hka3* y *Hka56*. Los genotipos de *Hco15*, *Hco22* y *Hka56* se segregaron de acuerdo a las proporciones 1:1, donde uno de los padres fue homocigoto y el otro heterocigoto. Los genotipos de *Hco97* y *Hco194* se segregaron de acuerdo a las proporciones 1:2:1, donde los dos padres presentaron el mismo genotipo heterocigoto. Los genotipos de *Hco19*, *Hco47-2* y *Hka3* se segregaron de acuerdo a las proporciones 1:1:1:1, en donde los dos padres fueron heterocigotos para alelos distintos. En *Hco16* la descendencia provino de padres homocigotos con genotipos idénticos. En el caso de *Hco47-1* las proporciones genotípicas observadas y esperadas se ajustaron cuando se asumió que la hembra portaba un alelo no amplificado (nulo) en toda de la progenie (Tabla V). En esta familia se observó una misma larva con tres alelos en los loci *Hco22*, *Hco47-2* y *Hka3*, presentando los dos alelos de la madre y uno del padre (Fig. 10).

Tabla V. Segregación de loci de microsatélites en larvas de *Haliotis corrugata* de la familia A.

Locus	Genotipos de progenitores		Número de genotipos observados en cada clase genotípica ^a				χ^2	P
	Hembra	Macho						
<i>Hco15</i>	222/222	203/222	222/222 18(15.5)	203/222 13(15.5)			0.806	0.369
<i>Hco16</i>	212/212	212/212	212/212 32(32)				0	1
<i>Hco19</i>	174/180	164/166	164/174 8(7.75)	166/174 7(7.75)	164/180 7(7.75)	166/180 9(7.75)	0.347	0.841
<i>Hco22</i>	217/221	212/212	212/217 13(15.5)	212/221 18(15.5)			0.806	0.369
<i>Hco47-1^b</i>	241/248	248/248	241/248 0(16)	248/248 32(16)			32	0.000*
<i>Hco47-1^c</i>	nulo/248	248/248	nulo/248, 248/248 32(32)				0	1
<i>Hco47-2</i>	320/338	330/344	320/330 9(7.75)	320/344 8(7.75)	330/338 8(7.75)	338/344 6(7.75)	0.613	0.893
<i>Hco97</i>	175/201	175/201	175/175 8(8)	175/201 11(16)	201/201 13(8)		4.688	0.096
<i>Hco194</i>	196/198	196/198	196/196 6(8)	196/198 22(16)	198/198 4(8)		4.750	0.093
<i>Hka3</i>	245/262	232/255	232/245 9(7.75)	232/262 8(7.75)	245/255 7(7.75)	255/262 7(7.75)	0.355	0.949
<i>Hka56</i>	244/244	242/244	242/244 18(16)	244/244 14(16)			0.500	0.480

^a; Frecuencias esperadas de acuerdo a segregación Mendeliana entre paréntesis, ^b; Frecuencias observadas en *Hco47-1*, ^c; Frecuencias corregidas de *Hco47-1*, asumiendo la presencia de alelos nulos. * $P < 0.09$, después del ajuste secuencial de Bonferroni.

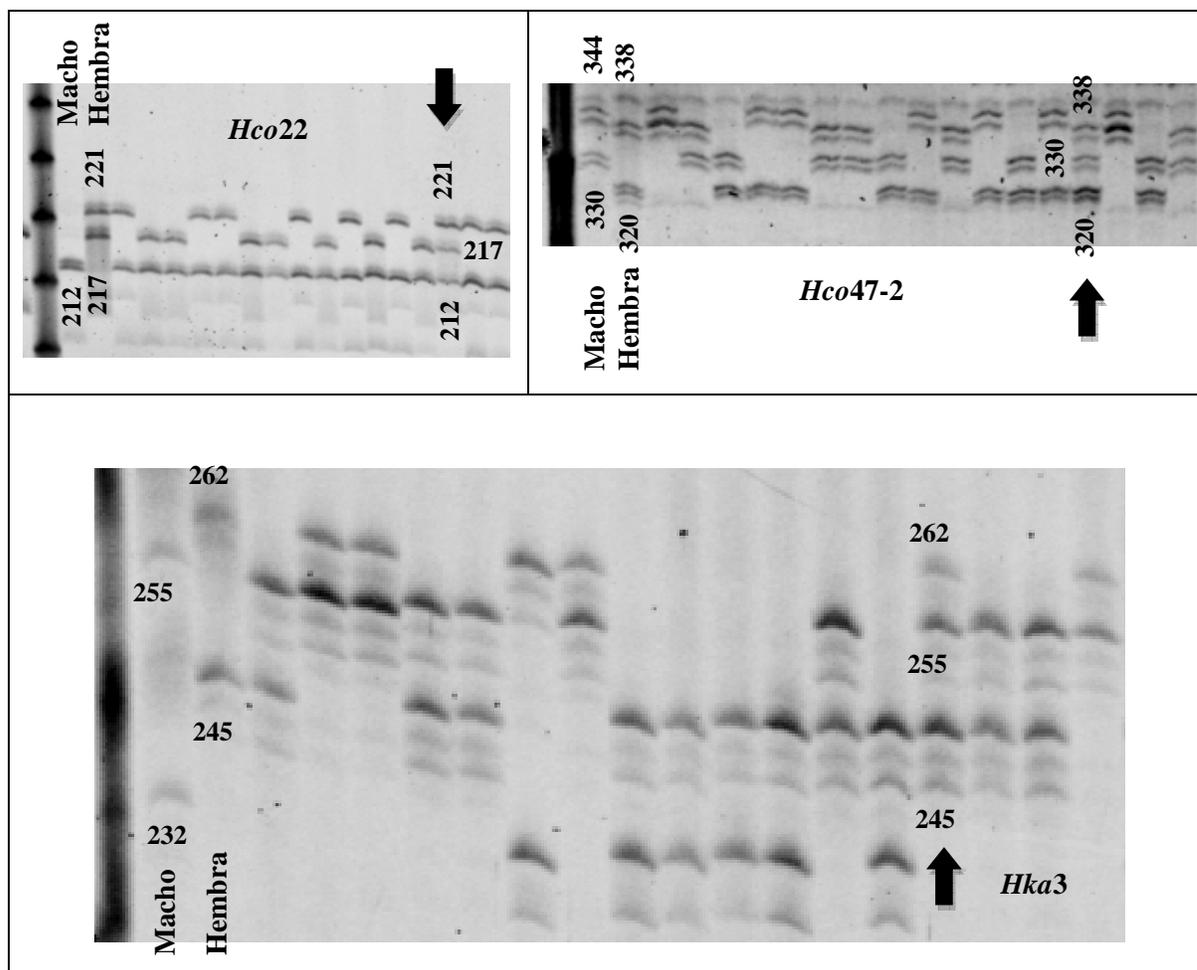


Figura 10. Genotipos de la misma larva en la familia A, con tres alelos (flecha negra) en tres loci diferentes.

5.2.1.2. Familia B

En la familia B se corroboró herencia Mendeliana en los loci *Hco22*, *Hco47-1*, *Hco47-2*, *Hco97*, *Hco194*, *Hka3* y *Hka56*. Los genotipos de *Hco97*, *Hco194*, *Hka3* y *Hka56* se segregaron de acuerdo a las proporciones 1:1. Los genotipos de *Hco22* y *Hco47-1* se segregaron de acuerdo a las proporciones 1:2:1. Los genotipos de *Hco47-2* se segregaron de acuerdo a las proporciones 1:1:1:1, donde los dos padres fueron heterocigotos pero compartían un alelo en común. En *Hco15* y *Hco16* la descendencia provino de padres

homocigotos con genotipos idénticos. En el caso de *Hco19* las proporciones genotípicas observadas y esperadas se ajustaron cuando se asumió que el macho portaba un alelo nulo (Tabla VI). En esta familia se detectó una larva con genotipos diferentes a los esperados de los progenitores en los loci *Hco19*, *Hco22* y *Hka3* (Fig. 11). Al revisar los genotipos de este individuo pudimos corroborar que se trataba de una larva de la familia C y que por error se había mezclado con las larvas de la familia B.

Tabla VI. Segregación de loci de microsatélites en larvas de *Haliothis corrugata* de la familia B.

Locus	Genotipos de progenitores		Número de genotipos observados en cada clase genotípica ^a				χ^2	P
	Hembra	Macho						
<i>Hco15</i>	222/222	222/222	222/222 31(31)				0	1
<i>Hco16</i>	212/212	212/212	212/212 31(31)				0	1
<i>Hco19^b</i>	164/174	162/162	164/164 10(0)	162/164 6(15)	162/174 6(15)	174/174 8(0)	NR	–
<i>Hco19^c</i>	164/174	nulo/162	nulo/164 10(7.5)	162/164 6(7.5)	162/174 6(7.5)	nulo/174 8(7.5)	1.467	0.689
<i>Hco22</i>	212/217	212/217	212/212 5(7.5)	212/217 16(15)	217/217 9(7.5)		1.200	0.549
<i>Hco47-1</i>	241/248	241/248	241/241 9(7.5)	241/248 15(15)	248/248 6(7.5)		0.600	0.741
<i>Hco47-2</i>	330/334	334/338	330/334 9(7.5)	334/334 7(7.5)	330/338 11(7.5)	334/338 3(7.5)	4.667	0.198
<i>Hco97</i>	203/204	201/201	201/203 14(14.5)	201/204 15(14.5)			0.034	0.853
<i>Hco194</i>	198/198	196/198	196/198 17(15)	198/198 13(15)			0.533	0.465
<i>Hka3</i>	266/282	272/272	266/272 17(15)	272/282 13(15)			0.533	0.465
<i>Hka56</i>	242/244	244/244	242/244 16(15)	244/244 14(15)			0.133	0.715

^a; Frecuencias esperadas de acuerdo a segregación Mendeliana entre paréntesis, ^b; Frecuencias observadas en *Hco19*, ^c; Frecuencias corregidas de *Hco19*, asumiendo la presencia de alelos nulos. NR; Análisis no realizado por la aparición de clases genotípicas no esperadas.

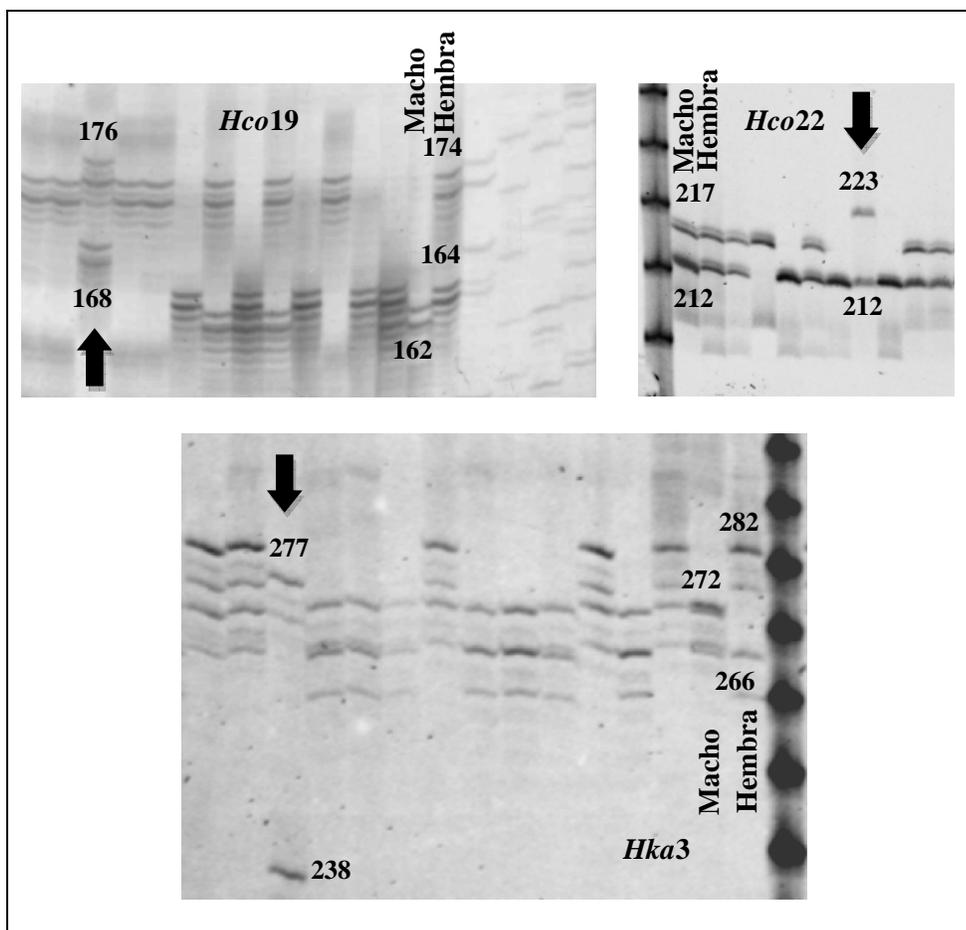


Figura 11. Genotipos multilocus de una misma larva (flecha negra) de la familia C, detectada en la familia B.

5.2.1.3. Familia C

En la familia C se corroboró herencia Mendeliana en los loci *Hco19*, *Hco22*, *Hco47-2*, *Hco194* y *Hka3*. Los genotipos de *Hco22*, *Hco47-2*, *Hco194* y *Hka3* se segregaron de acuerdo a las proporciones 1:1. Los genotipos de *Hco19* se segregaron de acuerdo a las proporciones 1:1:1:1, donde los dos padres fueron heterocigotos para alelos distintos. En *Hco15*, *Hco16*, *Hco97* y *Hka56*, la descendencia provino de padres homocigotos con genotipos idénticos. En el caso de *Hco47-1* las proporciones genotípicas observadas y esperadas se ajustaron cuando se asumió que el macho portaba un alelo nulo

(Tabla VII). En esta familia también se observó una larva con tres alelos en los loci *Hco19* y *Hka3*, presentando los dos alelos de la madre y uno del padre (Fig. 12).

Tabla VII. Segregación de loci de microsatélites en larvas de *Haliotis corrugata* de la familia C.

Locus	Genotipos de progenitores		Número de genotipos observados en cada clase genotípica ^a				χ^2	P
	Hembra	Macho						
<i>Hco15</i>	222/222	222/222	222/222 31(31)				0	1
<i>Hco16</i>	212/212	212/212	212/212 31(31)				0	1
<i>Hco19</i>	168/182	166/176	166/168 5(7.5)	168/176 7(7.5)	166/182 11(7.5)	176/182 7(7.5)	1.903	0.593
<i>Hco22</i>	212/212	212/223	212/212 19(15)	212/223 11(15)			2.133	0.144
<i>Hco47-1^b</i>	242/248	248/248	242/242 5(0)	242/248 9(15)	248/248 16(15)		NR	–
<i>Hco47-1^c</i>	242/248	nulo/248	nulo/242 5(7.5)	242/248 9(7.5)	nulo/248, 248/248 16(15)		1.2	0.549
<i>Hco47-2</i>	338/338	330/344	330/338 17(14.5)	338/344 12(14.5)			0.862	0.353
<i>Hco97</i>	201/201	201/201	201/201 31(31)				0	1
<i>Hco194</i>	198/198	196/198	198/198 14(15.5)	196/198 17(15.5)			0.533	0.465
<i>Hka3</i>	277/300	238/238	277/238 15(14.5)	238/300 14(14.5)			0.034	0.853
<i>Hka56</i>	244/244	244/244	244/244 32(32)				0	1

^a; Frecuencias esperadas de acuerdo a segregación Mendeliana entre paréntesis, ^b; Frecuencias observadas en *Hco47-1*, ^c; Frecuencias corregidas de *Hco47-1*, asumiendo la presencia de alelos nulos. NR; Análisis no realizado por la aparición de una clase genotípica no esperada.

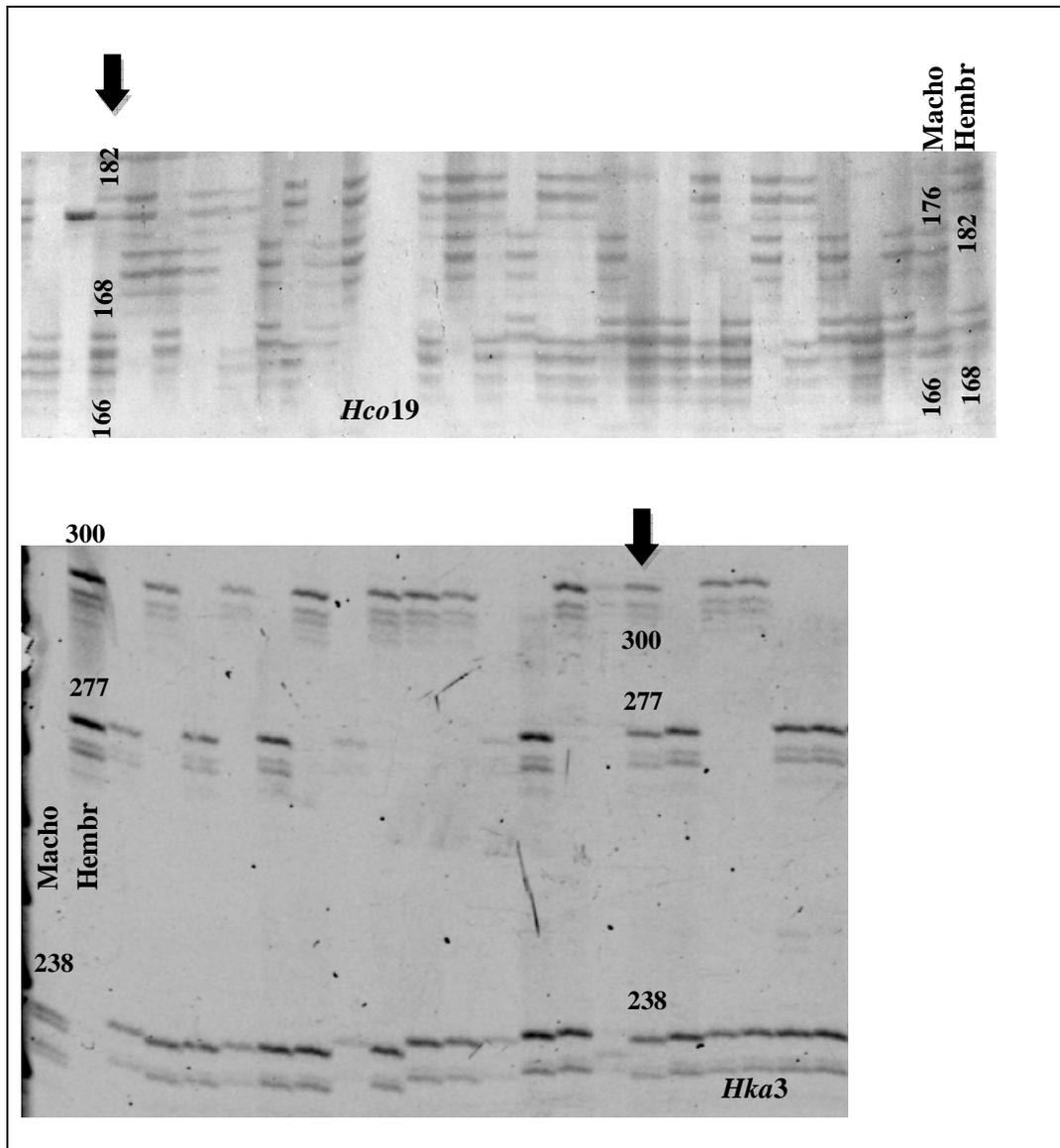


Figura 12. Genotipos de la misma larva en la familia C, con tres alelos (flecha negra) en dos loci diferentes.

5.3. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL DE *H. corrugata*

5.3.1. Análisis de tallas

5.3.1.1. Diferencias entre localidades

Mediante una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (datos no normales), se observó que existen diferencias entre las distribuciones de las tallas de algunas localidades (Tabla VIII). La media de San Clemente Island fue diferente de la media de Isla Cedros, La Bocana y San Juanico ($P < 0.05$), pero no de la media de Isla Natividad. La media de Isla Cedros fue diferente de la media de todas las localidades. La media de Isla Natividad solo fue diferente de las medias de Isla Cedros y San Juanico. La media de San Juanico fue diferente a la de todas las localidades (Figura 13).

Tabla VIII. Prueba de Kruskal-Wallis: $H(4, N=327) = 121.6486$ $P = 0.000$. Valores de P para comparaciones múltiples (2 colas), en negritas las diferencias significativas.

	SCI	IC	IN	LB	SJ
	R:183.29	R:242.79	R:167.67	R:136.26	R:53.787
SCI		0.001966	1.000000	0.032515	0.000000
IC			0.000026	0.000000	0.000000
IN				0.493208	0.000000
LB					0.000037
SJ					

SCI; San Clemente Island, IC; Isla Cedros, IN; Isla Natividad, LB; La Bocana y SJ; San Juanico.

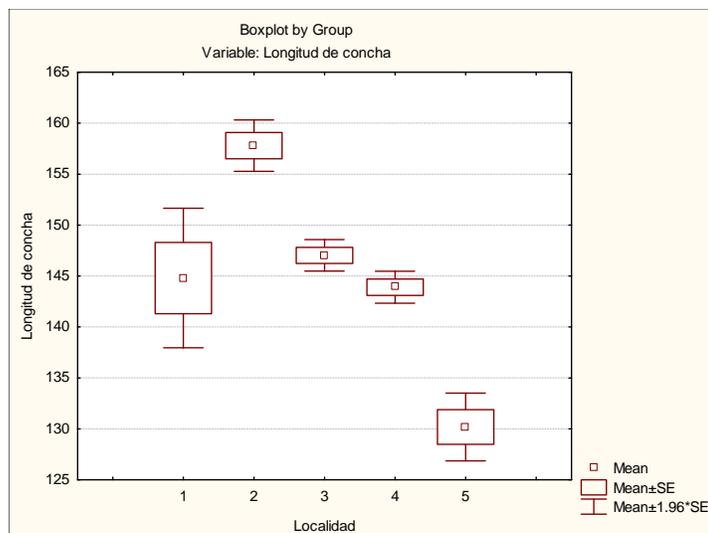


Figura 13. Gráfico de Caja con bigotes para las medias de longitud de concha de las localidades San Clemente Island (1), Isla Cedros (2), Isla Natividad (3), La Bocana (4) y San Juanico (5).

5.3.1.2. Diferencias entre sexos

A través de una prueba “t de Student” se determinó que no existen diferencias entre las medias de tallas entre machos y hembras de *H. corrugata* de la localidad Isla Cedros ($t = -0.107, P = 0.915$), (Fig. 14).

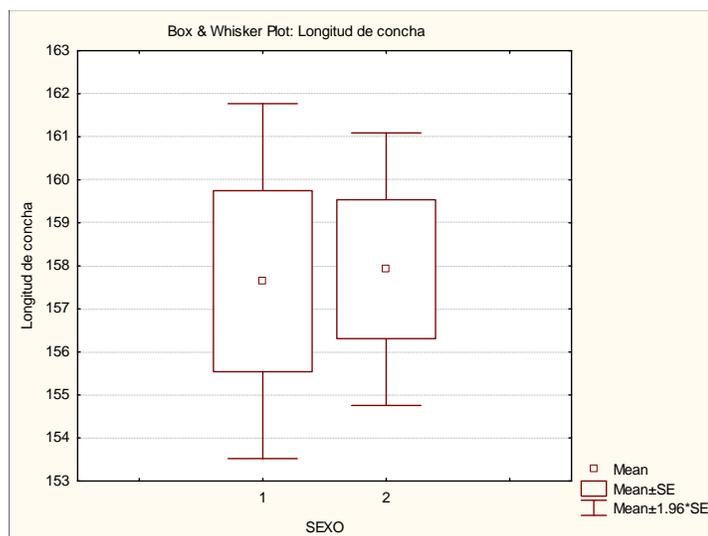


Figura 14. Gráfico del promedio de la longitud de concha por sexo para la muestra de Isla Cedros. 1; Hembras, 2; Machos.

5.3.2. Análisis genético

5.3.2.1. Diversidad genética

La mayoría de los loci estuvieron en EHW, a excepción del locus *Hco47-1* para todas las localidades y *Hco19* en Isla Natividad ($P < 0.007$). En ambos loci, el desequilibrio fue causado por un déficit de heterocigotos. Basándonos en las desviaciones del EHW del locus *Hco47-1* y determinación de herencia Mendeliana (sección anterior), se sospechó la presencia de alelos nulos en este locus. Los estimados de las frecuencias de alelos nulos en *Hco47-1* por localidad (0.143 en San Clemente Island, 0.093 en Isla Cedros, 0.136 en Isla Natividad, 0.149 en La Bocana y 0.084 en San Juanico) obtenidos con MICRO-CHECKER confirmaron este hecho y debido a la influencia potencial de los alelos nulos en los resultados globales, *Hco47-1* fue excluido de los análisis subsecuentes.

En cualquier locus, los dos alelos más comunes se compartieron entre todas las localidades, pero algunos loci mostraron diferencias importantes en sus frecuencias alélicas. Los loci *Hco22*, *Hco194* y *Hka56* mostraron mayores diferencias entre San Clemente Island y las localidades mexicanas que *Hco15*, *Hco16* y *Hco97*, que fueron más homogéneos. El locus *Hco19* mostró las diferencias más marcadas en frecuencias de los alelos comunes entre la mayoría de las localidades (Fig. 15).

La diversidad genética promedio en abulón amarillo osciló de 6.571–8.857 para N_A , 2.892–3.342 para N_{EA} y 0.500–0.586 para H_O (Tabla IX). Se observó diferenciación genética entre San Clemente Island y las localidades mexicanas para N_A ($P < 0.001$), pero no se observaron diferencias para N_{EA} ($P = 0.953$) ó H_O ($P = 0.937$).

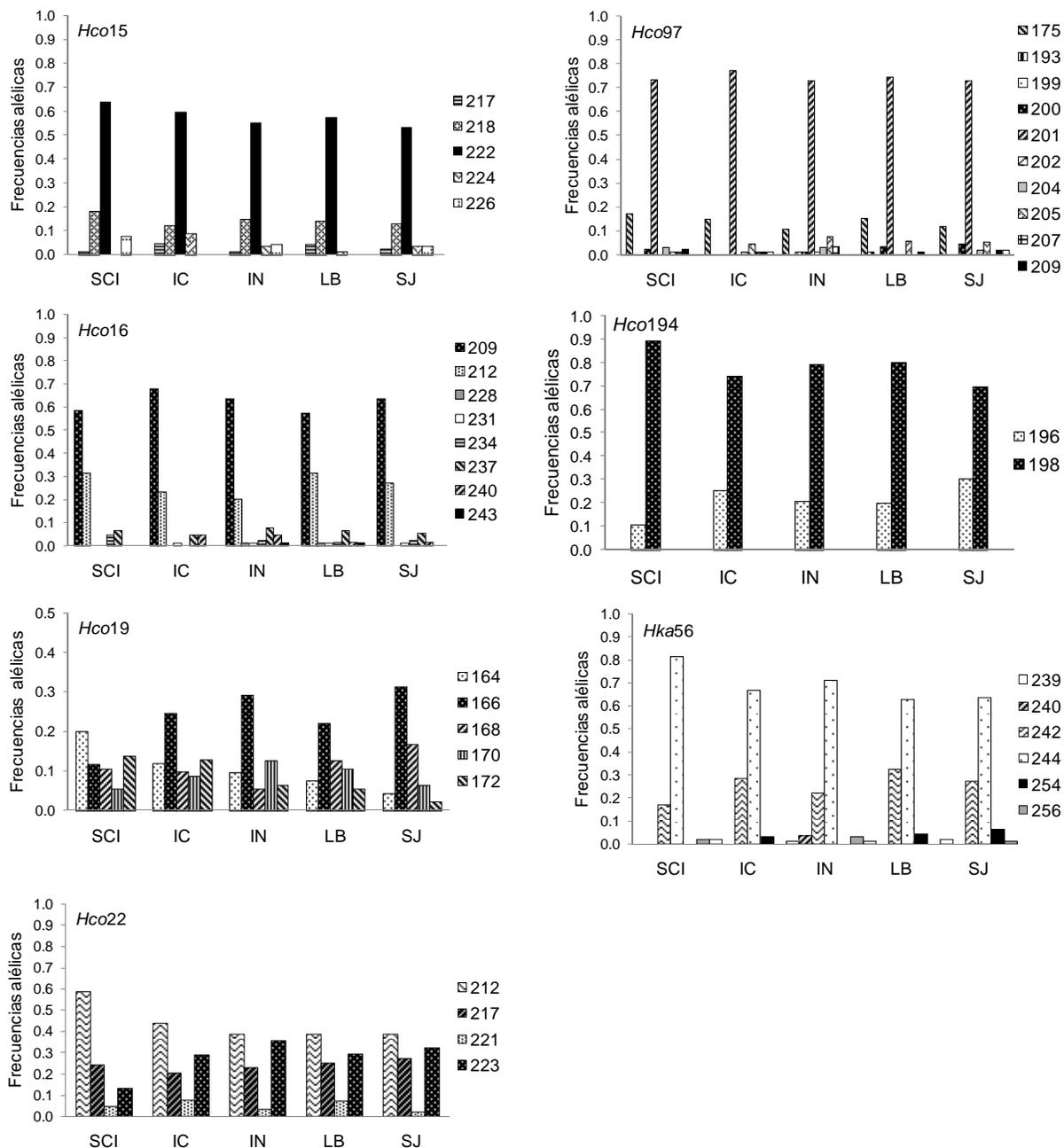


Figura 15. Frecuencias alélicas de *Haliotis corrugata* con siete microsatélites en cinco localidades: San Clemente Island (SCI), Isla Cedros (IC), Isla Natividad (IN), La Bocana (LB) y San Juanico (SJ). Los loci *Hco15* y *Hco19* únicamente muestran los cinco alélos más comunes de 28 y 26 alélos, respectivamente.

Tabla IX. Diversidad genética de *Haliotis corrugata*, usando siete microsatélites en cinco localidades: San Clemente Island (SCI), Isla Cedros (IC), Isla Natividad (IN), La Bocana (LB) y San Juanico (SJ). Los símbolos son: Tamaño de muestra (n), Número de alelos (N_A), Número de alelos efectivos (N_{EA}), Heterocigosidades observadas (H_O), Heterocigosidades esperadas (H_E), y probabilidades de pruebas exactas de Fisher (P).

Locus		Localidades				
		SCI	IC	IN	LB	SJ
<i>Hco15</i>	n	48	47	48	48	48
	N_A	10	13	13	18	16
	N_{EA}	2.258	2.621	2.941	2.825	3.195
	H_O	0.563	0.638	0.708	0.667	0.667
	H_E	0.563	0.625	0.667	0.653	0.694
	P	0.677	0.572	0.975	0.808	0.271
<i>Hco16</i>	n	48	48	48	48	48
	N_A	4	5	8	8	6
	N_{EA}	2.255	1.943	2.219	2.324	2.081
	H_O	0.521	0.521	0.583	0.583	0.500
	H_E	0.562	0.491	0.555	0.576	0.525
	P	0.609	0.540	0.666	0.185	0.765
<i>Hco19</i>	n	48	47	48	48	48
	N_A	16	18	17	20	17
	N_{EA}	8.913	8.431	7.564	9.719	6.658
	H_O	0.854	0.894	0.833	0.792	0.896
	H_E	0.897	0.891	0.877	0.907	0.859
	P	0.166	0.199	0.001*	0.016	0.997
<i>Hco22</i>	n	46	47	48	48	48
	N_A	4	4	4	4	4
	N_{EA}	2.377	3.133	3.053	3.317	3.062
	H_O	0.652	0.638	0.750	0.771	0.708
	H_E	0.586	0.688	0.680	0.706	0.680
	P	0.824	0.067	0.881	0.851	0.881
<i>Hco97</i>	n	47	48	48	47	48
	N_A	7	7	8	6	7
	N_{EA}	1.755	1.619	1.818	1.722	1.816
	H_O	0.468	0.375	0.396	0.319	0.417
	H_E	0.435	0.386	0.455	0.424	0.454
	P	0.299	0.067	0.201	0.018	0.018
<i>Hco194</i>	n	47	47	48	45	48
	N_A	2	2	2	2	2
	N_{EA}	1.235	1.614	1.492	1.471	1.729
	H_O	0.170	0.298	0.292	0.356	0.354
	H_E	0.192	0.384	0.333	0.324	0.426
	P	0.413	0.136	0.394	0.664	0.306
<i>Hka56</i>	n	48	48	48	48	48
	N_A	3	4	5	4	5
	N_{EA}	1.453	1.905	1.813	2.013	2.077
	H_O	0.271	0.375	0.438	0.458	0.563
	H_E	0.315	0.480	0.453	0.509	0.524
	P	0.202	0.009	0.821	0.418	0.327
<i>Mean</i>	n	47.43	47.43	48	47.43	48
	N_A	6.571	7.571	8.143	8.857	8.143
	N_{EA}	2.892	3.038	2.986	3.342	2.945
	H_O	0.500	0.534	0.571	0.564	0.586
	H_E	0.507	0.564	0.574	0.586	0.595

*Desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.007$), después de Bonferroni.

5.3.2.2. Diferencias entre localidades

El AMOVA global mostró diferenciación genética baja entre poblaciones ($F_{ST} = 0.007$) pero altamente significativa ($P < 0.001$). Un análisis de F_{ST} pareados indicó que San Clemente Island fue la que contribuyó a tal diferenciación por que se observaron diferencias significativas ($P < 0.008$) entre San Clemente Island y cada una de las localidades mexicanas, pero no entre las localidades mexicanas (Tabla X). El AMOVA jerárquico indicó que 2.26% ($F_{ST} = 0.021$, $P < 0.001$) de la variación genética se presentó entre San Clemente Island y el grupo mexicano, sin diferenciación significativa entre poblaciones dentro del grupo mexicano (Tabla XI). Los loci que dieron soporte a la estructura poblacional fueron el *Hco19*, *Hco22*, *Hco194* y *Hka56*. La estructura genética poblacional en el abulón amarillo también fue sustentada por un dendrograma UPGMA, donde la división entre San Clemente Island y las localidades mexicanas tuvieron un soporte de 100% de “bootstrap”. Valores menores al 50% de bootstrap no dieron soporte a un patrón específico de agrupamiento en las ramas de las localidades mexicanas (Fig. 16).

La diferenciación genética altamente significativa fue sustentada por los estimados de poder estadístico obtenidos con POWSIM, cuando se usaron 48 individuos por localidad (Fig. 17a) y siete loci (Fig. 17b). Aún cuando *Hco47* fue eliminado, el poder estadístico para detectar diferenciación genética permaneció alto (99.99–100%).

Tabla X. Estimados de F_{ST} pareados entre localidades (arriba de la diagonal) y sus valores de P respectivos (debajo de la diagonal). Localidades: San Clemente Island (SCI), Isla Cedros (IC), Isla Natividad (IN), La Bocana (LB), y San Juanico (SJ).

	SCI	IC	IN	LB	SJ
SCI		0.018	0.020	0.019	0.031
IC	0.001*		-0.003	-0.003	-0.001
IN	0.000*	0.767		-0.001	-0.001
LB	0.000*	0.810	0.541		-0.003
SJ	0.000*	0.623	0.595	0.835	

*Valores P (de cada F_{ST}) significativos ($P < 0.008$) después de la prueba de ajuste secuencial de Bonferroni.

Tabla XI. Resultados del AMOVA jerárquico de diferencias poblacionales con siete loci en dos grupos: (1) Localidad de E.U. (San Clemente Island) y (2) Localidades mexicanas (Isla Cedros, Isla Natividad, La Bocana y San Juanico).

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	8.552	0.04501	2.26
Entre poblaciones dentro de grupos	4.917	-0.00328	-0.16
Dentro de poblaciones	927.969	1.95362	97.91
Total	941.438	1.99535	
Índices de Fijación	$F_{ST}^a = 0.02091$	$P = 0.00079^*$	
	$F_{SC}^b = -0.00168$	$P = 0.85416$	
	$F_{CT}^c = 0.02256$	$P = 0.20069$	

^a; Índice de fijación de las subpoblaciones en relación a la población total, ^b; Índice de fijación de las subpoblaciones en relación a las agrupaciones regionales, ^c; Índice de fijación de las agrupaciones regionales en relación a la población total. *Pruebas de significancia después de 10,100 permutaciones.

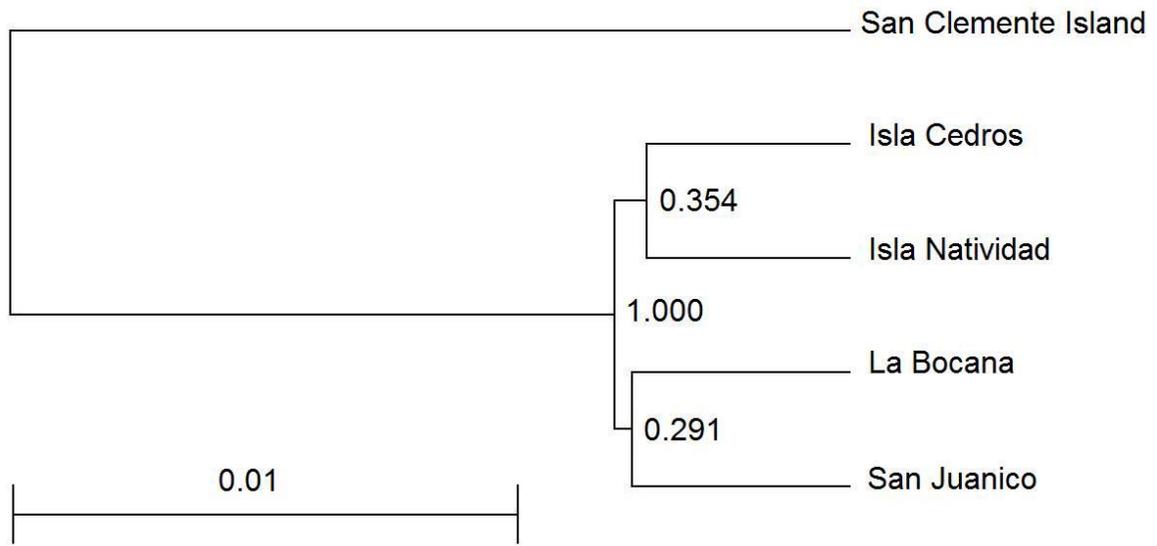


Figura 16. Dendrograma UPGMA de las relaciones entre muestras basado en las distancias de Reynolds. Los valores de las ramas se sustentaron en 5,000 réplicas bootstrap.

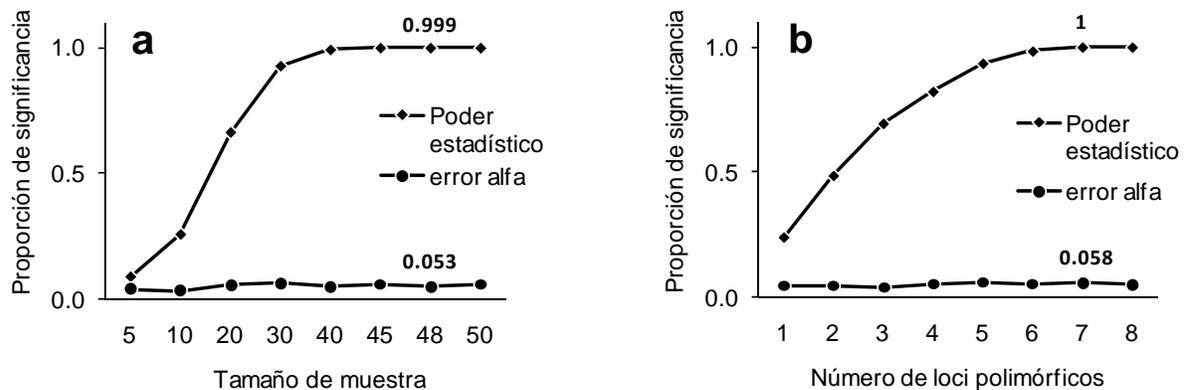


Figura 17. Estimados de poder estadístico bajo condiciones simuladas con el programa POWSIM y evaluado por pruebas exactas de Fisher para: (a) Tamaño de muestra y (b) Número de loci polimórficos.

5.3.2.4. Aislamiento por distancia y flujo genético

Se encontró correlación significativa entre distancias genéticas y geográficas en el análisis de aislamiento por distancia ($r = 0.929$, $P < 0.05$). Sin embargo cuando se excluyó a San Clemente Island, el modelo de aislamiento por distancia no fue soportado por las localidades mexicanas ($r = 0.410$, $P > 0.05$).

La conectividad entre San Clemente Island y cada una de las localidades mexicanas fue limitada, el número de migrantes (Nm) varió entre 1 y 7, mientras que el número de migrantes entre localidades mexicanas fue muy elevado ($Nm = \sim 1 \times 10^6$). El estimado de flujo genético obtenido por medio de frecuencias de alelos exclusivos entre San Clemente Island y las poblaciones mexicanas fue igualmente bajo ($Nm = 19$).

5.4. CONECTIVIDAD ENTRE DOS LOCALIDADES

5.4.1. Definición de grupos de edad

La asignación de grupos de edad para juveniles de El Riíto y La Bocana se puede apreciar en la Tabla XII. Como se puede observar la localidad de El Riíto estuvo conformada en su mayoría por juveniles del grupo de edad I ($n = 35$), mientras que La Bocana estuvo conformada en su mayoría por juveniles del grupo de edad II ($n = 37$) y III ($n = 19$). Con base en la representatividad de los tamaños de muestra (n), se decidió incluir solo a los juveniles del grupo I de El Riíto y juveniles del grupo II de La Bocana, en el análisis genético.

Tabla XII. Composición de grupos de edad por tallas en juveniles de *H. corrugata* de El Riíto y La Bocana.

Grupo de edad	Intervalo de Tallas (cm)	Frecuencia	
		El Riíto	La Bocana
0+	0.25–1.4	1	
I	1.5–3.3	35	2
II	3.4–5.8	6	37
III	5.9–8.2	9	19
IV	8.3+		5
Total		51	63

5.4.2. Análisis genético

5.4.2.1. El Riíto

De un total de 46 adultos (30 con marca y 16 sin marca) se obtuvieron 40 extractos de ADN (28 adultos con marca y 12 sin marca), mientras que de 60 juveniles se obtuvieron 57 extractos de ADN. De los 40 extractos de ADN de adultos solo 26 (23 de adultos con marcas y 3 de adultos sin marca) amplificaron exitosamente en los ocho loci analizados. En el caso de juveniles solo 38 de 57 extractos de ADN amplificaron en todos los loci (Tabla XIII).

5.4.2.2. La Bocana

De un total de 63 juveniles se obtuvieron 58 extractos de ADN, debido a que no se obtuvo ADN de cinco muestras de hemolinfa. En total se obtuvieron 48 extractos de ADN de adultos y 58 de juveniles. De los 48 extractos de ADN de adultos 44 amplificaron en los ocho loci y de los 58 extractos de ADN de juveniles 51 amplificaron en todos los loci (Tabla XIII).

Tabla XIII. Tamaño de muestra (n) de adultos y juveniles de *H. corrugata*, número de individuos de los cuales se extrajo ADN y número de individuos en los que se amplificaron los ocho loci vía PCR.

	Localidad					
	El Riíto			La Bocana		
	AT	ACM	ASM	Juveniles	Adultos	Juveniles
(n)	46	30	16	60	48	63
ADN extraído	40	28	12	57	48	58
ADN amplificado	26	23	3	38	44	51

AT; Adultos totales, AC; Adultos con marca, ASM; Adultos sin marca.

Frecuencias alélicas

En el análisis de adultos y juveniles totales de la localidad de El Riíto se pudo apreciar que las frecuencias alélicas en la mayoría de los loci fueron muy parecidas, incluso cuando se compararon las frecuencias alélicas de adultos a las de juveniles del grupo de edad I, no se apreciaron diferencias marcadas, excepto en *Hka3* (Fig. 18a,b,c).

De igual forma que en El Riíto, las frecuencias alélicas entre adultos y juveniles de La Bocana no difirieron mucho, siendo en algunos loci (*Hco19*, *Hco97* y *Hka56*) muy parecidas las frecuencias de adultos y juveniles totales o juveniles del grupo de edad II (Fig. 19a,b,c). Las mayores diferencias en frecuencias alélicas entre adultos y juveniles de La Bocana se observaron nuevamente en el locus *Hka3*. Este locus presentó un elevado polimorfismo en ambas localidades, su elevado polimorfismo no obstante de proporcionarnos una mayor resolución en la identidad de cada muestra, pudo verse sesgado por los tamaños de muestra de adultos y juveniles en ambas localidades.

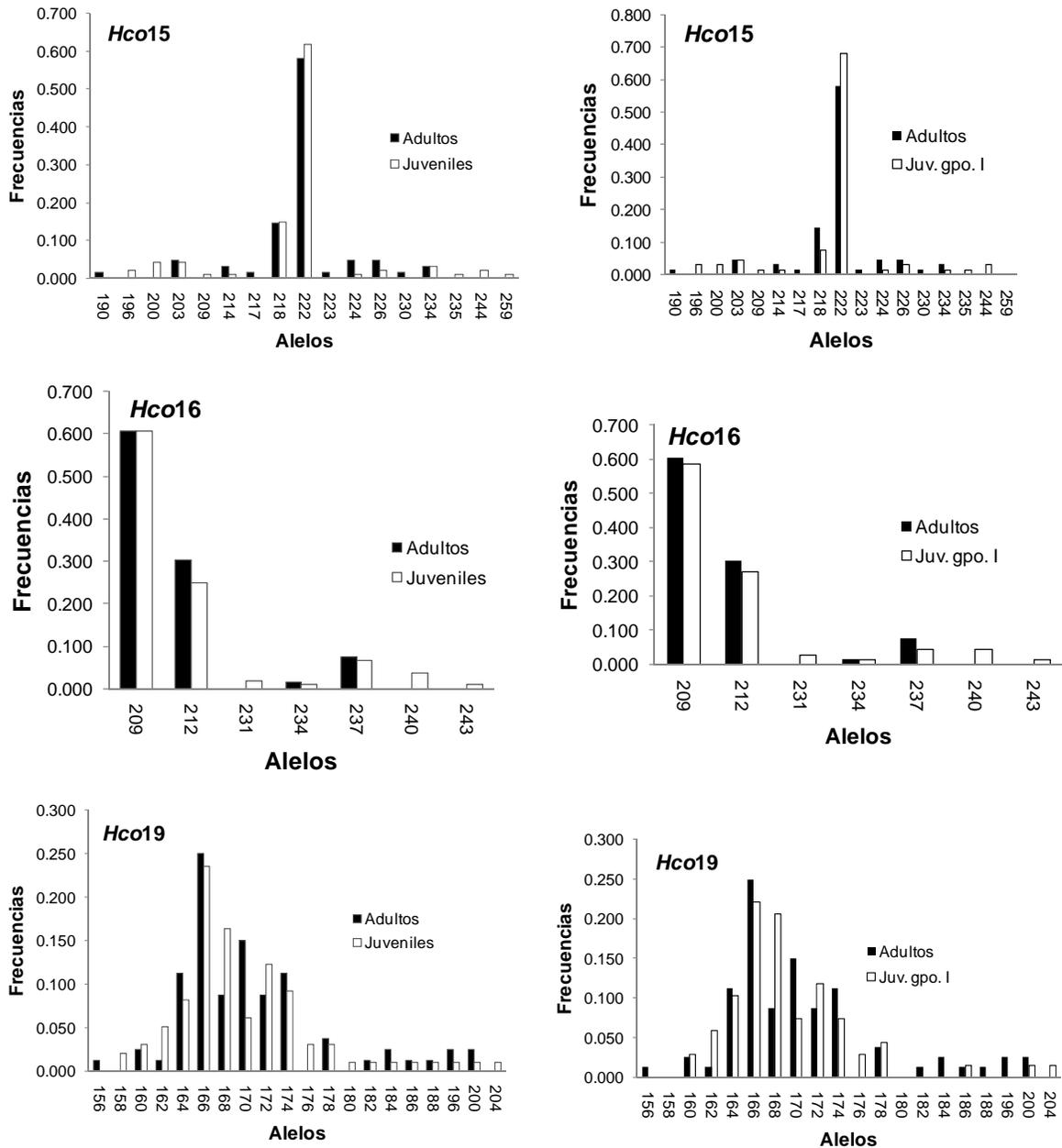


Figura 18a. Frecuencias alélicas en adultos y juveniles de El Riño (loci *Hco15*, *Hco16* y *Hco19*). Del lado izquierdo se encuentran las frecuencias de adultos y juveniles totales y del lado derecho las frecuencias de adultos y juveniles del grupo de edad I.

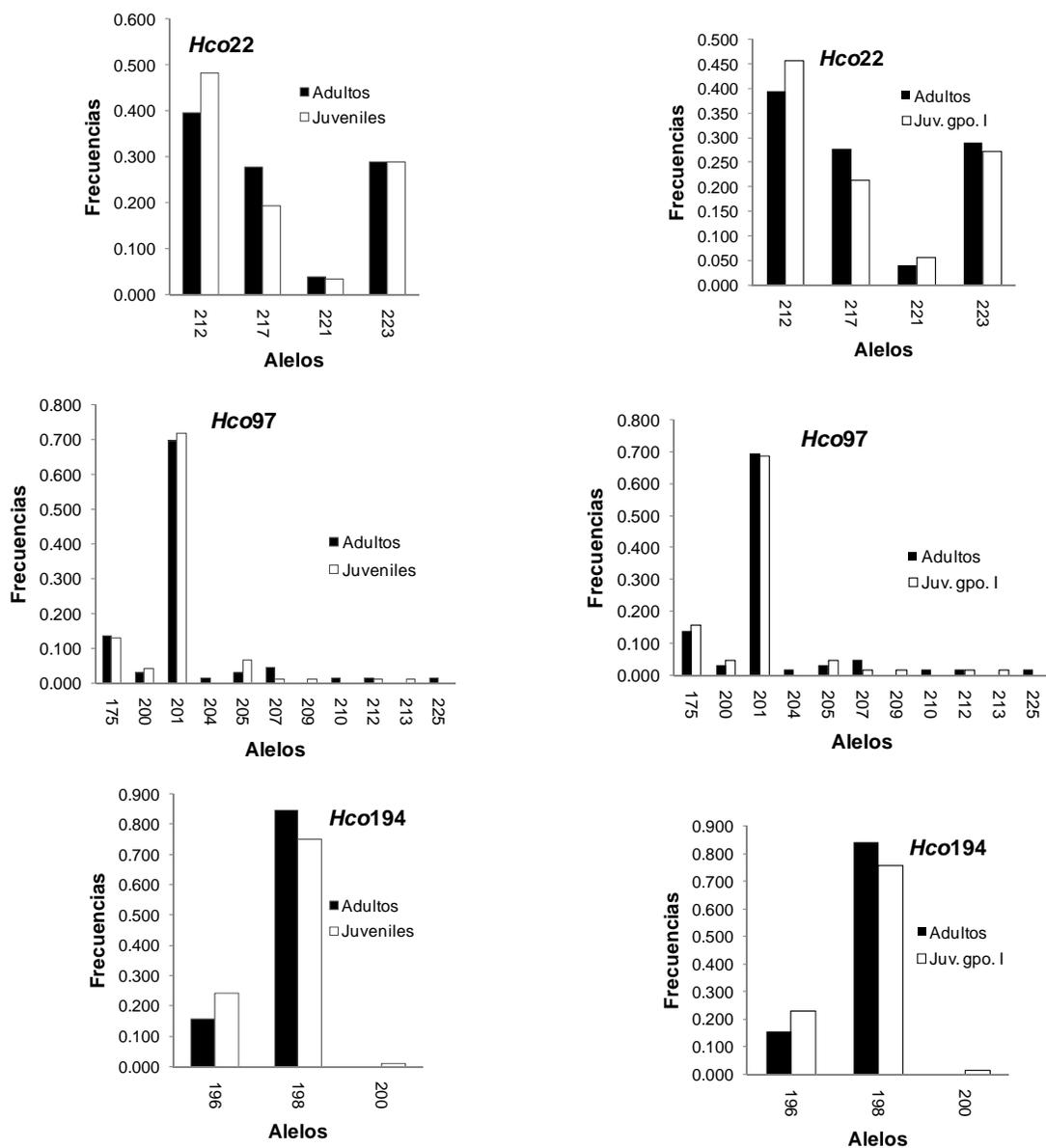


Figura 18b. Frecuencias alélicas en adultos y juveniles de El Riño (loci *Hco22*, *Hco97* y *Hco194*). Del lado izquierdo se encuentran las frecuencias de adultos y juveniles totales y del lado derecho las frecuencias de adultos y juveniles del grupo de edad I.

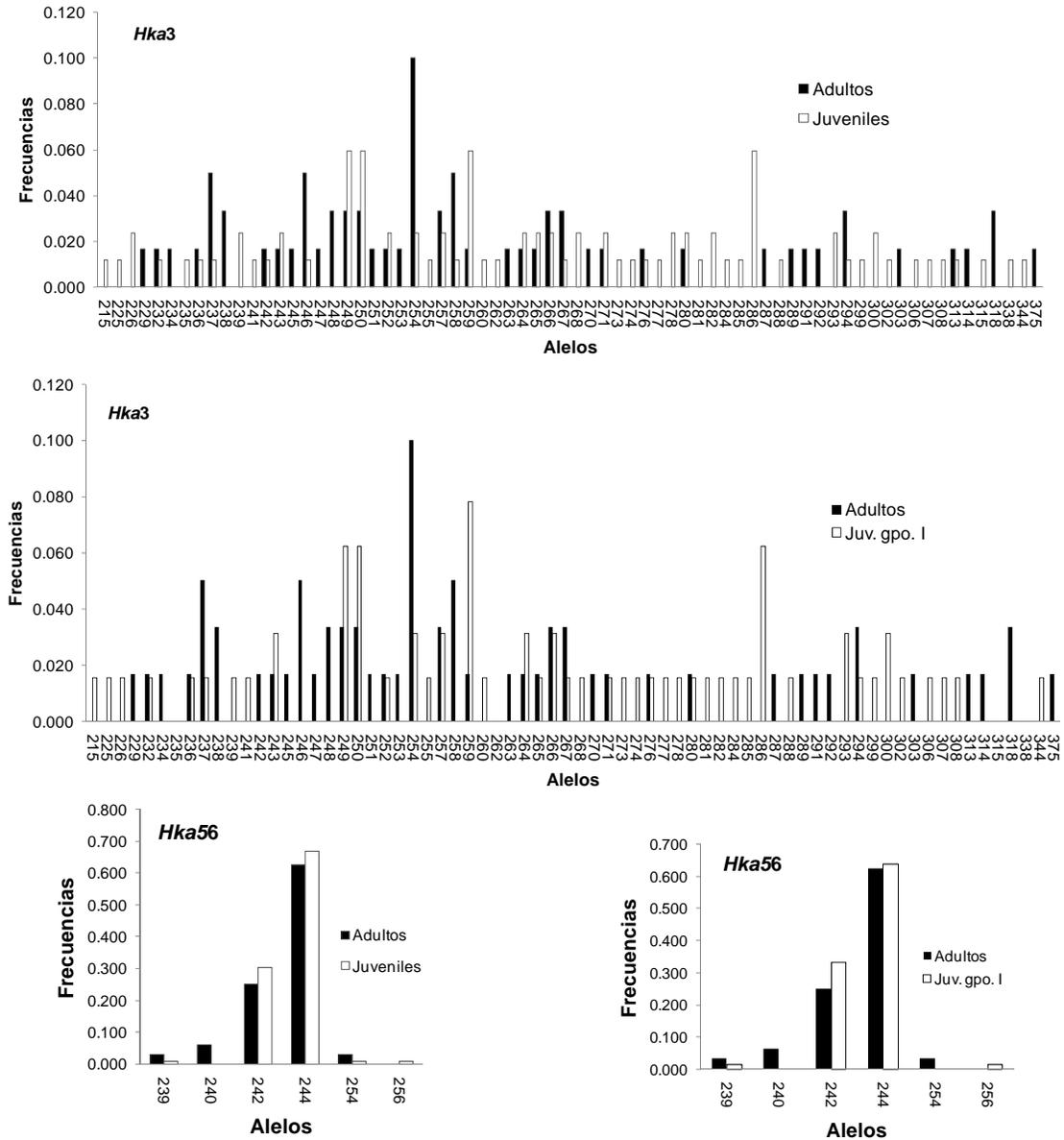


Figura 18c. Frecuencias alélicas en adultos y juveniles de El Riíto. En la parte superior (*Hka3*) o lado izquierdo (*Hka56*) se encuentran las frecuencias de adultos y juveniles totales y en la parte inferior (*Hka3*) o lado derecho (*Hka56*) se encuentran las frecuencias de adultos y juveniles del grupo de edad I.

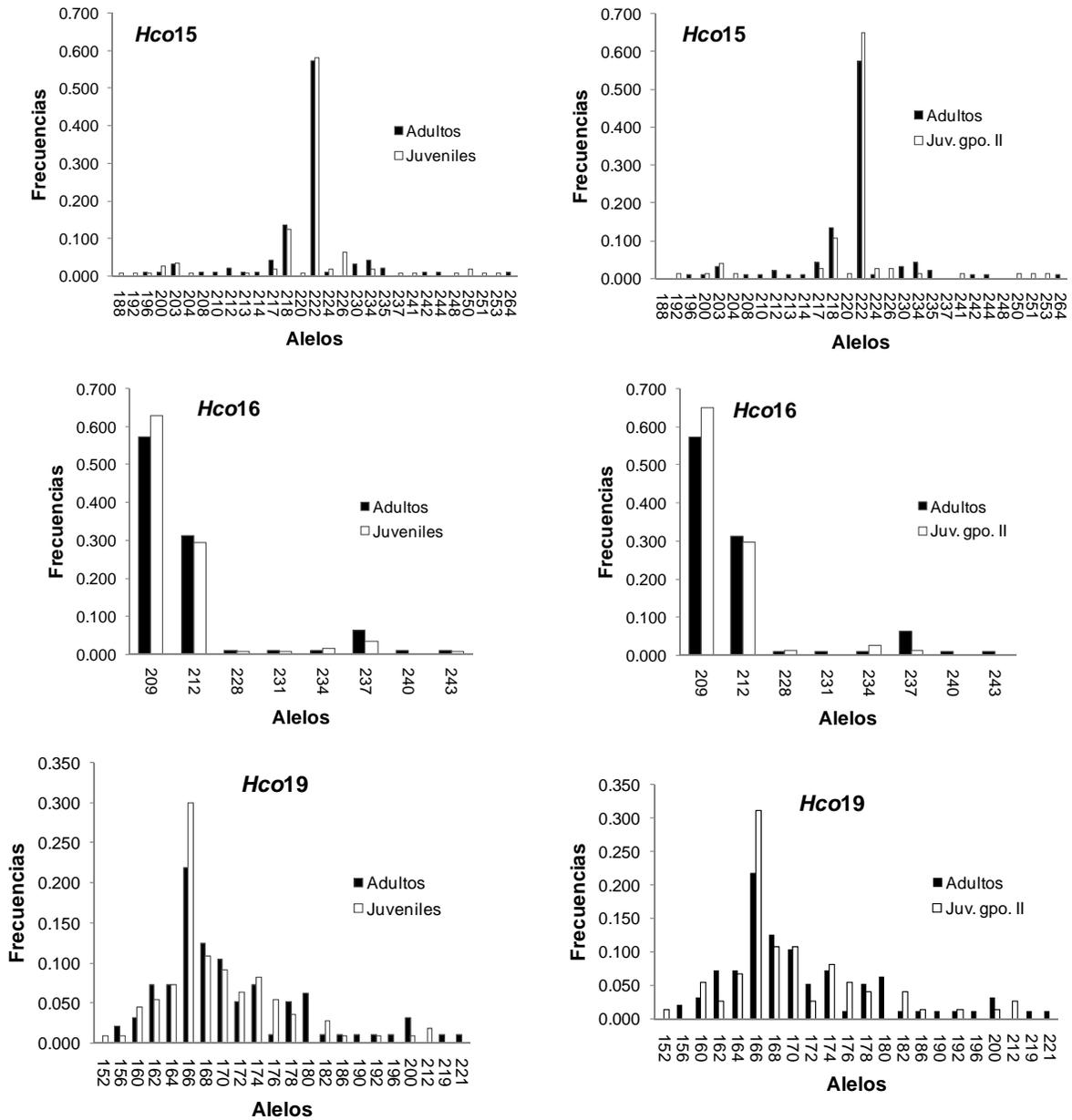


Figura 19a. Frecuencias alélicas en adultos y juveniles de La Bocana (loci *Hco15*, *Hco16* y *Hco19*). Del lado izquierdo se encuentran las frecuencias de adultos y juveniles totales y del lado derecho las frecuencias de adultos y juveniles del grupo de edad II.

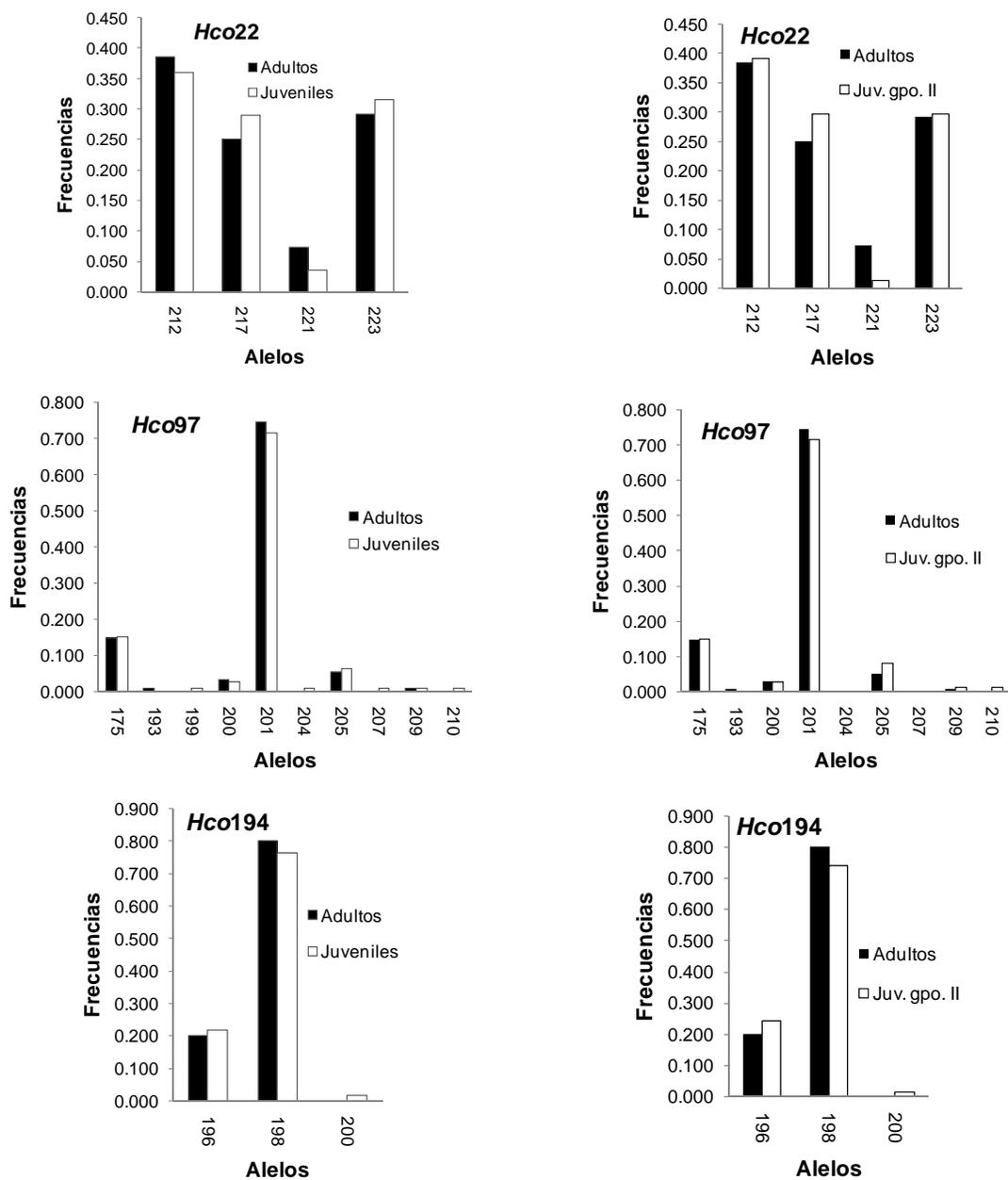


Figura 19b. Frecuencias alélicas en adultos y juveniles de La Bocana (loci *Hco22*, *Hco97* y *Hco194*). Del lado izquierdo se encuentran las frecuencias de adultos y juveniles totales y del lado derecho las frecuencias de adultos y juveniles del grupo de edad II.

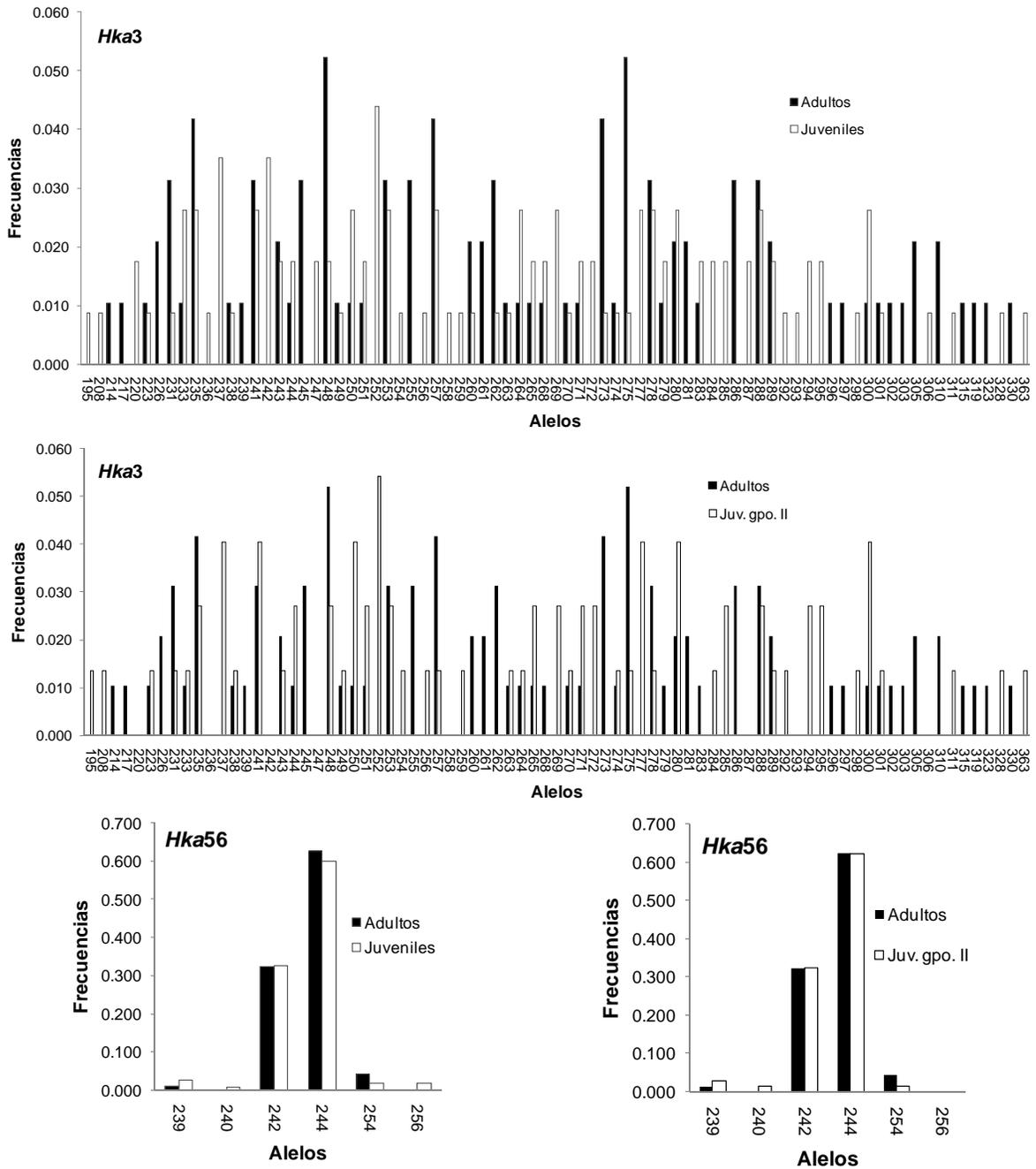


Figura 19c. Frecuencias alélicas en adultos y juveniles de La Bocana. En la parte superior (*Hka3*) o lado izquierdo (*Hka56*) se encuentran las frecuencias de adultos y juveniles totales y en la parte inferior (*Hka3*) o lado derecho (*Hka56*) se encuentran las frecuencias de adultos y juveniles del grupo de edad II.

Diversidad genética

En ambas localidades, en 5 de 8 loci, se apreció un mayor número de alelos por locus (N_A) en las muestras de juveniles totales en comparación a los adultos de la misma localidad: El Riíto (*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco194* y *Hka3*) y La Bocana (*Hco15*, *Hco97*, *Hco194*, *Hka3* y *Hka56*). Después de considerar únicamente las muestras de juveniles del grupo I y II en El Riíto y La Bocana (respectivamente), éste comportamiento en N_A fue menos marcado, 4 de 8 loci en El Riíto (*Hco15*, *Hco16*, *Hco194* y *Hka3*) y 2 de 8 en La Bocana (*Hco194* y *Hka56*) (Tabla XIV). Tales diferencias genéticas en N_A no fueron significativas entre adultos y juveniles del grupo I de El Riíto ($P = 0.104$), ni entre adultos y juveniles del grupo II de La Bocana ($P = 0.593$). En términos de H_O , cuando se compararon adultos y juveniles totales se observó un mayor número de heterocigotos en juveniles totales que en adultos en 4 de 8 loci de El Riíto (*Hco15*, *Hco16*, *Hco22* y *Hco194*) y La Bocana (*Hco22*, *Hco97*, *Hco194* y *Hka56*). Cuando se consideraron solo los juveniles de los grupos I y II de El Riíto y La Bocana (respectivamente), El Riíto mostró un mayor número de heterocigotos en juveniles del grupo I, en tres loci (*Hco16*, *Hco22* y *Hco194*) y La Bocana siguió mostrando un mayor número de heterocigotos en los mismos loci (*Hco22*, *Hco97*, *Hco194* y *Hka56*) (Tabla XIV). Sin embargo, tales diferencias en H_O no fueron significativas entre adultos y juveniles del grupo I de El Riíto ($P = 0.792$), ni entre adultos y juveniles del grupo II de La Bocana ($P = 0.809$).

Después del ajuste secuencial de Bonferroni, todos los loci de ambas localidades se encontraron en EHW ($P > 0.006$) (Tabla XIV). Después de analizar estos loci con MICRO-CHECKER, se confirmó la existencia de alelos nulos en *Hco19* y *Hco97*. Las frecuencias

de alelos nulos en *Hco19* fueron de 0.086 en la muestra de juveniles del grupo I de El Riíto y 0.056 en la muestra de adultos de La Bocana. En *Hco97* la frecuencia de alelos nulos fue de 0.071 en la muestra de adultos de La Bocana. En el locus *Hka3* también se detectaron alelos nulos con una frecuencia de 0.031 en la muestra de juveniles del grupo I de El Riíto, sin embargo MICRO-CHECKER no consideró esta frecuencia como evidencia significativa de alelos nulos y por lo mismo no computó sus frecuencias ajustadas.

Después del ajuste secuencial de Bonferroni se observó desequilibrio de ligamiento en 18 de 28 pares de loci de la muestra de adultos de El Riíto ($P < 0.007$) y en 4 de 28 pares de loci de la muestra de juveniles del grupo I de El Riíto ($P < 0.006$). Sin embargo no se apreció desequilibrio de ligamiento en la muestra de adultos de La Bocana ($P < 0.009$), ni en la muestra de juveniles del grupo II de La Bocana ($P < 0.142$) (Tabla XV).

Tabla XIV. Estimadores de diversidad genética en adultos y juveniles de El Riíto y La Bocana. (n), Tamaño de muestra; N_A , Número de alelos; H_E , Heterocigosidad esperada; H_O , Heterocigosidad observada.

Locus	El Riíto			La Bocana		
	Adultos	Juveniles	Juv. gpo. I	Adultos	Juveniles	Juv. gpo. II
<i>Hco15</i>						
(n)	31	47	33	48	56	37
N_A	11	13	12	18	20	15
H_E	0.642	0.597	0.531	0.653	0.645	0.570
H_O	0.548	0.596	0.546	0.667	0.607	0.622
P	0.129	0.741	0.468	0.859	0.287	0.867
<i>Hco16</i>						
(n)	33	52	35	48	58	37
N_A	4	7	7	8	7	5
H_E	0.543	0.570	0.587	0.576	0.521	0.497
H_O	0.606	0.654	0.657	0.583	0.569	0.568
P	0.888	0.775	0.818	0.179	0.493	0.473
<i>Hco19</i>						
(n)	40	49	34	48	55	37
N_A	16	19	13	20	17	16
H_E	0.881	0.887	0.879	0.907	0.871	0.869
H_O	0.925	0.735	0.706	0.792	0.727	0.757
P	0.329	0.007	0.007	0.044	0.039	0.339
<i>Hco22</i>						
(n)	38	57	35	48	57	37
N_A	4	4	4	4	4	4
H_E	0.692	0.651	0.678	0.706	0.692	0.679
H_O	0.632	0.667	0.714	0.771	0.807	0.811
P	0.542	0.934	0.944	0.858	0.015	0.043
<i>Hco97</i>						
(n)	33	46	32	47	56	37
N_A	9	8	8	6	9	6
H_E	0.498	0.467	0.506	0.424	0.466	0.464
H_O	0.424	0.413	0.406	0.319	0.429	0.405
P	0.177	0.051	0.019	0.017	0.148	0.096
<i>Hco194</i>						
(n)	29	52	35	45	55	35
N_A	2	3	3	2	3	3
H_E	0.267	0.383	0.380	0.324	0.372	0.395
H_O	0.241	0.327	0.343	0.356	0.400	0.457
P	0.521	0.139	0.248	0.663	1.000	0.732
<i>Hka3</i>						
(n)	30	42	32	48	57	37
N_A	40	52	44	52	60	46
H_E	0.981	0.984	0.983	0.984	0.988	0.986
H_O	0.933	0.929	0.906	0.958	0.930	0.946
P	0.212	0.040	0.146	0.329	0.181	0.124
<i>Hka56</i>						
(n)	32	48	33	48	55	37
N_A	5	5	4	4	6	5
H_E	0.550	0.469	0.491	0.509	0.536	0.514
H_O	0.594	0.354	0.394	0.458	0.564	0.541
P	0.766	0.119	0.259	0.401	0.339	0.365

Tabla XV. Desequilibrio de ligamiento en 8 de 28 pares de loci, para las muestras de adultos y juveniles de *H. corrugata* de El Riíto y La Bocana, gpos. I, II, respectivamente.

Pares de loci	El Riíto		La Bocana	
	Adultos	Juv. gpo. I	Adultos	Juv. gpo II
<i>Hco15-Hco16</i>	*	—	—	—
<i>Hco15-Hco19</i>	—	**	—	—
<i>Hco15-Hco194</i>	*	—	—	—
<i>Hco15-Hco97</i>	*	**	—	—
<i>Hco15-Hka3</i>	*	—	—	—
<i>Hco15-Hka56</i>	*	—	—	—
<i>Hco16-Hco194</i>	*	—	—	—
<i>Hco16-Hco22</i>	*	—	—	—
<i>Hco16-Hco97</i>	*	—	—	—
<i>Hco16-Hka3</i>	*	—	—	—
<i>Hco16-Hka56</i>	*	—	—	—
<i>Hco19-Hka3</i>	—	**	—	—
<i>Hco22-Hco97</i>	*	—	—	—
<i>Hco22-Hco194</i>	*	—	—	—
<i>Hco22-Hka56</i>	*	—	—	—
<i>Hco97-Hco194</i>	*	—	—	—
<i>Hco97-Hka3</i>	*	**	—	—
<i>Hco97-Hka56</i>	*	—	—	—
<i>Hco194-Hka56</i>	*	—	—	—
<i>Hco194-Hka3</i>	*	—	—	—

Juv. gpo.; Juveniles del grupo de edad I ó II., *; ($P < 0.007$), **; ($P < 0.006$), —; no significativo.

5.4.3. Diferenciación genética entre adultos y juveniles de la misma localidad

Previo a los análisis de diferenciación genética se ajustaron las frecuencias alélicas de *Hco19* y *Hco97* considerando la presencia de alelos nulos en las muestras de juveniles del grupo I de El Riíto (*Hco19*) y adultos de La Bocana (*Hco19* y *Hco97*).

Los análisis de AMOVA global mostraron que no había diferencias entre adultos y juveniles totales, ni entre adultos y juveniles del grupo I de El Riíto ó adultos y juveniles del grupo II de La Bocana (Tabla XVI).

Tabla XVI. Estimados de F_{ST} y valores de P (50,175 permutaciones) de AMOVAs globales entre adultos y juveniles de El Riíto y La Bocana con ocho y siete loci (excluyendo *Hka3*).

	El Riíto		La Bocana	
	Adultos		Adultos	
	F_{ST}	P	F_{ST}	P
8 loci				
Juveniles totales	-0.002	1	-0.004	1
Juveniles (gpo. I)	-0.003	1		
Juveniles (gpo. II)			-0.003	1
7 loci (sin <i>Hka3</i>)				
Juveniles totales	-0.003	0.999	-0.005	1
Juveniles (gpo. I)	-0.004	1		
Juveniles (gpo. II)			-0.003	1

5.4.4. Diferenciación genética entre localidades

Los análisis de F_{ST} pareados con ocho y siete loci, entre las muestras de ambas localidades mostraron lo siguiente: (1) no existen diferencias genéticas dentro de cada localidad, en refuerzo al análisis anterior, (2) no existen diferencias entre muestras de adultos de El Riíto y La Bocana y (3) no existen diferencias entre juveniles del grupo I de El Riíto y juveniles grupos II de La Bocana (Tabla XVII).

Tabla XVII. Estimados de F_{ST} pareados, arriba de la diagonal, y valores de P respectivos (10,100 permutaciones) debajo de la diagonal, entre adultos y juveniles de El Riíto y La Bocana con ocho (parte superior) y siete loci (parte inferior).

	ER Adultos	ERJ gpo I	LB Adultos	LBJ gpo II
8 loci				
ER Adultos		-0.017	-0.032	-0.030
ERJ gpo I	0.985		-0.007	-0.006
LB Adultos	1	0.997		-0.003
LBJ gpo II	1	0.972	0.830	
7 loci (sin <i>Hka3</i>)				
ER Adultos		-0.017	-0.029	-0.025
ERJ gpo I	0.987		-0.009	-0.007
LB Adultos	1	0.999		-0.004
LBJ gpo II	0.999	0.949	0.886	

ER, El Riíto; LB, La Bocana; J gpo I, II, juveniles de grupos de edad I y II.

Por último el AMOVA jerárquico con ocho loci mostró que la variación encontrada entre grupos fue mucho menor a la encontrada entre poblaciones dentro de grupos, lo que significa que existe una mayor variación hacia el interior de las localidades que entre ellas, no existiendo diferencias en frecuencias alélicas entre El Riíto y La Bocana. Al excluir el locus *Hka3* del AMOVA jerárquico, la variación genética tuvo el mismo comportamiento (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Índices de fijación de AMOVA jerárquicos con ocho y siete loci, y pruebas de significancia P (50,175 permutaciones).

Índices de fijación	8 loci		7 loci (sin <i>Hka3</i>)	
		P		P
$F_{ST} =$	-0.0036	0.9779	-0.0058	0.9964
$F_{SC} =$	-0.0028	0.9053	-0.0041	0.9402
$F_{CT} =$	-0.0008	0.7530	-0.0017	0.9160

F_{ST} ; variación entre poblaciones dentro de la población, F_{SC} ; variación entre poblaciones dentro de grupos, F_{CT} ; variación entre grupos.

5.4.5. Análisis de parentesco en El Riíto

En un análisis exploratorio de la diversidad genética, contenido de información polimórfica (PIC) y frecuencias de alelos nulos se apreciaron cinco loci candidatos (*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22* y *Hka56*) para el análisis de parentesco. Estos fueron seleccionados por que presentaron frecuencias de alelos nulos menores a 0.05 y por que presentaron equilibrio de Hardy-Weinberg (EWH). Los loci *Hco97* y *Hco194*, fueron descartados por que presentaron frecuencias de alelos nulos de 0.083 y 0.079, respectivamente. El locus *Hka3* a pesar de presentar el más elevado PIC (0.977), también fue descartado por que no se pudo determinar si presentaba EHW y por que sus lecturas de genotipos daban margen a

errores por un efecto conjunto de elevado polimorfismo y una corrida electroforética no homogénea (Tabla XIX).

El comportamiento general de las probabilidades de exclusión de falsos padres mostró un incremento conforme se incluían loci al análisis de parentesco, llegando a una probabilidad cercana a uno ($P = 0.996$), después de incluir los cinco loci (Fig. 20).

Tabla XIX. Caracterización genética de los loci candidatos para el análisis de parentesco. Tamaño de muestra (n), número de alelos (N_A), contenido de información polimórfica (PIC), Heterocigosidades observadas (H_O) y esperadas (H_E), frecuencias de alelos nulos (f nulos) y pruebas de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Locus	n	N_A	PIC	H_O	H_E	f nulos	EHW
<i>Hco15</i>	78	17	0.588	0.577	0.613	0.015	NS
<i>Hco16</i>	85	7	0.495	0.635	0.557	-0.072	NS
<i>Hco19</i>	89	20	0.869	0.820	0.884	0.033	NS
<i>Hco22</i>	95	4	0.600	0.653	0.667	0.012	NS
<i>Hco97</i>	79	11	0.452	0.418	0.478	0.083*	NS
<i>Hco194</i>	81	3	0.287	0.296	0.343	0.079*	NS
<i>Hka3</i>	72	70	0.977	0.931	0.984	0.025	NR
<i>Hka56</i>	80	6	0.429	0.450	0.500	0.046	NS

*, frecuencias de alelos nulos mayores a 0.05, NS; no significativas, NR; no realizada

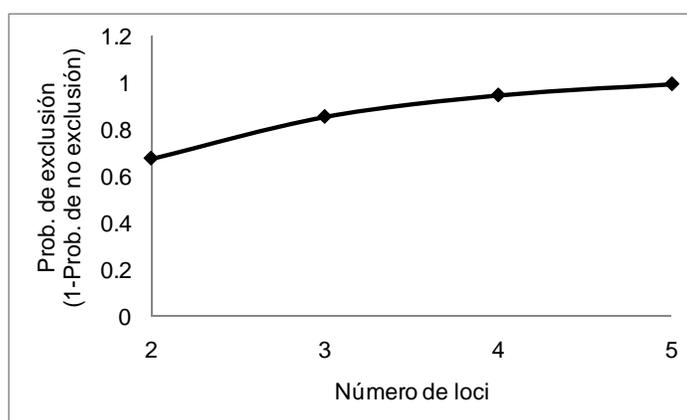


Figura 20. Probabilidades de exclusión de falsos padres en la asignación de juveniles a adultos de El Riíto.

Empleando cinco loci (*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22* y *Hka56*), en el análisis de parentesco, se obtuvieron 7 asignaciones con genotipos multilocus completos y valores de $LOD \geq 3$. Los siete juveniles (J27, J29, J30, J35, J40, J51 y J55) fueron asignados a 10 adultos con marcas (ACM3, ACM11, ACM28, ACM59, ACM61, ACM90, ACM95, ACM96, ACM101 y ACM120) y dos sin marca (ASM18 y ASM19) (Tabla XX, Fig. 21).

Tabla XX. Análisis de parentesco en El Riño con cinco loci, en donde los juveniles fueron asignados a una pareja de adultos con marca y/o sin marca como posibles padres.

Juveniles asignados	Padres potenciales	LOD	Probabilidades de no exclusión
J27	ACM101, ASM19	7.7	2.68×10^{-4}
J29	ACM11, ACM120	6.26	8.35×10^{-3}
J30	ACM90, ACM95	4.65	1.76×10^{-2}
J35	ACM3, ACM59	5.14	1.31×10^{-2}
J40	ACM11, ACM3	4.25	2.82×10^{-2}
J51	ACM28, ASM18	6.11	2.68×10^{-3}
J55	ACM61, ACM96	5.87	5.46×10^{-3}

J; juveniles, ACM; adultos con marca, ASM; adultos sin marca

Las probabilidades de no exclusión para cada par de padres por juvenil nos indicaron las probabilidades de que ninguno de los alelos en los cinco loci, provinieran de los padres seleccionados arbitrariamente. Por lo tanto estos valores fueron un fuerte indicador de que estos loci fueron efectivos en la asignación de parentesco. De esta forma los padres más exitosos en dejar descendencia serían ACM3 y ACM11 con dos juveniles cada uno (Tabla XX, Fig. 21).

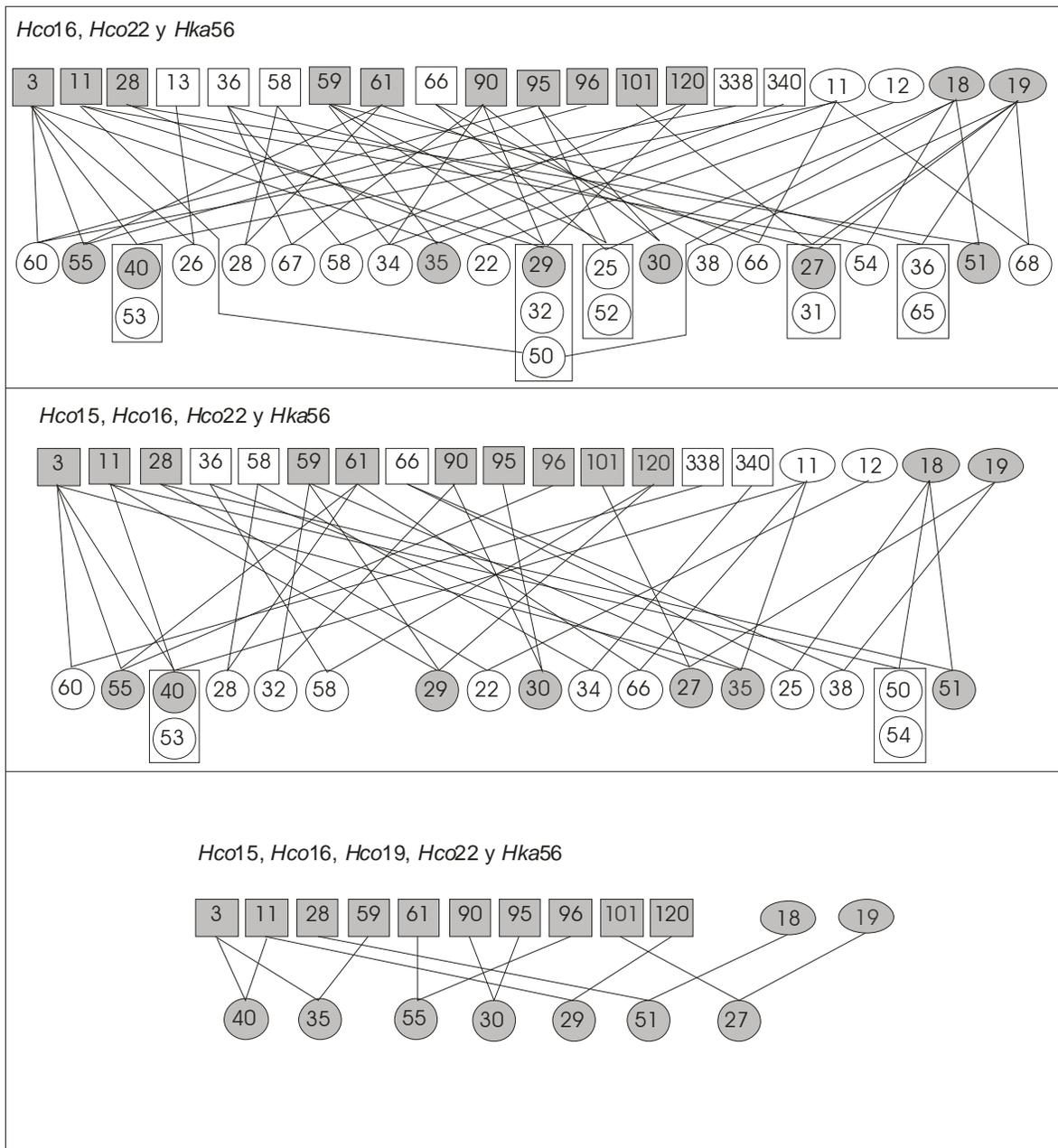


Figura 21. Parejas de padres obtenidas a través del análisis de parentesco con tres, cuatro y cinco loci. En cuadrados los adultos de *H. corrugata* trasplantados (marcados), en elipses los adultos residentes (no marcados) y en círculos los juveniles. Cada número denota el secuencial de la marca en el caso de los adultos trasplantados ó el sucesivo de colecta en el caso de adultos residentes y juveniles. En color gris las asignaciones que prevalecieron después del análisis de cinco loci.

Los resultados del análisis de parentesco en El Riíto, bajo la consideración de genotipos multilocus completos en cinco loci, nos indicaron un éxito en la asignación de padres a juveniles del 41.4% (12 de 29 adultos). Si se considerara el total de padres colectados, el éxito en la asignación sería del 26.1% (12 de 46 adultos). Pero si se tomara en cuenta el número de adultos trasplantados en el núcleo entonces este éxito se reduciría a un 4.5% (12 de 267 adultos), sin considerar la presencia de adultos que ya existían en El Riíto. En relación a los juveniles, solo el 16.3% (siete de 43 juveniles) fueron asignados a adultos provenientes de El Riíto. Entonces podríamos decir con base a los genotipos completos en cinco loci, que solo una baja proporción de juveniles provino del mismo banco.

6. DISCUSIÓN

6.1. OBTENCIÓN DE MICROSATÉLITES EN *H. corrugata*

De los ocho microsátélites empleados en la amplificación cruzada tres de *H. kamatschatkana* (50%) y ninguno de *H. fulgens* (0%) se pudieron optimizar en *H. corrugata*. En general estos porcentajes de éxito en la optimización son parecidos a los reportados (0–60%) en la amplificación cruzada de 21 microsátélites de *H. rubra* en 12 especies de abulón (Evans *et al.*, 2001). Las diferencias en la eficiencia de la amplificación cruzada de microsátélites de dos especies diferentes podría deberse a diferencias en el número de microsátélites empleados (6 de *H. kamatschatkana* y 2 de *H. fulgens*) o a diferencias en distancias filogenéticas entre las especies. Tocante al primer punto a pesar de que en el presente estudio se probaron solo dos microsátélites de *H. fulgens*, ya se había reportado previamente que de los ocho microsátélites obtenidos en dicha especie cinco (62.5%) amplificaban en *H. corrugata* (Cruz *et al.*, 2005). Sin embargo en el trabajo de Cruz y colaboradores no se demostró la utilidad (consistencia y polimorfismo), de los cinco microsátélites que amplificaron en *H. corrugata*. Al respecto, Evans *et al.* (2001), mencionan que no obstante la importancia de probar los marcadores moleculares en especies relacionadas, el determinar si se puede amplificar un producto de tamaño similar en otras especies no necesariamente sugiere que el marcador será útil para esta especie, sobre todo por que las amplificaciones cruzadas en estos estudios se hacen con tan solo 3–5 individuos. Respecto a la segunda explicación, el hecho de que el 50% de seis marcadores de *H. kamtschatkana* amplificaran de manera confiable en *H. corrugata* y se pudieran caracterizar, podría deberse a que estas dos especies dentro del grupo de haliotidos de

Norteamérica presentan una mayor cercanía en términos de identidad genética que entre *H. corrugata* y *H. fulgens*. El análisis de secuencias de aminoácidos de la lisina, demostró que existe un mayor porcentaje de identidad genética entre *H. corrugata* y *H. kamtschatkana* (72 y 74.5%), que entre *H. corrugata* y *H. fulgens* (65 y 67.5%) (Lee y Vacquier, 1992, 1995).

El aislamiento de microsatélites puede ser altamente demandante en términos de esfuerzo y tiempo, por que éste tradicionalmente consiste en el cribado de librerías genómicas (genotecas) con sondas apropiadas. Actualmente se ha reportado el empleo de métodos de enriquecimiento en protocolos de aislamiento mejorados. Estos protocolos han sido elaborados con el objetivo de reducir el tiempo invertido en el aislamiento de microsatélites y para aumentar la producción (Zane *et al.*, 2002). En el presente estudio se empleó un protocolo de aislamiento que implementa un método de enriquecimiento y el porcentaje de rendimiento en la obtención de microsatélites fue del 46% entre todas las genotecas. Tal porcentaje es parecido a los reportados con protocolos que emplearon un método de enriquecimiento por extensión de iniciadores (40–50%) (Ostrander *et al.*, 1992 en Zane *et al.*, 2002), hibridización selectiva (20–90%) (Karagyozov *et al.*, 1993; Hamilton *et al.*, 1999 en Zane *et al.*, 2002) y AFLP de secuencias con repeticiones (39–45%) (Zane *et al.*, 2002; Bester *et al.*, 2004; Ren *et al.*, 2008).

En especies de abulón (*Haliotis* spp.) se han observado diferentes grados de éxito en la detección de microsatélites a través de secuencias: 83.9% en *H. rufescens* (Kirby *et al.*, 1998), 100% en *H. discus discus* (Sekino y Hara, 2001), 31.4% en *H. kamtschatkana* (Miller *et al.*, 2001), 44.7% y 42.31% en *H. asinina* (Selvamani *et al.*, 2000; Tang *et al.*,

2004), 45% en *H. midae* (Bester *et al.*, 2004), 63.6% en *H. fulgens* (Cruz *et al.*, 2005), 48.5% en *H. rubra* (Baranski *et al.*, 2006), 82.9% y 9.6% en *H. discus hannai* (An y Han, 2006; Sun *et al.*, 2007) y 39.5% en *H. diversicolor* (Ren *et al.*, 2008). En el presente estudio al igual que en la mayoría de los reportes anteriores, se obtuvo un porcentaje similar (46%).

Las regiones (GT/AC) estuvieron mejor representadas entre todas las regiones microsatélites encontradas en *H. corrugata*. Las regiones (CT/AG) fueron las segundas más abundantes. La región microsatélite (TA/AT), a pesar de no haber sido seleccionada durante el enriquecimiento, también se encontró representada entre las regiones microsatélites. Estos resultados son congruentes con el trabajo reportado por Kirby *et al.* (1998) en donde las repeticiones GT/CA se encontraron mejor representadas. Además de una mayor abundancia de regiones GT/CA en especies de abulón, también podría explicarse a que varios trabajos han dirigido su esfuerzo en el cribado de genotecas, solo con sondas (CA)_n (Evans *et al.*, 2000; Selvamani *et al.*, 2000; Sekino y Hara, 2001) y otros con sondas (CA)_n y (CT)_n (Bester *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2005; An y Han, 2006; Ren *et al.*, 2008). Sin embargo en la mayoría de estos estudios (Bester *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2004; An y Han, 2006), las regiones con repeticiones TG/CA estuvieron mejor representadas, excepto en dos (Cruz *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2008), en donde las regiones CT/AG fueron mas abundantes. Respecto a las regiones con el motivo de repetición (TA/AT), solo en algunos trabajos se han presentado en más de un microsatélite (Evans *et al.*, 2000; Baranski *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007).

Solo un par de estudios han dirigido su esfuerzo a detectar regiones con varios motivos de repetición (Miller *et al.*, 2001; Baranski *et al.*, 2006) y aún en estos es notoria la

representatividad de regiones microsatélite con la repetición TG/CA, siendo muy marcada en el caso del estudio de Baranski *et al.* (2006).

Las regiones microsatélites encontradas en *H. corrugata*, estuvieron constituidas en su mayoría por dinucleótidos, (61), seguidas por tetranucleótidos (12) y en menor medida por trinucleótidos (9). Respecto a los regiones microsatélites constituidas por dinucleotidos estos son el tipo de microsatélite más común en el genoma del abulón (Kirby *et al.*, 1998; Baranski *et al.*, 2006), así como de otros grupos taxonómicos (Toth *et al.*, 2000 en Zane *et al.*, 2002). Referente a los microsatélites tri y tetranucleótidos, el presente estudio al igual que el de Baranski *et al.* (2006), reportó una mayor presencia de tetranucleótidos que de trinucleótidos. El número de estos microsatélites se asemeja al esperado en grupos taxonómicos como el de los primates y roedores, pero difiere de aquellos esperados en grupos como los artrópodos, fungi, etc., en donde se esperan mayor número de microsatélites trinucleótidos que tetranucleótidos (Toth *et al.*, 2000 en Zane *et al.*, 2002).

No obstante, el éxito de detección de microsatélites a nivel de secuencias, el número de secuencias disponibles para el diseño de iniciadores se redujo debido a la existencia de secuencias repetidas (clonas hermanas) y secuencias de mala calidad en donde debido a un gran número de repeticiones la secuencia se pierde. Además, según Zane *et al.* (2002), el número se reduce aún más por la carencia de secuencias adecuadas para el diseño de iniciadores y la ausencia de la repetición esperada. Zane y colaboradores (2002), consideraron que por estas razones el porcentaje de clonas descartadas podrían ser fácilmente del orden del 50%. En el presente estudio por estas razones se descartó el 73% de las secuencias, quedándonos con el 26.6% (34 secuencias) para el diseño de 40 pares de iniciadores. Esto último fue posible debido a que algunas secuencias presentaron más de

una región microsatélite y no necesariamente para el motivo de repetición esperado, como fue el caso del motivo TA/AT. De éstos 40 pares de iniciadores, 26 amplificaron el tamaño esperado y el resto mostraron patrones poco confiables ó difíciles de interpretar. De los 26 pares de iniciadores 10 revelaron microsatélites polimórficos y solo 7 de estos microsatélites presentaron equilibrio de Hardy-Weinberg en una muestra silvestre de *H. corrugata*. Si consideramos a las 128 clonas secuenciadas como el 100%, tan solo el 5.5% (7 secuencias) nos condujo a la determinación de microsatélites polimórficos confiables en *H. corrugata*. Tal porcentaje, aunque bajo, no varió mucho de lo reportado en otras especies de abulón; 3.8% en *H. rufescens* (Kirby *et al.*, 1998), 14.5 y 8.4% en *H. rubra* (Evans *et al.*, 2000; Baranski *et al.*, 2006), del 23.4 y 12.8% en *H. asinina* (Selvamani *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2004), del 12.8% en *H. discus discus* (Sekino y Hara, 2001), del 13.9% en *H. kamtschatkana* (Miller *et al.*, 2001), del 4.4% en *H. midae* (Bester *et al.*, 2004), del 18.2% en *H. fulgens* (Cruz *et al.*, 2005), del 4.8 y 1.17% en *H. discus hannai* (An y Han, 2006; Sun *et al.*, 2007) y del 12.8% en *H. diversicolor* (Ren *et al.*, 2008).

La diversidad genética encontrada en *H. corrugata*, a través de los 13 microsatélites en términos de número de alelos (N_A) y heterocigosidad observada (H_O), osciló de baja a alta (N_A : 2–57, H_O : 0.104–0.939). Tal diversidad genética en primera estancia pareciera poco común si se compara con el trabajo de Miller *et al.* (2001), en donde se reportó una diversidad genética de moderada a alta (N_A : 20–63, H_O : 0.41–0.89). Sin embargo fue muy parecida a la mayoría de los reportes de aislamiento de microsatélites, en otras especies de abulón: *H. rubra* (Evans *et al.*, 2000; Baranski *et al.*, 2006), *H. asinina* (Selvamani *et al.*, 2000; Tang *et al.*, 2004), *H. midae* (Bester *et al.*, 2004), *H. discus discus* (Sekino y Hara,

2001), *H. fulgens* (Cruz *et al.*, 2005), *H. discus hannai* (An y Han, 2006; Sun *et al.*, 2007) y *H. diversicolor* (Ren *et al.*, 2008).

6.2. DETERMINACIÓN DE HERENCIA MENDELIANA EN MICROSATÉLITES DE *H. corrugata*

El porcentaje de éxito de la amplificación de ADN de las larvas veliger, obtenido con la técnica propuesta por Selvamani *et al.* (2001), fue del 91–100%, un porcentaje parecido al obtenido (93–100%) por Li *et al.* (2003) empleando Chelex en larvas trocoforas de *H. discus hannai*.

En general la mayoría de los loci de microsatélites presentaron segregación mendeliana en todas las familias, a excepción del locus *Hco47-1* en las familias A y C y el locus *Hco19* en la familia B, lo cual significa que cada alelo en la mayoría de los loci podría ser heredado por cada padre sin barreras ligadas al sexo (Li *et al.*, 2003). En la mayoría de los loci cada cruce dio por descendencia todos los genotipos esperados por herencia Mendeliana, sugiriendo la ausencia de barreras a la fertilización de los gametos de cada padre (Li *et al.*, 2003). En el caso de los loci *Hco47-1* y *Hco19* la existencia de alelos nulos fue la explicación del desajuste de las proporciones esperadas por herencia Mendeliana. Los alelos nulos de regiones microsatélites pueden surgir a través de mutaciones puntuales en el sitio de acoplamiento del iniciador (Callen *et al.*, 1993 en Li *et al.*, 2003). La presencia de alelos nulos es el principal problema de los microsatélites para los estudios de genética poblacional en abulón (Li *et al.*, 2003). La importancia de confirmar la presencia de alelos nulos en los loci que se emplearon en el análisis de

poblaciones radica en que los alelos nulos complican la interpretación de las desviaciones del Equilibrio de Hardy–Weinberg, y pueden confundir ó distorsionar los análisis de estructura poblacional (Reece *et al.*, 2004, Gruenthal y Burton, 2008). Si están presentes los alelos nulos, pero no son considerados, el error resultante en la heterocigosidad crea un aparente exceso de homocigotos en estudios poblacionales (Li *et al.*, 2003).

Los microsatélites de *H. corrugata* pueden ser capaces de discriminar entre larvas emparentadas y no emparentadas, en una situación en donde la información de pedigrí no fuera disponible, tal como lo demuestra la detección de una larva de la familia C en el lote de la familia B. Generalmente la capacidad de asignar individuos a sus familias de origen depende del número de loci y diversidad alélica (Bernatchez y Duchesne, 2000). Sin embargo, si existe suficiente diversidad alélica, un número relativamente bajo de loci es requerido para alcanzar un elevado éxito en la asignación (Li *et al.*, 2003). Por ejemplo, Selvamani *et al.* (2001), asignaron exitosamente el parentesco de larvas de *H. asinina* usando únicamente tres ó menos microsatélites con polimorfismos de moderados a elevados.

En las familias A y C se observaron larvas con tres alelos en diferentes loci. Baranski *et al.* (2006), observaron la presencia de tres alelos en diversos individuos, sugiriendo la amplificación de múltiples locus por duplicación de locus ó asociación del microsatélite con elementos móviles. Sin embargo, otra posible explicación a la observación de tres alelos, sería la existencia de organismos triploides. Las larvas con tres alelos siempre presentaron dos alelos maternos y uno paterno, lo cual se apreció bien en aquellos loci en donde los padres fueron heterocigotos para alelos diferentes como en

Hco47-2 y *Hka3* (Familia A) y *Hco19* (Familia C). Esto solo sería posible si la triploidía fuera inducida después de meiosis I y los loci presentaran tasas de recombinación elevadas que permitieran la aparición de los dos alelos maternos. Para corroborar la presencia de larvas triploides en desoves de *H. corrugata* se sugiere el empleo de la citometría de flujo.

En general los loci *Hco15*, *Hco22*, *Hco47-2*, *Hco97*, *Hco194*, *Hka3* y *Hka56* demostraron ser útiles para el análisis de poblaciones silvestres de *H. corrugata*, debido a que presentaron herencia Mendeliana. A pesar de que en el locus *Hco16* no se pudo verificar si presentaba segregación Mendeliana (homocigotos con genotipos idénticos en las tres familias) se recomienda también su uso, debido a que se presentó en equilibrio de Hardy-Weinberg en una muestra silvestre (sección 5.1.3). El locus *Hco19*, a pesar de que mostró alelos nulos en una familia, podría emplearse para análisis poblacional siempre y cuando se observe en equilibrio de Hardy-Weinberg y se emplee un programa, para estimar las frecuencias de alelos nulos (MICRO-CHECKER, Oosterhout *et al.*, 2004), previo al análisis poblacional. El locus *Hco47-1* se descarta para el análisis de poblaciones silvestres debido a su alta incidencia de alelos nulos.

Los marcadores *Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco47-2*, *Hco97* y *Hka3*, debido a su polimorfismo de moderado a elevado, se recomiendan para la estimación directa de conectividad vía pruebas de asignación ó de parentesco (Hellberg, *et al.*, 2002; Hedgecock *et al.*, 2007), en la estimación de las distancias de dispersión larvaria promedio (Palumbi, 2003) y para rastrear la dispersión y supervivencia de organismos producidos en laboratorio y usados en esfuerzos de restauración (Selvamani *et al.*, 2001; Reece *et al.*, 2004).

6.3. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

Las diferencias encontradas en las tallas promedio de las localidades mexicanas indicaron un clinal de norte a sur, observándose los individuos más grandes en Isla Cedros y los más pequeños en San Juanico. Lindberg (1992), mencionó al respecto que la talla promedio de la concha muestra una fuerte relación con la temperatura y que se presenta tanto intra como interespecíficamente, en donde las especies más grandes se asocian a regiones templadas y las más pequeñas a regiones tropicales. Sin embargo cabe señalar que en la localidad de San Juanico existe un sesgo debido a que esta muestra no provino de capturas comerciales, al igual que las otras muestras mexicanas, sino de un muestreo no invasivo, esto se puede apreciar en el hecho de que la talla promedio es menor a la talla mínima permitida (135 mm) en esta especie.

Por otro lado, San Clemente Island no obstante de ser la localidad más al norte (aguas más frías), no se ajusta al gradiente observado en las localidades mexicanas. Esto se debe a la alta proporción de organismos más pequeños en la muestra, que pudieron ser producto de artificios del muestreo (metodología diferente, muestreo no azaroso, etc.), o a que otros factores tales como disponibilidad de hábitat, de alimento, depredación, etc., limitan la presencia de organismos de mayor talla. Existe un antecedente en *H. fulgens* en donde se menciona que esta especie en San Clemente Island crece a una tasa considerablemente por debajo de aquellas en el sur de las costas de California (Burge *et al.*, 1975 en Leighton, 2000), lo cual podría indicar que existe algún factor biótico ó abiótico que determina una menor tasa de crecimiento y menores tallas promedio de *H. corrugata* en esta localidad.

En el caso de Isla Cedros se pudo hacer una comparación de tallas entre sexos, no encontrándose diferencias en las medias de hembras y machos. Esto parece indicar que no existen diferencias en tallas por dimorfismo sexual.

La mayoría de los loci en todas las localidades estuvieron en concordancia con el modelo de EHW en el cual no hay otras fuerzas evolutivas trabajando más que aquellas impuestas por el proceso de reproducción mismo (Hartl y Clark, 1997). Esto implica apareamiento azaroso dentro de las poblaciones (panmixia), sin selección de algún genotipo en particular y que los alelos se segregan bajo herencia Mendeliana normal (Freeland, 2007). La desviación de $H_{co}19$ del EHW en Isla Natividad podría explicarse por muestreo azaroso, en donde la sobre representación de una clase de heterocigotos que es inesperada es posible por azar, si nosotros consideramos el elevado polimorfismo de este locus y que se encuentra en EHW en todas las demás localidades. Sin embargo como se vio en la sección 5.2.1.2, este locus presentó alelos nulos en la descendencia de una familia, así que probablemente exista un efecto combinado de azar en el muestreo y presencia de alelos nulos.

La diversidad genética en *H. corrugata*, basándonos en N_A , mostró una variación intraespecífica de baja a moderada (2–28), en comparación a la reportada en *H. kamtschatkana*, *H. rufescens*, y *H. cracherodii*. Sin embargo N_A fue similar a lo reportado en algunas especies de abulón como *H. midae*, *H. asinina*, *H. fulgens*, y *H. rubra* (Temby *et al.*, 2007). Los valores de H_O en *H. corrugata* oscilaron de bajos a altos (0.170–0.896) y fueron tan altos como aquellos reportados en *H. rubra*, *H. fulgens*, *H. rufescens*, y *H. cracherodii* (Tabla XXI).

Tabla XXI. Estimadores de diversidad genética; número de alelos (N_A) y heterocigosidad observada (H_O), obtenidos en poblaciones naturales de *Haliotis* spp., mediante el uso de microsatélites.

Especie	N_A	H_O	Referencia
<i>H. rubra</i>	3–44	0.220–0.847	Conod <i>et al.</i> , 2002
<i>H. kamtschatkana</i>	24–82	0.73–0.79	Withler <i>et al.</i> , 2003
<i>H. midae</i>	2–19	0.167–0.627	Evans <i>et al.</i> , 2004
<i>H. asinina</i>	3–26	0.58–0.78	Tang <i>et al.</i> , 2004
<i>H. fulgens</i>	2–36	0.38–1.00	Gutiérrez-Gonzalez <i>et al.</i> , 2007
<i>H. rufescens</i>	26–75	0.42–0.91	Gruenthal <i>et al.</i> , 2007
<i>H. rubra</i>	11–17	0.333–0.578	Temby <i>et al.</i> , 2007
<i>H. cracherodii</i>	33–51	0.21–0.88	Gruenthal y Burton, 2008
<i>H. corrugata</i>	2–28	0.170–0.896	Presente estudio

Los primeros indicios de diferenciación genética poblacional entre San Clemente Island y las localidades Mexicanas, así como homogeneidad genética entre las localidades Mexicanas, fueron los patrones de las frecuencias alélicas en la mayoría de los loci y la diferenciación genética significativa en N_A . El análisis de F_{ST} pareado y AMOVA jerárquico confirmaron tales observaciones.

Estudios previos en haliotidos han mencionado que la diferenciación poblacional podría deberse a: (1) factores biológicos, tales como los movimientos limitados de los adultos, un periodo de apareamiento relativamente corto y un periodo larvario planctónico corto (Prince *et al.*, 1987; Hamm y Burton, 2000; Temby *et al.*, 2007); (2) factores ambientales, tales como la carencia de hábitat disponible para el asentamiento larvario, características hidrográficas y barreras filogeográficas (Zúñiga *et al.*, 2000; Conod *et al.*, 2002; Gruenthal *et al.*, 2007); (3) la presencia de barreras geográficas ó físicas (Tang *et al.*, 2004; Chambers *et al.*, 2006); (4) la distancia geográfica (Guzmán-del Prío *et al.*, 2000; Gutiérrez-Gonzalez *et al.*, 2007); y (5) causas evolutivas ó demográficas (cuellos de botella

recientes y subsecuentes expansiones) (Withler *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2004; Gruenthal y Burton, 2008).

H. corrugata no mostró diferencias en las distancias geográficas más pequeñas (71 km). Si hubiese dispersión larvaria limitada (reclutamiento local), dirigida por su periodo reproductivo estacional, comportamiento larvario demersal para evitar la dispersión (Prince *et al.*, 1987), carencia de hábitats para el asentamiento ó características hidrográficas que promueven la retención larvaria, esto no puede ser sustentado por nuestros resultados. Además no hay evidencias de que las poblaciones de *H. corrugata* estén separadas por una barrera geográfica ó barreras filogeográficas a lo largo de su distribución. En este estudio, el principal factor para la diferenciación genética entre San Clemente Island y las localidades Mexicanas fue la distancia geográfica sobre una escala de 600 a 1000 km, sustentado por los resultados de aislamiento por distancia. Sin embargo, existen otros factores que en combinación con la distancia geográfica (sobre una escala amplia), podrían jugar un papel importante en la diferenciación poblacional, tales como la fuerza y los patrones de corriente (Roberts, 1997 en Hamm y Burton, 2000), una barrera oceanográfica y causas evolutivas ó demográficas. Sin embargo, no podemos desechar la posibilidad de que tales diferencias correspondan a artificios del muestreo (muestreo no azaroso ó cambios temporales), debido a que el muestreo de San Clemente Island fue realizado con tres años de anticipación al de las muestras mexicanas y la colecta no fue realizada siguiendo la misma metodología.

Los resultados obtenidos en *H. corrugata* con microsatélites entre localidades Mexicanas contrastaron con los previamente reportados con alozimas por Del Río-Portilla y González-Avilés (2001), quienes encontraron diferenciación poblacional significativa (F_{ST}

= 0.093) sobre una escala geográfica más pequeña (decenas de kilómetros) que el intervalo cubierto en el presente estudio (cientos de kilómetros). Sin embargo, nuestros resultados son similares a aquellos observados en *H. fulgens* sobre diferentes escalas geográficas: pequeña (decenas de kilómetros) (Zúñiga *et al.*, 2000) y media (cientos de kilómetros) (Gutiérrez-Gonzalez *et al.*, 2007). Ambos reportaron una población genéticamente homogénea de *H. fulgens* a lo largo de la costa central de la península de Baja California. La discrepancia con el trabajo de Del Río-Portilla y González-Avilés (2001) podría tener dos posibles explicaciones: (1) Las alozimas quizá están sujetas a selección natural y la selección puede incrementar la diferenciación de las alozimas entre poblaciones (Avice, 2004) o (2) la escala geográfica fue más pequeña que en el presente estudio. Mediante el uso de microsatélites Temby *et al.* (2007) encontraron en *H. rubra* que la diferenciación genética fue más grande a la escala de muestreo más pequeña (decenas de kilómetros) y lo atribuyeron a que la variación espacial y temporal en el reclutamiento conduce a un parcheo genético a una escala fina.

La diferenciación genética entre San Clemente Island y las localidades Mexicanas, así como la homogeneidad entre localidades Mexicanas, podrían explicarse no solo por el modelo de aislamiento por distancia, sino también por los patrones de flujos del Sistema de la Corriente de California. La corriente de California lleva agua hacia el Sur a lo largo de la costa Oeste de Norteamérica y la península de Baja California durante todo el año, con su flujo más fuerte en primavera y verano (Lynn y Simpson, 1987). En las latitudes sureñas la corriente se encuentra alejada de la línea de costa (Zaitsev *et al.*, 2007). Cerca de la costa existe un cambio estacional en la dirección del flujo de la corriente de California. En otoño e invierno, la dirección de este flujo superficial es a menudo hacia el polo, llamado la

contracorriente costera, la cual esta mejor organizada durante Enero y confinada primeramente a la plataforma continental. En la parte norte de la península esta contracorriente es confinada a una zona costera más estrecha y en algunas porciones más norteñas de la península no se presenta (Lynn y Simpson, 1987). En la parte sur de la península, la contracorriente fluye a lo largo de la línea de costa de agosto a noviembre (Zaitsev *et al.*, 2007).

El periodo de apareamiento del abulón amarillo inicia durante el verano, con su máxima intensidad en otoño e inicios de invierno (Ortíz-Quintanilla *et al.*, 1990). Las especies de abulón son dioicas, desovadores externos que liberan sus gametos directamente en el agua. Los huevos del abulón amarillo tienen flotabilidad negativa, la larva trocófora inmediatamente después de eclosionar (12 a 18 h), nada a la superficie (geotaxis negativa), completa su desarrollo larvario entre los 4–17 días y entonces inicia el asentamiento (Leighton, 1974; Leighton, 2000). Debido a que la distribución batimétrica del abulón amarillo se encuentra entre los 5 a 25 m (Leighton, 2000), la dispersión larvaria probablemente es influenciada por los giros de mesoescala y meandros cerca de la costa. La existencia de meandros y giros de mesoescala inducen al intercambio de masas de agua oceánicas y costeras (Zaitsev *et al.*, 2007). Así las larvas de abulón amarillo a lo largo de la costa central de Baja California podrían estar influenciadas en mayor magnitud por la contracorriente costera de agosto a noviembre por que su máxima intensidad reproductiva coincide con la presencia de esta corriente.

Además Lynn y Simpson (1987), reportaron la presencia de un giro en el sur de California dentro del Sistema de la Corriente de California. Si este giro se presenta año con año, este podría representar una barrera oceanográfica a la dispersión larvaria y al flujo

genético, preservando las diferencias genéticas entre San Clemente Island y las localidades Mexicanas. Adicionalmente, la falta de mezcla suficiente entre masas de agua podría preservar las diferencias genéticas entre regiones, como fue en el caso de *Balanus glandula* (Sotka *et al.*, 2004). La ausencia de mezcla entre las masas de agua del sur de California y la parte central de la península de Baja California, debido a los patrones de corrientes, podría contribuir a la diferenciación genética entre San Clemente Island y las localidades Mexicanas.

Los estimadores de flujo genético indicaron conectividad genética restringida entre San Clemente Island y las cuatro localidades Mexicanas y conectividad genética entre las cuatro localidades Mexicanas, esto último debido a la ausencia de barreras al flujo genético a lo largo de la costa central de Baja California. Ambos resultados representan el flujo genético sobre una escala de tiempo evolutivo de cientos de miles de años ó conectividad poblacional a largo plazo (Moberg y Burton, 2000; Palumbi, 2003). Esto a su vez se sustenta en el hecho de que el registro fosil sugiere que *H. corrugata* (o su ancestro) ya existía en la región desde hace 5 millones de años (Lindberg, 1992). Entre las localidades mexicanas tal conectividad genética llevada a cabo por el intercambio de larvas podría ser explicada por dos posibles mecanismos. Primero, un intercambio persistente de larvas entre poblaciones adyacentes en concordancia al modelo de salto en piedra (stepping-stone), donde la población A exitosamente exporta larvas a la población más cercana (B), y B exporta a A ó C poblaciones, pero no entre A y F. Entonces una variante genética podría saltar por flujo genético de la población A a la F quizá no en un número reducido de generaciones, por que su dispersión larvaria promedio podría ser sobre distancias cortas, pero sí quizá después de muchas generaciones. Algunos estudios en abulón han encontrado

dispersión larvaria sobre distancias cortas. Prince *et al.* (1987), encontraron en *H. rubra* una dispersión larvaria extremadamente restringida (0–50 m), Guzmán-del Prío *et al.* (2000), sugirieron en *H. fulgens* una dispersión larvaria restringida a distancias cortas (3–5 km), Palumbi (2003), sugirió distancias de dispersión promedio en ecosistemas marinos sobre el orden de 25–150 km y Temby *et al.* (2007) encontraron en *H. rubra* un reclutamiento primeramente local (< 200 m).

El segundo mecanismo considera eventos esporádicos de intercambio larvario sobre grandes distancias. Algunos estudios han sugerido la posibilidad de un reducido intercambio de larvas entre las localidades más distantes, promovido por el cambio de las condiciones hidrodinámicas dominantes (Guzmán-del Prío *et al.*, 2000, Zúñiga *et al.*, 2000). Este flujo genético a grandes distancias sobre una escala de tiempo evolutiva no permitiría diferenciación genética a lo largo de la población entera (Temby *et al.*, 2007). Es notable cuan poca migración es requerida para impedir divergencia genética significativa (Hartl y Clark, 1997). Si un migrante por generación se asienta y se recluta a las poblaciones reproductoras, esta pequeña cantidad de intercambio genético es suficiente para prevenir la acumulación de grandes diferencias genéticas (Slatkin, 1987 en Palumbi, 2003).

Si la homogeneidad genética entre las localidades Mexicanas es un resultado de flujo genético persistente a través de distancias cortas entre localidades ó eventos esporádicos de intercambio larvario exitoso sobre grandes distancias, nosotros no lo podemos distinguir con los presentes datos.

En relación a la pesquería, con base a la reciente disminución en abundancias reportada por Morales-Bojórquez *et al.* (2008), uno esperaría observar pérdida de variación

genética en poblaciones colapsadas. Sin embargo se observó lo contrario, una diversidad genética (N_A y H_O) de baja a alta en las localidades Mexicanas y mayor a la encontrada en San Clemente Island (N_A). Una explicación para tales observaciones podría ser que la migración larvaria representa una proporción mayor en el reclutamiento larvario total. Así la sobrepesca cambiaría la proporción de larvas locales y migrantes, resultando en una aparente diversidad genética alta en poblaciones en recuperación (Miller *et al.*, 2009). Esta posible explicación a su vez se sustenta en el número elevado de migrantes encontrados entre localidades Mexicanas. Los resultados genéticos en el presente estudio parecen indicar que la migración larvaria que se lleva a cabo entre las localidades mexicanas eventualmente resultaría en la recuperación natural de estas poblaciones, como lo planteó Miller *et al.* (2009) para *H. rubra*, aunque quizá les tomaría muchas décadas para que las poblaciones alcanzaran aquellas densidades históricas previas a 1976.

A la par de la diferenciación poblacional entre San Clemente Island y las localidades Mexicanas, causadas por flujo genético restringido, las recientes disminuciones en abundancia podrían acelerar la divergencia poblacional y reducción de riqueza alélica debido a procesos de deriva genética. Este quizá sea el caso particular para el abulón amarillo en el Sur de California, donde la pesquería fue recientemente cerrada debido al colapso de la población (California Fish and Game Code, section #5521), pero no para México donde aún existe una pesquería abierta.

6.4. CONECTIVIDAD GENÉTICA ENTRE DOS LOCALIDADES

La asignación de grupos de edad en las diferentes localidades, establecida con los mismos criterios, quizá no es tan adecuada debido a que la tasa de crecimiento del abulón

es altamente variable entre localidades por estación del año y temperatura. Las tasas de crecimiento estacional pueden variar marcadamente bajo influencia de la temperatura, la disponibilidad de alimento (cantidad y calidad) y la competencia anabólica de la gametogénesis. Sin embargo, en especies en la cuales el reclutamiento larvario tiene lugar sobre periodos limitados de tiempo dentro de un año, claramente define las modas para la primera, segunda y posiblemente la tercer clase anual (Leighton, 2000). La asignación de grupos de edad en juveniles de *H. corrugata*, tomó en consideración en primera instancia el comportamiento de las modas de las tallas.

En los resultados de estructura genética poblacional de *H. corrugata* no fue evidente la diferenciación genética entre las localidades mexicanas (Isla Cedros, Isla Natividad, La Bocana y San Juanico). Ante tal carencia de diferenciación poblacional los investigadores frecuentemente concluyen que hay suficiente flujo genético en nuestros días para prevenir la diferenciación genética poblacional. Las consecuencias de tal apreciación dependen del propósito del análisis. Para los biólogos evolutivos tal aseveración puede no tener mayor importancia debido a que el valor de interés es a menudo el promedio de flujo genético por generación sobre grandes periodos de tiempo. Sin embargo para los biólogos pesqueros que buscan delinear stocks para propósitos de manejo, tal aseveración puede tener mayores consecuencias, de tal forma que este puede conducir a un manejo inapropiado (stock sencillo versus dos stocks separados). Una solución efectiva para determinar conectividad genética en una escala de unas cuantas generaciones es incluir el muestreo de nuevos reclutas. Las poblaciones genéticas de larvas planctónicas marinas ó nuevos reclutas son mucho mas dinámicas espacial y temporalmente de lo esperado, aún cuando sus poblaciones adultas son grandes y aparentemente bien conectadas por dispersión larvaria

(Hellberg *et al.*, 2002). Basándonos en los argumentos anteriores se decidió emplear nuevos reclutas (juveniles de 0-2 años de edad) de *H. corrugata*, llegando a las siguientes reflexiones.

La similitud observada en las frecuencias alélicas de adultos y juveniles de El Riíto y La Bocana (en la mayoría de los loci), nos indicó que aparentemente no existían diferencias en la variación genética de adultos y juveniles provenientes de una misma localidad. Esta similitud genética se vio reflejada en la semejanza de N_A , entre adultos y juveniles del grupo I de El Riíto y entre adultos y juveniles del grupo II de La Bocana. Estos resultados descartan el posible efecto de la gran varianza en el éxito reproductivo afortunado (Sweepstakes), en donde una elevada varianza en el número de descendientes resultaría en una contribución efectiva de solo un subconjunto de la población de reproductores cada año y las larvas marinas reflejarían este efecto y exhibirían variación genética reducida en relación a las poblaciones adultas (Flowers *et al.*, 2002), lo cual no se apreció en *H. corrugata*. Además, al haber analizado juveniles de uno y dos años de edad de El Riíto y La Bocana, respectivamente, también se descartaría el efecto de la supervivencia sobre la reducción de la variación genética. En la naturaleza el abulón presenta una amplia colección de depredadores. Los filtroalimentadores recolectan los productos sexuales (gametos) y larvas (trocófora y veliger), los depredadores del bentos (poliquetos, nemátodos, planarias, caracoles, lapas, erizos, estrellas de mar y abulones adultos) se alimentan de nuevos reclutas de abulón (juveniles) mediante el raspado y herbivoría del bentos, y depredadores como los pulpos y cangrejos pueden atacar reclutas más grandes (McShane, 1992; Leighton, 2000). Todo esto sin considerar las variaciones físicas y químicas en el ambiente marino (Leighton, 2000). Bajo este panorama McShane

(1992), estimó supervivencias menores al 1% durante los primeros dos meses de vida de *H. rubra*. Para *H. fulgens*, Guzmán del Prío y colaboradores (2004), reportaron una tasa anual de supervivencia del 30–42% para individuos de 1 y 2 años de edad trasplantados al medio natural. Por otro lado, *H. corrugata*, presenta una fecundidad máxima del 9.5×10^6 ovocitos (Ortíz-Quintanilla *et al.*, 1986). Si consideramos esta información, la aportación de los machos (alelos diferentes) y el hecho de que cada población local esta constituida por cientos de adultos, se podría inferir que los efectos de la varianza en el éxito reproductivo y supervivencia durante los primeros años de vida de *H. corrugata*, aparentemente no traen consigo una reducción en la variación genética.

En términos de H_o , aunque los excesos de heterocigotos en las muestras de juveniles (4 de 8 loci), no mostraron diferencias significativas de las de adultos, si podrían ser un indicador de que la producción de la descendencia se llevó a cabo por un número reducido de progenitores (Hedgecock *et al.*, 2007), en donde la proporción de heterocigotos en la muestra de juveniles de una cohorte puede exceder aquella esperada de las frecuencias alélicas.

Se observó EHW en todos los loci de ambas localidades, a pesar de que *Hco19* y *Hco97* mostraron evidencias de alelos nulos. Esto nos indicó que a pesar de la presencia de alelos nulos en tales loci, las muestras alcanzaron el EHW, esto se pudo deber a la baja contribución de los alelos nulos ó a un artificio del ajuste secuencial de Bonferroni.

En contraparte, se observó desequilibrio de ligamiento en la localidad de El Riíto, pero no en la de La Bocana. El desequilibrio de ligamiento es otro indicador de asociación no azarosa de alelos en diferentes genes y quizá también distingue a cohortes producidas

por un número de parientes reducido, debido al número limitado de cromosomas y combinaciones genéticas presentes (Hedgecock *et al.*, 2007).

Los análisis AMOVA (global y jerárquico) y F_{ST} pareado no mostraron diferencias dentro de cada localidad entre juveniles y adultos, ni tampoco entre juveniles y adultos de diferentes localidades. De hecho, el mayor porcentaje de la variación genética se encontró explicado hacia el interior de las localidades y no entre localidades. Lo anterior podría descartar el otro posible efecto de la varianza en el éxito reproductivo afortunado mencionado por Flowers *et al.* (2002), en donde debido a que la estocasticidad ambiental determinaría cuales individuos son exitosos en cada estación reproductiva, se esperaría que diferentes grupos de individuos fueran exitosos en años diferentes. Entonces el error de muestreo resultaría en cohortes que son genéticamente diferentes a través del tiempo, lo cual no se apreció en los juveniles de *H. corrugata* de El Riíto y La Bocana.

Además hay que considerar el efecto de la dispersión larvaria sobre la escala espacial empleada (39 km) y el lapso de tiempo comprendido (tres generaciones), en el presente estudio. Miller *et al.* (2009), reportaron una mayor variación genética (número de alelos, alelos raros y exclusivos) en poblaciones colapsadas de *H. rubra* en comparación a poblaciones saludables. Miller y colaboradores bajo estas circunstancias sugirieron que la migración larvaria representaría una mayor proporción en el reclutamiento total de larvas. Entonces, si es que existió una gran varianza en el éxito reproductivo de *H. corrugata* que marcó a los nuevos reclutas con marcas genéticas distintivas, quizá no fue evidente por el papel que juega la dispersión larvaria y flujo genético en la homogenización de las frecuencias alélicas de ambas localidades. Una pequeña cantidad de flujo genético es usualmente suficiente para prevenir diferencias marcadas en las frecuencias alélicas. Por

ejemplo si un migrante por generación se asienta y entra a la población reproductora local, entonces esta pequeña cantidad de intercambio genético es suficiente para prevenir la acumulación de grandes diferencias genéticas (Slatkin, 1987 en Palumbi, 2003).

Respecto a la escala espacial, comparaciones de aislamiento por distancia en algunos invertebrados marinos con larvas pelágicas, sugieren distancias de dispersión larvaria promedio de 25–50 km, en *Littorina cingulata* y *Echinometra mathaei*, respectivamente (Palumbi, 2003). La escala espacial empleada (39 km) en el estudio de juveniles de *H. corrugata*, cae dentro de este intervalo y sugiere una dispersión larvaria en una escala espacial del orden de decenas de kilómetros. Sin embargo, estas estimaciones como menciona Palumbi (2003), son sensitivas a las condiciones oceánicas, patrones de comportamiento larvario, supuestos sobre el tamaño poblacional y la historia reciente de flujo genético.

Los resultados obtenidos con los microsatélites de *H. corrugata* en el análisis de parentesco de El Riíto, claramente demostraron su potencial para ser usados como marcas genéticas en los programas de repoblamiento, como se ha observado en otras especies con este tipo de marcadores genéticos (Perez-Enríquez y Taniguchi, 1999; Gutierrez-Gonzalez y Perez-Enriquez, 2005). Además estos microsatélites también pueden ser utilizados en la estimación directa de conectividad ó retención local vía pruebas de asignación ó de parentesco, de manera similar a las marcas ambientales físicas y químicas (Hedgecock *et al.*, 2007).

Los resultados del análisis de parentesco en El Riíto, bajo la consideración de genotipos multilocus completos en cinco loci, nos indicaron un relativamente alto

porcentaje de éxito (41.4%) en la asignación, pero esto se debió principalmente a que solo 29 genotipos de adultos completos se utilizaron en la asignación de 12 padres. Dentro de este porcentaje de asignación solo dos padres fueron los responsables del 57.1% de la progenie (cuatro de siete juveniles). Este resultado coincidió con lo ya reportado por Selvamani *et al.* (2001), bajo cruzas controladas de *H. asinina*, en donde la mayoría de la descendencia fue producto de únicamente de un subconjunto de las cruzas potenciales. Este resultado puede reflejar diferencias en la calidad del esperma, la relativa compatibilidad genética entre los gametos y supervivencia diferencial embrionaria ó larvaria (Selvamani *et al.*, 2001).

La posibilidad de asignar progenie a padres particulares depende de el número de loci disponibles y su habilidad para excluir a los que no son padres; esto se correlaciona significativamente a la diversidad alélica de los loci (Bernatchez y Duchesne, 2000). Típicamente unos cuantos loci altamente polimórficos son suficientes para la asignación de parentesco exitoso. En el caso de *H. asinina* se asignó parentesco exitosamente a larvas individuales con tres ó menos loci de microsatélites con polimorfismos de moderado a elevado (Selvamani *et al.*, 2001). De acuerdo con Bernatchez y Duchesne (2000), el número de loci requerido en una prueba de asignación de parentesco con 11 alelos promedio por locus y 50 padres potenciales serían 5 loci. Nosotros empleamos en el análisis final cinco loci, con un número promedio de 10.8 alelos por locus y un promedio de 29 padres genotificados en todos los loci, por lo tanto nuestra asignación de parentesco se ajustó al número mínimo de loci requerido. Además es muy importante subrayar que los loci empleados fueron los mejores (en EHW, sin alelos nulos y lecturas confiables), para la asignación de parentesco.

Si integramos los resultados de conectividad genética obtenidos mediante métodos indirectos y directos en las subpoblaciones mexicanas de *H. corrugata*, basándonos en la estructura poblacional y análisis de nuevos reclutas, respectivamente, podemos inferir que ha existido flujo genético por dispersión larvaria en escalas evolutivas (cientos de años) entre todas las localidades Mexicanas y existe en escalas ecológicas (unas cuantas generaciones) entre La Bocana y El Riíto. Sin embargo, mediante el método directo de análisis de parentesco en la localidad de El Riíto, también se puede inferir retención larvaria, aunque en menor proporción. Ambos mecanismos ya habían sido hipotetizados por McShane (1992), en donde el mencionaba que las larvas retenidas en áreas discretas por giros ó por la topografía local podían completar su ciclo larvario cerca de su sitio natal. La mayoría de las larvas dispersadas hacia mar abierto probablemente no encontraban hábitat adecuado para el asentamiento; aunque las pocas que lo hacían contribuían al flujo genético entre poblaciones. Esto difiere un poco con lo propuesto por Leighton (2000), quien establece que no obstante de existir evidencias contradictorias, prevalece el potencial para la dispersión de las larvas de abulón. Dada una corriente de una milla náutica por hora (1.852 km/h) en los 5 metros superficiales, las larvas trocoforas y veliger durante sus primeros cuatro días de desarrollo pueden ser transportadas hasta 94 millas náuticas (174 km). Además, observaciones en laboratorio sobre la longevidad de vida larvaria sugieren que la larva puede continuar nadando hasta dos semanas ó más. Las larvas que no pasaron por un substrato favorable para el asentamiento después de dos semanas, podrían ser transportadas más de 300 millas (555 km), en una corriente de una milla náutica por hora. Tegner y Butler (1985), basándose en la recuperación de tubos de deriva liberados a lo largo de la costa sur de California concluyeron que las larvas de abulón azul probablemente

no son acarreadas lejos de sus puntos de origen. Ellos dieron soporte a su argumento con el dato de Leighton (1974), mostrando un tiempo mínimo de esta especie de 3.5 días (22–24°C). Sin embargo dadas las temperaturas de 15–20°C (temperatura superficial en la Bahía de California durante el periodo de máximo desove del abulón azul), las larvas de abulón azul requieren de 5–10 días para alcanzar la competencia al asentamiento. Según Leighton (2000), estudios electroforéticos y genéticos del abulón han sugerido que el reclutamiento es localizado en algunas especies en localidades específicas. Sin embargo el concepto de reclutamiento localizado no está bien sustentado por el comportamiento de nado larvario señalado para especies de abulón rojo y azul de California. El asentamiento localizado de prole de padres residentes puede presentarse durante periodos raros de corrientes mínimas ó en sentido contrario. Con base a esta información Leighton (2000), sugirió que los análisis bioquímicos y genéticos de tejidos indicarían el aumento de homogeneidad bajo circunstancias donde el reclutamiento localizado es ocasionalmente exitoso.

Los resultados del presente estudio dan soporte a la hipótesis de dispersión y retención larvaria entre subpoblaciones mexicanas de *H. corrugata*, presentándose la dispersión entre subpoblaciones en una escala espacial de decenas de km (acorde al modelo “stepping-stone”) y la retención dentro de una escala espacial máxima de 100 m (considerada por el experimento de El Riíto). Las consecuencias de ambos mecanismos dependerán de la magnitud en que se lleven a cabo en cada subpoblación (no estimadas en el presente estudio), pero de manera general evitarían que la disminución en número de adultos de las subpoblaciones trajera consigo una concomitante disminución en la

diversidad genética por cuellos de botella. Por el contrario la dispersión larvaria y flujo genético mantendría una diversidad genética homogénea entre subpoblaciones y contribuirían con aportación larvaria en el reclutamiento total de cada subpoblación como se ha reportado en *H. rubra* (Miller *et al.*, 2009) y *Amphiprion percula* (Planes *et al.*, 2009), permitiendo la recuperación a largo plazo de bancos y subpoblaciones disminuidas. Ambos mecanismos de conectividad y sustentamiento local parecen ser demográficamente significativos y probablemente contribuyen a la persistencia de poblaciones discretas dentro de una metapoblación más grande (Planes *et al.*, 2009).

7. CONCLUSIONES

7.1. OBTENCIÓN DE MICROSATÉLITES EN *H. corrugata*

- Después de la amplificación cruzada, los microsatélites de *H. kamtschatkana*, presentaron un mayor éxito en la optimización en comparación a los de *H. fulgens*.
- El mayor número de microsatélites reportados se obtuvo mediante el enriquecimiento con la sonda (GT)₁₅.
- Durante el proceso de diseño de iniciadores se encontraron varias regiones microsatélites con el motivo de repetición (TA)_n, aún cuando no se hizo un enriquecimiento con esta sonda.
- El 5.5% de las clonas secuenciadas resultó en microsatélites polimórficos en *H. corrugata*.
- En total se caracterizaron 13 loci de microsatélites para *H. corrugata*, producto de la amplificación cruzada y aislamiento de microsatélites.
- La diversidad genética encontrada en *H. corrugata* encontrada en los 13 microsatélites va de baja a alta en cuanto a número de alelos (2–57) y a heterocigosidad observada (0.104–0.939).
- De los 13 microsatélites, ocho loci se encontraron en equilibrio de Hardy–Weinberg (*Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco47*, *Hco97*, *Hco194* y *Hka56*) ($P < 0.006$) y en equilibrio de ligamiento ($P > 0.05$), en una muestra silvestre.

7.2. DETERMINACIÓN DE HERENCIA MENDELIANA EN MICROSATÉLITES DE

H. corrugata

- Con la técnica de extracción de ADN propuesta por Selvamani *et al.* (2001), se obtuvo un elevado porcentaje de éxito en la amplificación vía PCR (91–100%), a partir de larvas de abulón.
- La mayoría de los loci (*Hco15*, *Hco22*, *Hco47-2*, *Hco97*, *Hco194*, *Hka3* y *Hka56*), presentaron segregación mendeliana. Solo dos loci no se ajustaron a la segregación mendeliana, presentando alelos nulos (*Hco47-1* y *Hco19*).
- Los microsatélites de *H. corrugata* son capaces de discriminar entre larvas emparentadas y no emparentadas.
- Los microsatélites *Hco19*, *Hco22*, *Hco47-2* y *Hka3* de *H. corrugata* potencialmente podrían emplearse para la certificación de organismos triploides, una vez que se determinen sus frecuencias de recombinación.
- Los loci *Hco15*, *Hco16*, *Hco22*, *Hco47-2*, *Hco97*, *Hco194*, *Hka3* y *Hka56* demostraron ser útiles para el análisis de poblaciones silvestres de *H. corrugata*. El locus *Hco19*, podría emplearse para análisis poblacional siempre y cuando se observe en equilibrio de Hardy–Weinberg y/o se empleó un programa para estimar las frecuencias de alelos nulos. El locus *Hco47-1*, debido a una presencia elevada de alelos nulos, se descarta para el análisis de poblaciones silvestres y pruebas de parentesco.

- Los marcadores *Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco47-2*, *Hco97* y *Hka3*, debido a su polimorfismo de moderado a elevado, son candidatos para la estimación directa de conectividad vía pruebas de asignación ó de parentesco.

7.3. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

- La diversidad genética encontrada en las poblaciones naturales de abulón amarillo va de baja a alta en cuanto a los estimadores N_A (2–28) y H_O (0.170–0.896).
- Los resultados de la estructura genética poblacional demostraron la existencia de una población no panmíctica de abulón amarillo, a lo largo de su distribución. En donde las localidades Mexicanas son subunidades de una población genéticamente homogénea, interconectadas por flujo genético a lo largo de la costa central de la península de Baja California y San Clemente Island es una población diferente de las que conforman las localidades Mexicanas, históricamente aislada.
- El principal factor de diferenciación genética entre San Clemente Island y las localidades Mexicanas fue el aislamiento por distancia sobre una escala de 600 a 1000 km.
- Los estimadores de flujo genético indicaron conectividad genética restringida entre San Clemente Island y las cuatro localidades Mexicanas ($N_m = 7-19$) y conectividad genética entre las cuatro localidades Mexicanas ($N_m = \sim 1 \times 10^6$), debido a la ausencia de barreras al flujo genético a lo largo de la costa central de Baja California.

7.4. CONECTIVIDAD GENÉTICA ENTRE DOS LOCALIDADES

- No se apreció variación genética entre adultos y juveniles de la misma localidad en frecuencias alélicas, N_A y H_O , descartando el posible efecto de la varianza en el éxito reproductivo afortunado (Sweepstakes) y de supervivencia.
- Los excesos de heterocigotos observados en las muestras de juveniles de El Riíto (3 de 8 loci) y La Bocana (4 de 8 loci), pueden ser indicadores de que la producción de la descendencia se llevó a cabo por un número reducido de adultos.
- El desequilibrio de ligamiento, evidente solo en El Riíto, es un indicador de asociación no azarosa de alelos en diferentes genes, debido a un número limitado de cromosomas y combinaciones genéticas presentes probablemente en un número de progenitores reducido.
- No se observó diferenciación genética entre muestras de juveniles de El Riíto y La Bocana, esto descarta otro posible efecto del “éxito reproductivo afortunado”, en donde la estocasticidad ambiental determinaría cuales individuos son exitosos cada estación reproductiva. Si grupos diferentes de progenitores fueran exitosos en años diferentes, entonces se esperaría que las cohortes fueran genéticamente diferentes a través del tiempo.
- Si existiera una gran varianza en el éxito reproductivo de *H. corrugata* que marcara a los nuevos reclutas con marcas genéticas distintivas, quizás estas no serían evidentes por el papel que juegan la dispersión larvaria y flujo genético en la homogenización de las frecuencias alélicas de localidades cercanas (el caso de El Riíto y La Bocana).

- Los resultados obtenidos con los microsátélites de *H. corrugata* en el análisis de parentesco de El Riíto, claramente demostraron su potencial como marcadores genéticos para evaluar los programas de repoblamiento y en la estimación directa de conectividad ó retención local vía pruebas de asignación ó de parentesco.
- Basándonos en los resultados de estructura poblacional y análisis de nuevos reclutas, podemos inferir que ha existido flujo genético por dispersión larvaria en escalas evolutivas (cientos de años) entre todas las localidades Mexicanas y existe en escalas ecológicas (unas cuantas generaciones) entre La Bocana y El Riíto. Así también mediante el análisis de parentesco en El Riíto podemos inferir retención larvaria, aunque en menor proporción.
- Al parecer ambos mecanismos como son la dispersión y retención larvaria ocurren entre subpoblaciones mexicanas de *H. corrugata*, presentándose la dispersión entre subpoblaciones en una escala espacial de decenas de km y la retención dentro de una escala espacial de cientos de metros. Ambos mecanismos son demográficamente significativos y contribuyen a la persistencia de poblaciones discretas.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda explorar el total de los microsatélites de *H. kamtschatkana* en *H. corrugata*, con la finalidad de incrementar el número de microsatélites disponibles para esta especie.
- Se recomienda la técnica propuesta por Sweijd *et al.* (1998) para la extracción de ADN de especímenes adultos. También se recomienda la estandarización de las concentraciones de ADN individuales a $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, antes de realizar la PCR.
- Se recomienda la técnica de extracción de ADN propuesta por Selvamani *et al.* (2001), la cual permitió obtener un elevado porcentaje de éxito en la amplificación de ADN de larvas veliger de *H. corrugata*.
- Se recomienda el empleo preferente de sondas $(\text{GT})_n$, $(\text{CT})_n$ y $(\text{TA})_n$, en dicho orden, para la generación de futuras genotecas en *H. corrugata*. Así también se recomienda el uso de sondas con motivos de repetición tetranucleótidos y combinaciones de múltiples sondas (di, tri y tetranucleótidos).
- Se recomienda el uso de los loci *Hco15*, *Hco16*, *Hco22*, *Hco47-2*, *Hco97*, *Hco194*, *Hka3* y *Hka56*, en el análisis genético-poblacional del abulón amarillo de la parte norte de su distribución (norte de la península de Baja California y California), poblaciones que actualmente se encuentran en veda, para determinar su relación respecto a la parte central de la península de Baja California.
- El locus *Hco19* también se puede utilizar, pero se recomienda estimar la frecuencia de alelos nulos en este locus, previo a los análisis de diferenciación genética poblacional.

- Para poder emplear el locus *Hka3* en el análisis poblacional, se recomienda un tamaño de muestra superior ($n = 80$), para tener representada la mayor proporción de su diversidad genética. Este locus fue el más polimórfico de todos los loci y podría aportar mayor resolución en pruebas de asignación poblacional.
- Los loci *Hco15*, *Hco16*, *Hco19*, *Hco22*, *Hco47-2*, *Hco97* y *Hka3* se recomiendan particularmente para pruebas de asignación poblacional, de parentesco y para estimar las distancias de dispersión de *H. corrugata*, debido a su polimorfismo de moderado a elevado.
- Los resultados obtenidos en el presente estudio proporcionaron información sobre la identificación genética de las poblaciones de abulón amarillo, la cual es un prerequisite esencial si nuestra meta es mantener a las poblaciones silvestres en su estado natural, se recomienda la consideración de esta información en el manejo de las poblaciones de abulón para prevenir cambios genéticos antropogénicos en la estructura de la población así como la pérdida de diversidad genética intra e inter poblacional.
- Se recomienda explorar los patrones de conectividad local, ya que el conocimiento de estos patrones son importantes por que los procesos que ocurren en una localidad pueden ocasionar cambios en sitios distantes. El entendimiento de la conectividad entre bancos y entre localidades es vital para la conservación, manejo de pesquerías y particularmente para el diseño estratégico de sistemas de reserva.

- Para el análisis de adultos y nuevos reclutas de *H. corrugata* se recomienda un diseño de muestreo que permita la discriminación de bancos naturales dentro de una misma localidad. Así también se recomienda que las muestras de adultos y nuevos reclutas de localidades diferentes se colecten en un mismo periodo de tiempo.
- Respecto a las muestras de nuevos reclutas de *H. corrugata*, se recomienda trabajar con juveniles de los grupos de edad 0+ y I ó nuevos reclutas. Además las tallas promedio de juveniles de bancos diferentes deben coincidir.
- Referente al tamaño de muestra (n) se recomienda incrementar el número de individuos adultos y juveniles por localidad ($n = 80-100$), para tener representados el mayor número de padres potenciales en las pruebas de parentesco y para hacer una asignación mayor de juveniles.
- Para el análisis de tamaños de muestras grandes con un juego de loci de al menos siete microsatélites se recomiendan métodos de alto rendimiento para la obtención de genotipos, como son el empleo de reacciones multiplex (PCR) y el empleo de un escáner ó un secuenciador que detecte productos de PCR etiquetados con fluorocromos.
- Si lo que se busca es estimar la magnitud de la dispersión larvaria sobre una escala espacial, entonces el diseño de muestreo también debe de incluir diferentes escalas (decenas de metros, unidades, decenas y cientos de kilómetros), que permitan evaluar el autoreclutamiento, la dispersión entre bancos de una misma localidad y entre bancos de diferentes localidades.

- Los microsatélites obtenidos en *H. corrugata*, representan un beneficio potencial como marcadores moleculares tanto para la caracterización de la diversidad genética de las poblaciones naturales, así como para el diseño de programas de selección asistida en acuicultura.
- Tales marcadores moleculares no solo son aplicables a la especie en sí, si no que también representan posibles herramientas para tratar de contestar preguntas similares ó particulares (certificación de especies, híbridos, etc.) en especies hermanas de abulón (*H. fulgens* y *H. rufescens*).

LITERATURA CITADA

- An, H.S. y S.J. Han. 2006. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. Mol. Ecol. Notes. 6: 11–13.
- Avise, J.C. 2004. Molecular markers, natural history and evolution. Sinauer Associates. Segunda edición. Sunderland. 684 p.
- Babcock, R. y J. Keesing. 1999. Fertilization biology of the abalone *Haliotis laevigata*: laboratory and field studies. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56: 1668–1678.
- Baranski, M., Rourke, M., Loughnan, S., Austin, C. y N. Robinson. 2006. Isolation and characterization of 125 microsatellite DNA markers in the blacklip abalone, *Haliotis rubra*. Mo. Ecol. Notes. 6: 740–746.
- Baranski, M., Rourke, M., Loughnan, S., Hayes, B., Austin, C. y N. Robinson. 2008. Detection of QTL for growth rate in the blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach) using selective DNA pooling. 39(6): 606–614.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. y F. Bonhomme. 2004. GENETIX 4.05 logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome Populations Interactions CNRS UMR 5000 Université de Montpellier II, Montpellier, France. Available at: <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>
- Bernatchez, L. y P. Duchesne. 2000. Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many loci, how many alleles?. Can. J. Fish Aquat. Sci. 57: 1–12.

- Bester, A.E. Slabbert, R. y M.A. D'Amato. 2004. Isolation and characterization of microsatellite markers in the South African abalone (*Haliotis midae*). Mol. Ecol. Notes. 4: 618–619.
- Brookfield, J.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. Mol. Ecol. 5: 453–455.
- Burland, T.G. 2000. DNASTAR's Lasergene sequence analysis software. Method. Mol. Biol. 132: 71–91.
- Burton, R.S. y M.J. Tegner. 2000. Enhancement of red Abalone *Haliotis rufescens* stocks at San Miguel Island: reassessing a success story. Mar. Ecol. Prog. Ser. 202: 303–308.
- Chambers, M.D., VanBlaricom, G.R., Hauser, L., Utter, F. y C.S. Friedman. 2006. Genetic structure of black abalone (*Haliotis cracherodii*) populations in the California islands and central California coast: Impacts of larval dispersal and decimation from withering syndrome. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 331:173–185.
- Conod, N., Bartlett, J.P., Evans, B.S. y N.G. Elliott. 2002. Comparison of mitochondrial and nuclear DNA analyses of population structure in the blacklip abalone *Haliotis rubra* Leach. Mar. Freshwater Res. 53: 711–718.
- Cox, K. W. 1962. California abalones, Family Haliotidae. Calif. Dept. Fish and Game, Fish. Bull., 118: 133 p.
- Creste, S., Tulmann, N.A. y A. Figueira, 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. Plant. Mol. Biol. Rep. 19: 299–306.

- Cruz, P., Ibarra, A.M., Fiore-Amaral, G., Galindo-Sánchez, C.E y G. Mendoza-Carrión. 2005. Isolation of microsatellite loci in green abalone (*Haliotis fulgens*) and cross-species amplification in two other North American red (*Haliotis rufescens*) and pink (*Haliotis corrugata*) abalones. *Mol. Ecol. Notes*. 5:857–859.
- Del Río-Portilla, M. y J.G. González-Avilés. 2001. Population genetics of the yellow abalone, *Haliotis corrugata*, in Cedros and San Benito Islands: A preliminary survey. *J. Shellfish Res.* 20(2):765–770.
- Díaz-Viloria, N., Pérez-Enríquez, R., Fiore-Amaral, G., Burton, R.S. y P. Cruz. 2008. Isolation and cross-amplification of microsatellites in pink abalone (*Haliotis corrugata*). *Mol. Ecol. Resources*. 8:701–703.
- Evans, B., White, R.W.G. y N.G. Elliott. 2000. Characterization of microsatellite loci in the Australian Blacklip abalone (*Haliotis rubra*, Leach). *Mol. Ecol. Notes*. 9: 1183–1184.
- Evans, B., Conod, N. y N.G. Elliott. 2001. Evaluation of microsatellite primer conservation in abalone. *J. Shellfish Res.* 20(3): 1065–1070.
- Evans, B.S., Sweijd, N.A., Bowie, R.C.K., Cook P.A. y N.G. Elliott. 2004. Population genetic structure of the perlemoen *Haliotis midae* in South Africa: Evidence of range expansion and founder events. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 270:163–172.
- Excoffier, Laval, L.G. y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1:47–50. Available from URL: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.

- Felsenstein, J. 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, WA. Available at: <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>
- Ferguson, M.M. y R.G. Danzmann. 1998. Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting?. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 55: 1553–1563.
- Flowers, M.J., Schroeter, S.C. y R. S. Burton. 2002. The recruitment sweepstakes has many winners: genetic evidence from the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Evolution*. 56(7): 1445–1453.
- Freeland, J.R. 2007. *Molecular Ecology*. John Wiley and Sons. The Atrium. 388 p.
- Gaffney, P.M., Rubin, V.P., Hedgecock, D., Powers, D.A., Morris, G. y L. Hereford. 1996. Genetic effects of artificial propagation: signals from wild and hatchery populations of red abalone in California. *Aquaculture*. 143: 257–266.
- Glenn, T.C. y N.A. Schable, 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Method Enzymol.* 395, 202–222.
- Gruenthal, K.M., Acheson, L.K. y R.S. Burton. 2007. Genetic structure of natural populations of California red abalone (*Haliotis rufescens*) using multiple genetic markers. *Mar. Biol.* 152:1237–1248.
- Gruenthal, K.M. y R.S. Burton. 2008. Genetic structure of natural populations of the California black abalone (*Haliotis cracherodii* Leach, 1814), a candidate for endangered species status. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 355:47–58.

- Gutierrez-Gonzalez, J.L. y R. Perez-Enriquez. 2005. A genetic evaluation of stock enhancement of blue abalone *Haliotis fulgens* in Baja California, México. *Aquaculture*. 247: 233–242.
- Gutiérrez-Gonzalez, J.L., Cruz, P., Del Rio-Portilla M.A. y R. Perez-Enriquez. 2007. Genetic structure of green abalone *Haliotis fulgens* population off Baja California, Mexico. *J. Shellfish Res.* 26(3):839–846.
- Guzmán-del Prío, S.A., Oleg Zaytsev, F.A., Belmar-Pérez, J. y J. Carrillo-Laguna. 2000. Potential dispersion of reproductive products and larval stages of abalone (*Haliotis* spp.) as a function of the hydrodynamics of Bahía Tortugas, México. *J. Shellfish Res.* 19(2): 869–881.
- Guzmán-del Prío, S.A., Carrillo-Laguna, J., Belmar-Pérez, J., Carreón-Palau, L. y A. Castro. 2004. Trasplanting of wild and cultivated juveniles of green abalone (*Haliotis fulgens* Philippi, 1845): growth and survival. *J. Shellfish. Res.* 23(3): 855–860.
- Hamm, D.E. y R.S. Burton. 2000. Populations genetics of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the central California coast. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 254: 235–247.
- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates. Tercera edición. Sunderland. 542 p.
- Hedgecock, D., Barber, P.H. y S. Edmands. 2007. Genetic approaches to measuring connectivity; *Oceanography*, 20(3): 70–79.

- Hellberg, M.E., Burton, R.S., Neigel, J.E. y S.R. Palumbi. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bull. Mar. Sci.* 70(1): 273–290.
- Ibarra, A. M., Hernández-Ibarra, N. K., Cruz, P., Pérez-Enríquez, R., Avila, S. y J.L. Ramírez. 2005. Genetic certification of presumed hybrids of blue x red abalone (*Haliotis fulgens* Phillippi and *H. rufescens* Swainson). *Aquac. Res.* 36: 1356–1368.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L. y T.C. Marshall, 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16: 1099–1106.
- Kirby, V.L., Villa, R. y D.A. Powers. 1998. Identification of microsatellites in the california red abalone, *Haliotis rufescens*; *J. Shellfish Res.* 17(3): 801–804.
- Kordos, L. y R. Burton. 1993. Genetic differentiation of Texas Gulf Coast populations of the blue crab *Callinectes sapidus*. *Mar. Biol.* 117: 227-233.
- Lee, Y. y V.D. Vacquier. 1992. The divergence of species-specific abalone sperm lysins is promoted by positive Darwinian selection. *Biol. Bull.* 182: 97–104.
- Lee, Y. y V.D. Vacquier. 1995. Evolution and systematic in Haliotidae (Mollusca: Gastropoda): inferences from DNA sequences of sperm lysin. *Mar. Biol.* 124: 267–278.
- Leighton, D.L. 1974. The influence of temperature on larval and juvenile growth in three species of southern california abalones; *Fish. Bull.* 72 (4): 1137–1145.
- Leighton, D.L. 2000. The biology and culture of the California abalones. Dorrance Publishing. Pittsburgh. 216 p.

- León-Carballo, G. y M. Muciño-Díaz. 1996. Pesquería de Abulón. En Casas-Valdez, M. y G. Ponce-Díaz (ed.). Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Vol. I. Semarnap, México, 15–41 pp.
- Li, Q., Park, C. y A. Kijima. 2003. Allelic transmission of microsatellites and application to kinship analysis in newly hatched pacific abalone larvae. *Fish. Sci.* 69: 883–889.
- Liu, Z.J. y J.F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*. 238: 1–37.
- Lindberg, D.R. 1992. Evolution, distribution and systematic of Haliotidae. En: Shepherd, S.A., Tegner, M.J. y S. A. Guzmán del Prío (ed). *Abalone of the World: Biology, Fisheries and Culture*. Fishing News Books, Oxford, 3–18 pp.
- Lynn, R.J. y J.J. Simpson. 1987. The California current system: the seasonal variability of its physical characteristics. *J. Geophys. Res.* 92(C12): 12947–12966.
- Maeda-Martínez, A., Magallón-Barajas, F., Rodríguez-Jaramillo, M. del C., Pérez-Serrano, A. y H. León-Castro. 1994. Desarrollo Científico y Tecnológico del Cultivo del Abulón. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz. 77 p.
- McShane, P.E. 1992. Early life history of abalone: a review. En: Shepherd, S.A., Tegner, M.J. y S. A. Guzmán del Prío (ed). *Abalone of the World: Biology, Fisheries and Culture*. Fishing News Books, Oxford, 120–138 pp.
- Martínez, P. 2005. Aplicaciones de la genética para la mejora de la acuicultura. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.* 21 (1-4): 225–238.

- Miller, K.M., Laberee, K., Kaukinen, K.H., Li, S. y R.E. Withler. 2001. Development of microsatellite loci in pinto abalone (*Haliotis kamtschatkana*). Mol. Ecol. Notes 1: 315–317.
- Miller, K.J., Maynard, B.T. y C.N. Mundy. 2009. Genetic diversity and gene flow in collapsed and healthy abalone fisheries. Mol. Ecol. 18: 200–211.
- Moberg, P. y R. Burton. 2000. Genetic heterogeneity among adult and recruit red sea urchins, *Strongylocentrotus franciscanus*. Mar. Biol. 136: 773–784.
- Morales-Bojórquez, E., Muciño-Díaz, M.O. y J.A. Vélez-Barajas. 2008. Analysis of the decline of the abalone fishery (*Haliotis fulgens* and *H. corrugata*) along the westcentral coast of the Baja California peninsula, Mexico. J. Shellfish Res. 27(4):865–870.
- Oosterhout, C.V., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol. Ecol. Notes. 4: 535–538.
- Ortiz-Quintanilla, M., González-Aviles J.G., Salgado-Hernández, F. y M. Navarrete-Gutiérrez. 1986. Notas sobre madurez, índice gonadal y fecundidad en tres especies de abulón *Haliotis* spp. (Mollusca: Gasterópoda) a partir de colectas en El Rosario, Islotes Benitos y Bahía Asunción, Baja California. Sria. Pesca; Inst. Nal. de la Pesca; Cent. Reg. de Invest. Pes. Contrib. Biol. y Tecnol. Pesc. Doc. Tec. Inf. No. 1:17–41.

- Ortiz-Quintanilla, M., León-Carballo, G., Reinecke-Reyes, M.A., Lelevier-Grijalva, A., Turrubiates-Morales, J.R. y J.G. González-Aviles. 1990. Proceso reproductivo en especies de Abulón (*Haliotis* spp.) y su relación con los mecanismos regulatorios pesqueros en la Costa Occidental e islas adyacentes de la Península de Baja California, Méx. Res. VIII Simp. Intern. Biol. Mar.
- Palumbi, S.R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecol. Appl.* 13(1): S146–S158.
- Perez-Enriquez, R., Takagi, M. y N. Taniguchi. 1999. Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based of microsatellite DNA markers. *Aquaculture.* 173: 413–423.
- Perez-Enríquez, R. y N. Taniguchi. 1999. Use of microsatellite DNA as genetic tags for the assessment of a stock enhancement program of red sea bream. *Fish. Sci.* 65(3): 374–379.
- Planes, S., Jones, G.P. y S.R. Thorrold. 2009. Larval dispersal connects fish populations in a network of marine protected areas. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(14): 5693–5697.
- Prince, J.D., Sellers, T.L., Ford, W.B. y S.R. Talbot. 1987. Experimental evidence for limited dispersal of Haliotid larvae (genus *Haliotis*: Mollusca: Gastropoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 106: 243–263.
- Prince, J.D., Sellers, T.L., Ford, W.B. y S.R. Talbot. 1988. Confirmation of a relationship between the localized abundance of breeding stock and recruitment for *Haliotis rubra* Leach (Mollusca: Gastropoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 122: 91–104.

- Raymond, M. y F. Rousset. 1995a. Genepop (versión 3.4): populations genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248–249. Available from URL: <http://genepop.curtin.edu.au/index.html>.
- Raymond, M. y F. Rousset. 1995b. An exact test for population differentiation. *Evolution.* 49(6): 1280–1283.
- Reece, K.S., Ribeiro, W.L., Gaffney, P.M., Carnegie, R.B. y S.K. Allen. 2004. Microsatellite marker development and analysis in the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios. *J. Hered.* 95(4): 346–352.
- Ren, P., Wang, Z., Yao, C., Liu, Y. y C. Ke. 2008. Development of 11 polymorphic microsatellite loci in the small abalone (*Haliotis diversicolor* Reeve). *Mol. Ecol. Resources.* 8: 1390–1392.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), 223–225.
- Rosa-Vélez, J. de la y F. Rodríguez-Romero. 1989. Enfoque genético del análisis de poblaciones de recursos pesqueros: el caso de la población ostrícola de la laguna de Términos, Campeche. En: Rosa-Vélez, J. de la y F. González-Farías (ed.) *Temas de Oceanografía Biológica en México*. Ensenada, 255–284 pp.
- Rozen S. y H. J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz, S. y S. Misener (ed). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, 365–386 pp.

- Ryman, N. y S. Palm. 2006. POWSIM: a computer program for assessing statistical power when testing for genetic differentiation. *Mol. Ecol. Notes*. 6:600–602. Available at <http://www.zoologi.su.se/~ryman/>
- Ryman, N., Palm, S., André, C., Carvalho, G.R., Dahlgren, T.G., Jorde, P.E., Laikre, L., Larsson, L.C., Palmé, A. y D.E. Ruzzante. 2006. Power for detecting genetic divergence: differences between statistical methods and marker loci. *Mol. Ecol.* 15: 2031-2045.
- Sekino, M. y M. Hara. 2001. Microsatellite DNA loci in Pacific abalone *Haliotis discus discus* (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae). *Mol. Ecol. Notes*. 1: 8–10.
- Sekino, M. y M. Hara. 2007. Individual assignment tests proved genetic boundaries in a species complex of Pacific abalone (genus *Haliotis*). *Conserv. Genet.* 8:823–841.
- Selvamani, M.J.P., Degnan, S.M., Paetkau, D. y B.M. Degnan. 2000. Highly polymorphic microsatellite loci in the Heron Reef population of the tropical abalone *Haliotis asinina*. 9:1184–1186.
- Selvamani, M.J.P., Degnan, S.M. y B.M. Degnan. 2001. Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: parentage assignment in aquaculture. *Mar. Biotechnol.* 3: 478–485.
- Shaklee, J.B. y K.P. Currens. 2003. Genetic stock identification and risk assessment, En: Hallerman, E.M. (ed.). *Population genetics: principles and applications for fisheries scientists*. American Fisheries Society, Bethesda, 291–328 pp.

- Shepherd, S.A., Lowe, D. y D. Partington. 1992. Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*) XIII: larval dispersal and recruitment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 164: 247–260.
- Shepherd, S.A. y M. Avalos-Borja. 1997. The shell microstructure and chronology of the abalone *Haliotis corrugata*. *Moll. Res.* 18, 197-207.
- Shepherd, S.A., Turrubiates-Morales, J.R. y K. Hall. 1998; Decline of the abalone fishery at La Natividad, México: overfishing or climate change?. *J. Shellfish Res.* 17 (3): 839–846.
- Sierra-Rodríguez, P., Muciño-Díaz, M. y J.L., Gutiérrez-González, 2006. La pesquería del Abulón. En: Arreguín-Sánchez, F., Beléndez-Moreno, L., Méndez Gómez Humarán, I., Solana Sansores, R. y C. Rangel Dávalos (ed.). *Sustentabilidad y Pesca Responsable en México: Evaluación y Manejo*. Instituto Nacional de Pesca, México, D.F., 3–38 pp.
- Slate, J., Marshall, T. y J. Pemberton. 2000. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Mol. Ecol.* 9: 801–808.
- Slatkin, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution.* 39(1):53–65.
- Sotka, E.E., Wares, J.P., Barth, J.A., Grosberg, R.K. y S.R. Palumbi. 2004. Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. *Mol. Ecol.* 13:2143–2156.
- Sun, X., Zhen, M. y G. Yang. 2007. Development of 15 polymorphic genic microsatellite DNA markers of Pacific abalone *Haliotis discus hannai*. *Mol. Ecol. Notes.* 7: 604-606.

- Sweijd, N.A., Bowie, R.C.K., Lopata, A.L., Marinaki, A.M., Harley, E.H. y P. Cook. 1998. A PCR Technique for forensic, species-level identification of abalone tissue. *J. Shellfish Res.* 17(3): 889–895.
- Tang, S., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Jarayabhand P. y P. Menasveta. 2004. Population structure of tropical abalone (*Haliotis asinina*) in coastal waters of Thailand determined using microsatellite markers. *Mar. Biotechnol.* 6:604–611.
- Temby, N., Miller, K. y C. Mundy. 2007. Evidence of genetic subdivision among populations of blacklip abalone (*Haliotis rubra* Leach) in Tasmania. *Mar. Freshwater Res.* 58:733–742.
- Tegner, M.J. and R.A. Butler. 1985. Drift-tube study of the dispersal potential of green abalone (*Haliotis fulgens*) larvae in the southern California Bight: implications for recovery of depleted populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 26: 73–84.
- Thorrold, S.R., Jones, G.P., Hellberg, M.E., Burton, R.S., Swearer, S.E., Neigel, J.E., Morgan, S.G. y R. Warner. 2002. Quantifying larval retention and conectivity in marine populations with artificial and natural markers. *Bull. Mar. Sci.* 70(1): 291–308.
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38(6): 1358-1370.
- Withler, R.E., Campbell, A., Li, S.R., Brouwer, D., Supernault K.J. y K.M. Miller. 2003. Implications of high levels of genetic diversity and weak population structure for the rebuilding of northern abalone in British Columbia, Canada. *J. Shellfish Res.* 22(3): 839–847.

- Zaitsev, O., Sánchez-Montante, O. y C.J. Robinson. 2007. Características del ambiente hidrofísico de la plataforma continental y zona oceánica adyacente al sistema lagunar Bahía Magdalena-Almejas. En: Funes-Rodríguez, R., Gómez-Gutiérrez J. y R. Palomares-García (ed.). Estudios ecológicos en Bahía Magdalena. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas-Instituto Politécnico Nacional. La Paz, 29–43 pp.
- Zane, L., Bargelloni, L. y T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 11: 1–16.
- Zúñiga, G., Guzmán del Prío, S., Cisneros, R. y G. Rodríguez. 2000. Population genetic analysis of the abalone *Haliotis fulgens* (Mollusca: Gastropoda) in Baja California, México. *J. Shellfish Res.* 19(2): 853–859.

APÉNDICES

Apéndice I

Microsatélites probados en <i>Haliotis corrugata</i> por amplificación cruzada.			
Loci	Unidad de repetición	Iniciadores (5' - 3')	Tamaño (pb)
<i>Hka3</i> ¹	(GTA) ₁₆ (GAGT) ₁₀	F: GTGAGATGTTGGTGACT R: CCGTTATTCACCTCTTA	229-314
<i>Hka28</i> ¹	(CA) ₂₅	F: GTGGACAAGCACTCTAAA R: CGCCTGTTACGTTTTAGT	187-249
<i>Hka40</i> ¹	(CA) ₃₀	F: CCCTAACAGATATTGACAAT R: CTAGCAATATTCAAAATTACAAG	110-180
<i>Hka43</i> ¹	(GACA) ₁₆	F: CGCAACATGTCTACATATA R: GGTCTGTACATTTTATCTATGT	120-220
<i>Hka56</i> ¹	(CA) ₂₇	F: CGATAATCGTGTGGTAAGA R: GTGGCATGGTATCTCATT	97-148
<i>Hka80</i> ¹	(CA) ₃₂	F: CCTAACTATAGACGTAGTCA R: CGACGCGATGAATGAAT	88-144
<i>Hful603</i> ²	(AACC) ₄	F: CGGCTGTCATATAGCTGGAA R: ATGAGCATCGGGAACTTTG	186-204
<i>Hful260</i> ³	CA ₄ (CT) ₄	F: CCTCACCATCACCAGCACTA R: ATTGTGCGTTCATCAGCAAA	208

F; Forward, R; Reverse, ¹; Miller *et al.* (2001), ²; Cruz *et al.* (2005), ³; Gutiérrez-Gonzalez *et al.* (2007).

Apéndice II

Protocolo para la obtención de microsatélites a partir de genotecas enriquecidas, según Glenn y Schable (2005).

Digestión

El ADN extraído se fragmentó en segmentos de aproximadamente 500 pb mediante el uso de la enzima de restricción *Rsa I*. Se adicionó la mezcla de reacción (Tabla II.1) a las muestras y se incubaron a 37°C por 60 min. Inmediatamente después de la digestión se procedió a la ligación de los fragmentos de ADN.

Tabla II.1. Mezcla de reacción para la digestión con *Rsa I*.

Reactivos	Volúmenes
Solución amortiguadora NEB 2 (10x)	2.50 μ l
NaCl (5 M)	0.25 μ l
H ₂ O	1.25 μ l
<i>Rsa I</i>	1.00 μ l
ADN (200 ng/ μ l)	20 μ l

Ligación

Se unió un ligador de doble hélice a ambos lados de cada fragmento de ADN. Estos ligadores proporcionaron el sitio iniciador para PCR posteriores. A cada muestra se le agregó la mezcla de reacción (Tabla II.2) y se incubaron a 37°C por dos horas, después se llevaron a 70°C por 15 min.

Para la preparación de los ligadores SuperSNX de doble hélice (de igual molaridad) se mezclaron los iniciadores SuperSNX24 y SuperSNX24+4p en volúmenes iguales (100

μl de 10 μM c/u). Se adicionó sal para una concentración final de 100 mM. La mezcla se calentó a 95°C por 5 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Tabla II.2. Mezcla de reacción para la ligación.

Reactivos	Volúmenes
Ligadores de doble hélice SuperSNX	7.0 μl
Solución amortiguadora ligasa (10x)	3.5 μl
<i>Xmn I</i>	1.5 μl
ADN ligasa	3.0 μl
ADN digerido	20 μl

Enriquecimiento

Los fragmentos de ADN con microsatélites se hibridaron a sondas biotiniladas (secuencias complementarias a las de microsatélites). Las sondas que se utilizaron fueron: (GT)₁₅ y (CT)₁₅, así como una mezcla de estas dos. Para los enriquecimientos se adicionó una mezcla de reacción (Tabla II.3) a 10 μl de ADN ligado del paso anterior y se sometió a condiciones termales que permitieron desnaturalizar el ADN y llevarlo rápidamente a temperaturas en donde se diera el acoplamiento de la sonda y su hibridización con los fragmentos de ADN con los que mejor se complementaba.

Tabla II.3. Mezcla de reacción para enriquecimiento.

Reactivos	Volúmenes
Solución Hyb (2x)	25.0 μl
Sonda de microsatélites biotinilada (mezcla de oligos en 1 μM c/u)	10.0 μl
Agua desionizada	5.0 μl

Condiciones termales:

1 Ciclo: Desnaturalización _____ 95°C (5 min)

99 Ciclos: Acoplamiento _____ 70°C (5 s)

Temp. Anterior -0.2°C _____ 68.8°C (5 s)

.
50.2°C (5 s)

50°C (10 min)

20 Ciclos: Acoplamiento _____ 50°C (5 s)

Temp. Anterior - 0.5°C _____ 49.5°C (5 s)

.
40°C (5 s)

15°C (10 min)

El ADN se capturó con la ayuda de perlitas paramagnéticas cubiertas con estreptavidina (Dynabeads), la cual presenta afinidad por la biotina acoplada a las sondas microsatélites usadas. El ADN restante no hibridado se eliminó a través de lavados. Se adicionó TLE y se incubó a 95°C (por 5 min), el sobrenadante resultante contenía los fragmentos enriquecidos. A este sobrenadante se le adicionó NaOAc (3M) y EtOH (95%) y se mantuvo a -20°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm (por 10 min.) y se realizó un último lavado con EtOH (70%). El ADN se resuspendió en TLE.

Recuperación de ADN enriquecido

Para la recuperación de ADN enriquecido, se realizaron copias (PCR) (Tabla II.4), con el ADN del paso anterior. Para verificar si se tuvo éxito en la recuperación de ADN, se realizó electroforesis en gel de agarosa (1%).

Tabla II.4. Mezcla de reacción para PCR (25 μ l).

Reactivos	Volúmenes
Solución amortiguadora para Taq (10x)	2.5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1.05 μ l
dNTP's (2.5 mM c/u)	0.5 μ l
SuperSNX-24 (10 μ M)	1.25 μ l
Agua desionizada	17.575 μ l
Taq polimerasa (5 u/ μ l)	0.125 μ l
ADN	2.0 μ l

Condiciones termales:

1 ciclo: Desnaturalización inicial _____ 95°C (2 min)

30 ciclos: Desnaturalización _____ 95°C (20 s)

Temperatura de acoplamiento _____ 60°C (20 s)

Extensión _____ 72°C (1 min)

1 ciclo: Extensión final _____ 72°C (15 min)

15°C (10 min)

Ligación de ADN enriquecido dentro de plásmidos

El ADN enriquecido se incorporó dentro de un vector de clonación (pCR[®] 4-TOPO), siguiendo exactamente los pasos del Kit TOPO-TA de clonación (Invitrogen).

Transformación del ADN plasmídico

Se incorporó el ADN enriquecido junto con el vector de clonación dentro de una bacteria hospedero. Las bacterias eran sensibles a la ampicilina y los vectores portaban el gen que confiere resistencia a la ampicilina. Para esto se utilizó el Kit TOPO-TA de clonación (Invitrogen). Las clonas de bacterias se llevaron a crecimiento durante toda la noche a 37°C.

PCR de clonas positivas

Se picaron 30 clonas y se realizó una PCR con el ADN de las bacterias (Tabla II.5). Después de la PCR se verificaron los *insertos* mediante electroforesis en geles de agarosa (1%). Las muestras que presentaron el tamaño esperado (*insertos* de 500-1000 pb) fueron sometidas a un “dot blot” y aquellas clonas que dieron señal positiva se mandaron a secuenciar.

Tabla II.5. Mezcla de reacción de PCR (25 μ l).

Reactivos	Volúmenes
Solución amortiguadora para Taq (10x)	2.5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	1.05 μ l
dNTP's (2.5 mM c/u)	0.75 μ l
Primer M13 F (5 μ M)	0.5 μ l
Primer M13 R (5 μ M)	0.5 μ l
Agua desionizada	16.45 μ l
Taq polimerasa (5u/ μ l)	0.25 μ l
ADN de bacterias	3.0 μ l

F; Forward, R; Reverse.

Condiciones termales:

1 ciclo: Desnaturalización inicial _____ 95°C (5 min)

40 ciclos: Desnaturalización _____ 94°C (1 min)

Temperatura de acoplamiento _____ 50°C (1 min)

Extensión _____ 72°C (1.3 min)

1 ciclo: Extensión final _____ 72°C (4 min)

15°C (10 min)

Secuenciación

Los productos amplificados de las clonas positivas fueron purificados por la compañía Macrogen (Corea) y secuenciados en un secuenciador automático ABI PRISM 3730XL. De cada clona se obtuvieron las secuencias en ambos sentidos, utilizando los iniciadores T3 y T7 promotor.

Diseño de Iniciadores

Las secuencias de las clonas fueron alineadas y depuradas (utilizando los cromatogramas en el caso de inconsistencias), mediante el uso del programa Chromas Pro (Ver. 1.34). Una vez que se obtuvieron las secuencias consenso se diseñaron iniciadores específicos mediante el uso de programas como: Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000) y PrimerSelect de DNASTAR (Burland, 2000).

Apéndice III

Iniciadores para microsatélites de *Haliotis corrugata*.

Loci	Motivo de repetición	Iniciadores (5' - 3')	Tamaño (pb)
<i>Hco5</i>	(GT) ₄	F: GTCATGAGTTTGGCGTGTGT R: ATGCTGGGAGAGTGTGATCC	173
<i>Hco6</i>	(CA) ₁₂	F: CCACGCACATACCAAACACA R: AAGGAGGCAGTGGTGTCAAA	224
<i>Hco8</i>	(TCAC) ₁₄	F: GTGTGAAGCCCATTCTGTGT R: ACAAGGGGTGTGATTCTGCT	174
<i>Hco9</i>	(TG) ₈ (CGTG) ₃ (TG) ₆ (CGTG) ₂ (TG) ₃	F: ATCGCGTCCAAGATTATTGC R: GCCCTTGTTTAAGGCCTAGC	158
<i>Hco11</i>	(CAT) ₃	F: ATCCTGCCGAGAAACCTACC R: CAAAATGATGGGGAAACGAT	160
<i>Hco12</i>	(TC) ₃₃	F: CTGTGTTGCCCCCATTTTC R: GCACGTGCATGTAAGCTGTT	191
<i>Hco15</i>	(TCAC) ₆	F: CTGACGCAACCTCCTATGGT R: CTTCTCAGGGCTTTCACAGG	221
<i>Hco15a</i>	(CA) ₄	F: CATCCACCCACCTTACATC R: AGACAGAGGTTGAGGGCAGA	219
<i>Hco16</i>	(TTG) ₄	F: TATCAGGCCTCGATGGCTAC R: TCACGTTATCCATCCGTTCA	212
<i>Hco18</i>	(TCACC) ₃ (TC) ₃ C(TC) ₂	F: TGGACGCGACGTTAAACC R: TGAGAATACATCGGGCATCA	184
<i>Hco19</i>	(TG) ₁₀ (TGCG) ₅ (TG) ₉	F: CGATCCACGCAATTGGGAATA R: CACCGAGTCGTGTGAGCATA	164
<i>Hco21</i>	(CA) ₁₁ (GA) ₂₉	F: ATTGGGATCTGGGTTTCTCA R: TGGCCATAAAGGTCTTCAATACT	201
<i>Hco22</i>	(CTCG) ₃	F: GTCTCTGTCGATCCTCCTT R: CACAACCGTAGGCAATATCA	216
<i>Hco23</i>	(GT) ₄	F: GGGCTTGGTGTGTGTTTC R: CGGTCTAAGTTGCTGATGCT	334
<i>Hco23a</i>	(TGAG) ₄	F: GCATGAGCAACGATCTACGA R: TCCCACATTACGCTTACACG	226
<i>Hco23b</i>	(CCA) ₃	F: GCGATAAGATGCTCGTCTGG R: GGTACGCTGACATTCCGATT	157
<i>Hco26</i>	(GAGT) ₁₀	F: TAGAGGCATGGTTGGGTCAC R: GCTCCGACGGCAAGATATAC	191
<i>Hco31</i>	(CA) ₂₃ C(CA) ₁₉	F: GACGAATTCTGGGAGCATGT R: AGGGATATGGTGGGGAAAGA	265
<i>Hco37</i>	(CA) ₇ TA(CA) ₁₉	F: TCGGCTCGGAGTCAGTTTAC R: CGTCTGCTGTGTACAAAGTGC	241
<i>Hco43</i>	(CA) ₇ CT(CA) ₇ AA(CA) ₆	F: GGTATCTCAGTGAGCTTGAC R: CCTACAATGGACTCCGGTTT	298
<i>Hco44</i>	(TTG) ₃	F: CGAGACCCAGGCTTCTGATA R: GCGTTGATACCTCTGGAAA	248

F; Forward, R; Reverse.

Iniciadores para microsatélites de *Haliotis corrugata* (continuación).

Loci	Motivo de repetición	Iniciadores (5' - 3')	Tamaño (pb)
<i>Hco47</i>	(AC) ₃ (TCAC) ₂ TCAT(TCAC) ₄	F: AGGCTCGCTGACTTGTT R: CCTCAGGCCGAAAATGTTA	229
<i>Hco57</i>	(AC) ₃	F: TGGCTGTTGTGTTGTGAACTAA R: CCACTTGAGCAAACCTTGAGC	189
<i>Hco69a</i>	(AC) ₅	F: AGTGCAGTCGTAAAGTCTCAGC R: TGACCACAATGGGCCTTTAG	193
<i>Hco69b</i>	(CA) ₄	F: GCACGCACACTCTCTCTTCC R: TCCTGGAAACAAACATAGGG	250
<i>Hco72</i>	(TCA) ₃	F: CTGCTAGGATGCCAGACACA R: CACAGAGCCCAGATCTCACA	218
<i>Hco74</i>	(CA) ₄	F: CGCGAGTTCAATCAAACGTA R: CATTCCAGCTACATGACAGCA	207
<i>Hco92</i>	(AT) ₃ (A) ₂ (ATT) ₃	F: GCATCACACACTCCCATCAG R: ACAACAGGTAGCCGACAAGC	205
<i>Hco97a</i>	(CT) ₅ C(CT) ₂	F: CTTCCACCCGCATTGTTT R: CGAGAGAGCGACAGAAAGAC	197
<i>Hco97b</i>	(CT) ₈ CA(CT) ₆	F: TGTCTACCCCTCCCTGTGTC R: AAGGGATATGCAGCGAGAGA	206
<i>Hco97c</i>	(CT) ₂₆ CA(CT) ₂	F: TGCATATCCCTTCTCCAACC R: ATGCAATGAGAGAGCGACAG	167
<i>Hco101</i>	(TG) ₃	F: AGGACGAAAATCCCGAAAAT R: TGACAGAGAGGAGACGCTGA	200
<i>Hco104</i>	(TC) ₂₆	F: GAAAGAACTGGAACATTTGC R: TGATTTACAGGGGCAGG	164
<i>Hco116</i>	(TCAC) ₃	F: CGCTGGTGTGTTTGTGTTGTAG R: GAGTTACATCGCGGTTTTT	188
<i>Hco170</i>	(ACC) ₄	F: CCAAGTAATTCCTGCATGTAACACA R: GGGAGATTGACTGCATCTT	175
<i>Hco171</i>	(CT) ₂₇ TT(CT) ₆	F: GCTACAAAGGCACGATTTG R: TGTGTGTGGACTTGAACAGA	205
<i>Hco175</i>	(TC) ₆ C(CT) ₁₉ (CA) ₅	F: GTGTATATAACATGGGACAC R: ATAGATCACCAGCAACCAAA	193
<i>Hco187</i>	(GAGT) ₃	F: CCATCGGACTGATCATGTTG R: ATTGCTAAAAGCGGCGTAAA	154
<i>Hco194a</i>	(TA) ₆	F: TAAGTCAGGCACCGAAAGT R: TCAGCCGTATAGCAACGAGA	196
<i>Hco194b</i>	(TCAC) ₃	F: CTGGATGTGGCTGGTGAAG R: AGTGGGAAATGACTTGCTGA	222

F; Forward, R; Reverse.

DATOS

Longitudes de concha (mm), en cinco localidades: San Clemente Island (SCI), Isla Cedros (IC), Isla Natividad (IN), La Bocana (LB), y San Juanico (SJ).

Individuo	Localidades					
	SCI	IC		IN	LB	SJ
1	158	156	♀	145	147	150
2	155	168	♀	139	147	131
3		156	♀	136	139	129
4	157	151	♀	142	149	135
5	172	145	♀	162	143	135
6	159	158	♀	149	150	124
7	172	160	♀	152	144	139
8	165	149	♀	148	132	132
9	132	170	♀	151	145	135
10	154	180	♀	141	139	138
11	162	145	♀	145	166	125
12	55	145	♀	139	149	134
13	176	145	♀	155	142	130
14	137	181	♀	144	156	144
15	154	140	♀	145	152	130
16	156	149	♀	151	155	131
17	97	150	♀	144	162	128
18	108	180	♀	145	149	144
19	150	165	♀	159	147	95
20	133	167	♀	148	140	140
21	156	170	♀	156	142	134
22	133	156	♀	141	142	141
23	151	162	♀	136	134	139
24	109	151	♀	142	149	125
25	139	146	♀	151	130	141
26	135	149	♀	151	145	142
27	84	142	♀	146	143	112
28	100	170	♀	152	138	125
29	133	163	♀	139	150	135
30	175	166	♀	143	138	121
31	90	152	♀	145	142	137
32	182	185	♂	150	144	137
33	152	157	♂	138	145	130
34	143	155	♂	157	139	144
35	158	155	♂	146	140	124
36	162	161	♂	136	135	125
37	172	160	♂	141	145	127

Longitudes de concha (mm), en cinco localidades (continuación).

38		150	♂	138	151	126
39	143	159	♂	145	138	128
40	157	151	♂	164	138	107
41	142	150	♂	136	135	107
42	163	171	♂	151	135	140
43	13	152	♂	141	136	101
44	180	153	♂	156	138	138
45	164	168	♂	149	139	135
46		151	♂	154	137	112
47	154	150	♂	145	150	137
48	172	152	♂	142	146	
49	157	153	♂	154	147	
50	112	163	♂	153	142	
51	142	154	♂	150	155	
52		156	♂	144	144	
53	144	145	♂	152	134	
54	120	144	♂	144	147	
55	147	175	♂	150	148	
56	159	141	♂	152	144	
57	162	146	♂	151	140	
58	155	154	♂	142	140	
59	152	177	♂	153	140	
60	142	165	♂	147	142	
61	141	158	♂	160	140	
62	172	161	♂	147	139	
63	159	150	♂	145	153	
64	156	168	♂	146	147	
65	167	150	♂	157	144	
66	192	162	♂	136	149	
67	160	159	♂	142	142	
68	137	150	♂	147	152	
69	120	170	♂	147	145	
70	121	178	♂	142	142	
71	150					
72	135					
73	157					
74	163					

♀, hembra; ♂, macho.

Frecuencias alélicas de *Haliotis corrugata* en cinco localidades, con siete microsatélites: San Clemente Island (SCI), Isla Cedros (IC), Isla Natividad (IN), La Bocana (LB), y San Juanico (SJ).

Locus/ Alelo (pb)	Localidades				
	SCI	IC	IN	LB	SJ
<i>Hco15</i>					
(n)	(48)	(47)	(48)	(48)	(48)
196	0.031	0.021	0.052	0.010	0.042
200	–	0.011	0.010	0.010	0.010
203	–	0.043	0.083	0.031	0.094
204	0.031	–	0.031	–	–
205	–	0.011	–	–	–
206	–	–	–	–	0.010
208	–	–	–	0.010	–
210	–	–	–	0.010	–
212	–	–	–	0.021	–
213	–	–	0.010	0.010	–
214	0.010	–	–	0.010	–
215	–	0.011	–	–	–
217	0.010	0.043	0.010	0.042	0.021
218	0.177	0.117	0.146	0.135	0.125
222	0.635	0.596	0.552	0.573	0.531
224	–	0.085	0.031	0.010	0.031
226	0.073	–	0.042	–	0.031
230	0.010	–	0.010	0.031	0.031
234	0.010	0.011	–	0.042	0.010
235	–	0.032	0.010	0.021	0.010
237	–	0.011	–	–	–
238	–	–	–	–	0.010
241	–	–	–	–	0.010
242	–	–	0.010	0.010	0.010
244	–	–	–	0.010	–
250	0.010	–	–	–	–
253	–	–	–	–	0.021
264	–	0.011	–	0.010	–

Frecuencias alélicas de *Haliotis corrugata* en cinco localidades (continuación).

<i>Hco16</i>					
(n)	(48)	(48)	(48)	(48)	(48)
209	0.583	0.677	0.635	0.573	0.635
212	0.313	0.229	0.198	0.313	0.271
228	–	–	0.010	0.010	–
231	–	0.010	0.010	0.010	0.010
234	0.042	–	0.021	0.010	0.021
237	0.063	0.042	0.073	0.063	0.052
240	–	0.042	0.042	0.010	0.010
243	–	–	0.010	0.010	–
<i>Hco19</i>					
(n)	(48)	(47)	(48)	(48)	(48)
152	–	0.043	–	–	–
156	–	0.032	0.021	0.021	0.031
158	0.010	–	–	–	–
160	0.125	0.021	0.052	0.031	0.031
162	0.021	0.021	0.063	0.073	0.042
164	0.198	0.117	0.094	0.073	0.042
166	0.115	0.245	0.292	0.219	0.313
168	0.104	0.096	0.052	0.125	0.167
170	0.052	0.085	0.125	0.104	0.063
172	0.135	0.128	0.063	0.052	0.021
174	0.083	0.075	0.052	0.073	0.073
176	0.010	0.032	0.042	0.010	0.042
178	0.010	0.032	0.052	0.052	0.073
180	–	0.011	0.010	0.063	0.021
182	0.010	0.011	0.031	0.010	–
184	–	–	0.010	–	0.010
186	0.021	–	–	0.010	0.010
190	0.031	0.011	0.021	0.010	–
192	–	–	–	0.010	–
196	0.052	0.021	–	0.010	0.010
198	0.021	–	0.010	–	–
200	–	0.011	0.010	0.031	–
204	–	0.011	–	–	0.010
208	–	–	–	–	0.042
219	–	–	–	0.010	–
221	–	–	–	0.010	–

Frecuencias alélicas de *Haliotis corrugata* en cinco localidades (continuación).

<i>Hco22</i>					
(n)	(46)	(47)	(48)	(48)	(48)
212	0.587	0.436	0.385	0.385	0.385
217	0.239	0.202	0.229	0.250	0.271
221	0.044	0.075	0.031	0.073	0.021
223	0.130	0.287	0.354	0.292	0.323
<i>Hco97</i>					
(n)	(47)	(48)	(48)	(47)	(48)
175	0.170	0.146	0.104	0.149	0.115
193	–	–	–	0.011	–
199	–	–	0.010	–	–
200	0.021	–	0.010	0.032	0.042
201	0.734	0.771	0.729	0.745	0.729
202	–	–	0.010	–	–
204	0.032	0.010	0.031	–	0.021
205	0.011	0.042	0.073	0.053	0.052
207	0.011	0.010	0.031	–	–
209	0.021	0.010	–	0.011	0.021
212	–	0.010	–	–	0.021
<i>Hco194</i>					
(n)	(47)	(47)	(48)	(45)	(48)
196	0.106	0.255	0.208	0.200	0.302
198	0.894	0.745	0.792	0.800	0.698
<i>Hka56</i>					
(n)	(48)	(48)	(48)	(48)	(48)
239	–	0.021	0.010	0.010	0.021
240	–	–	0.031	–	–
242	0.167	0.281	0.219	0.323	0.271
244	0.813	0.667	0.708	0.625	0.635
254	–	0.031	–	0.042	0.063
256	0.021	–	0.031	–	0.010

pb, pares de bases; n, tamaño de muestra.

Frecuencias alélicas de *Haliotis corrugata* en El Riíto y La Bocana, con ocho microsatélites. Juv. tot.; Juveniles de todas las tallas, Juv. gpo; Juveniles de un grupo de edad. Las frecuencias de los loci *Hco19* y *Hco97* fueron ajustadas a la presencia de alelos nulos.

Locus	El Riíto			La Bocana		
	Adultos	Juv. tot.	Juv.gpo. I	Adultos	Juv. tot.	Juv. gpo. II
<i>Hco15</i>						
(n)	(31)	(47)	(33)	(48)	(56)	(37)
188	–	–	–	–	0.009	–
190	0.016	–	–	–	–	–
192	–	–	–	–	0.009	0.014
196	–	0.021	0.030	0.010	0.009	–
200	–	0.043	0.030	0.010	0.027	0.014
203	0.048	0.043	0.045	0.031	0.036	0.041
204	–	–	–	–	0.009	0.014
208	–	–	–	0.010	–	–
209	–	0.011	0.015	–	–	–
210	–	–	–	0.010	–	–
212	–	–	–	0.021	–	–
213	–	–	–	0.010	0.009	–
214	0.032	0.011	0.015	0.010	–	–
217	0.016	–	–	0.042	0.018	0.027
218	0.145	0.149	0.076	0.135	0.125	0.108
220	–	–	–	–	0.009	0.014
222	0.581	0.617	0.682	0.573	0.580	0.649
223	0.016	–	–	–	–	–
224	0.048	0.011	0.015	0.010	0.018	0.027
226	0.048	0.021	0.030	–	0.063	0.027
230	0.016	–	–	0.031	–	–
234	0.032	0.032	0.015	0.042	0.018	0.014
235	–	0.011	0.015	0.021	–	–
237	–	–	–	–	0.009	–
241	–	–	–	–	0.009	0.014
242	–	–	–	0.010	–	–
244	–	0.021	0.030	0.010	–	–
248	–	–	–	–	0.009	–
250	–	–	–	–	0.018	0.014
251	–	–	–	–	0.009	0.014
253	–	–	–	–	0.009	0.014
259	–	0.011	–	–	–	–
264	–	–	–	0.010	–	–

Frecuencias alélicas de *Haliotis corrugata* en El Riíto y La Bocana (continuación).

<i>Hco16</i>						
(<i>n</i>)	(33)	(52)	(35)	(48)	(58)	(37)
209	0.606	0.606	0.586	0.573	0.629	0.649
212	0.303	0.250	0.271	0.313	0.293	0.297
228	–	–	–	0.010	0.009	0.014
231	–	0.019	0.029	0.010	0.009	–
234	0.015	0.010	0.014	0.010	0.017	0.027
237	0.076	0.067	0.043	0.063	0.034	0.014
240	–	0.038	0.043	0.010	–	–
243	–	0.010	0.014	0.010	0.009	–
<i>Hco19</i>						
(<i>n</i>)	(40)	(49)	(34)	(48)	(55)	(37)
152	–	–	–	–	0.009	0.014
154	–	0.031	–	0.010	0.018	–
156	0.013	–	–	0.021	0.009	–
158	–	0.020	0.029	–	–	–
160	0.025	0.031	0.029	0.031	0.045	0.054
162	0.013	0.051	0.059	0.073	0.055	0.027
164	0.113	0.082	0.103	0.073	0.073	0.068
166	0.250	0.214	0.206	0.208	0.282	0.311
168	0.088	0.153	0.191	0.125	0.109	0.108
170	0.150	0.061	0.074	0.104	0.091	0.108
172	0.088	0.122	0.118	0.052	0.064	0.027
174	0.113	0.092	0.074	0.073	0.082	0.081
176	–	0.031	0.029	0.010	0.055	0.054
178	0.038	0.031	0.044	0.052	0.036	0.041
180	–	0.010	–	0.063	–	–
182	0.013	0.010	–	0.010	0.027	0.041
184	0.025	0.010	–	–	–	–
186	0.013	0.010	0.015	0.010	0.009	0.014
188	0.013	0.010	–	–	–	–
190	–	–	–	0.010	–	–
192	–	–	–	0.010	0.009	0.014
196	0.025	0.010	–	0.010	–	–
200	0.025	0.010	0.015	0.031	0.009	0.014
204	–	0.010	0.015	–	–	–
212	–	–	–	–	0.018	0.027
219	–	–	–	0.010	–	–
221	–	–	–	0.010	–	–

Frecuencias alélicas de *Haliotis corrugata* en El Riito y La Bocana (continuación).

<i>Hco22</i>						
(n)	(38)	(57)	(35)	(48)	(57)	(37)
212	0.395	0.482	0.457	0.385	0.360	0.392
217	0.276	0.193	0.214	0.250	0.289	0.297
221	0.039	0.035	0.057	0.073	0.035	0.014
223	0.289	0.289	0.271	0.292	0.316	0.297
<i>Hco97</i>						
(n)	(33)	(46)	(32)	(47)	(56)	(37)
175	0.136	0.130	0.156	0.149	0.152	0.149
193	–	–	–	0.011	–	–
197	–	–	–	0.053	–	–
199	–	–	–	–	0.009	–
200	0.030	0.043	0.047	0.032	0.027	0.027
201	0.697	0.717	0.688	0.691	0.714	0.716
204	0.015	–	–	–	0.009	–
205	0.030	0.065	0.047	0.053	0.063	0.081
207	0.045	0.011	0.016	–	0.009	–
209	–	0.011	0.016	0.011	0.009	0.014
210	0.015	–	–	–	0.009	0.014
212	0.015	0.011	0.016	–	–	–
213	–	0.011	0.016	–	–	–
225	0.015	–	–	–	–	–
<i>Hco194</i>						
(n)	(29)	(52)	(35)	(45)	(55)	(35)
196	0.155	0.240	0.229	0.200	0.218	0.243
198	0.845	0.750	0.757	0.800	0.764	0.743
200	–	0.010	0.014	–	0.018	0.014
<i>Hka56</i>						
(n)	(32)	(48)	(33)	(48)	(55)	(37)
239	0.031	0.010	0.015	0.010	0.027	0.027
240	0.063	–	–	–	0.009	0.014
242	0.250	0.302	0.333	0.323	0.327	0.324
244	0.625	0.667	0.636	0.625	0.600	0.622
254	0.031	0.010	–	0.042	0.018	0.014
256	–	0.010	0.015	–	0.018	–

Frecuencias alélicas de *Haliotis corrugata* en El Riíto y La Bocana (continuación).

<i>Hka3</i>	(30)	(42)	(32)	(48)	(57)	(37)
(n)						
195	–	–	–	–	0.009	0.014
208	–	–	–	–	0.009	0.014
214	–	–	–	0.010	–	–
215	–	0.012	0.016	–	–	–
217	–	–	–	0.010	–	–
220	–	–	–	–	0.018	–
223	–	–	–	0.010	0.009	0.014
225	–	0.012	0.016	–	–	–
226	–	0.024	0.016	0.021	–	–
229	0.017	–	–	–	–	–
231	–	–	–	0.031	0.009	0.014
232	0.017	0.012	0.016	–	–	–
233	–	–	–	0.010	0.026	0.014
234	0.017	–	–	–	–	–
235	–	0.012	–	0.042	0.026	0.027
236	0.017	0.012	0.016	–	0.009	–
237	0.050	0.012	0.016	–	0.035	0.041
238	0.033	–	–	0.010	0.009	0.014
239	–	0.024	0.016	0.010	–	–
241	–	0.012	0.016	0.031	0.026	0.041
242	0.017	0.012	–	–	0.035	–
243	0.017	0.024	0.031	0.021	0.018	0.014
244	–	–	–	0.010	0.018	0.027
245	0.017	–	–	0.031	–	–
246	0.050	0.012	–	–	–	–
247	0.017	–	–	–	0.018	–
248	0.033	–	–	0.052	0.018	0.027
249	0.033	0.060	0.063	0.010	0.009	0.014
250	0.033	0.060	0.063	0.010	0.026	0.041
251	0.017	–	–	0.010	0.018	0.027
252	0.017	0.024	0.016	–	0.044	0.054
253	0.017	–	–	0.031	0.026	0.027
254	0.100	0.024	0.031	–	0.009	0.014
255	–	0.012	0.016	0.031	–	–
256	–	–	–	–	0.009	0.014
257	0.033	0.024	0.031	0.042	0.026	0.014
258	0.050	0.012	–	–	0.009	–
259	0.017	0.060	0.078	–	0.009	0.014
260	–	0.012	0.016	0.021	0.009	–
261	–	–	–	0.021	–	–
262	–	0.012	–	0.031	0.009	–

Frecuencias alélicas de *Haliotis corrugata* en El Riíto y La Bocana (continuación).

263	0.017	–	–	0.010	0.009	0.014
264	0.017	0.024	0.031	0.010	0.026	0.014
265	0.017	0.024	0.016	0.010	0.018	0.027
266	0.033	0.024	0.031	–	–	–
267	0.033	0.012	0.016	–	–	–
268	–	0.024	0.016	0.010	0.018	–
269	–	–	–	–	0.026	0.027
270	0.017	–	–	0.010	0.009	0.014
271	0.017	0.024	0.016	0.010	0.018	0.027
272	–	–	–	–	0.018	0.027
273	–	0.012	0.016	0.042	0.009	–
274	–	0.012	0.016	0.010	0.009	0.014
275	–	–	–	0.052	0.009	0.014
276	0.017	0.012	0.016	–	–	–
277	–	0.012	0.016	–	0.026	0.041
278	–	0.024	0.016	0.031	0.026	0.014
279	–	–	–	0.010	0.018	–
280	0.017	0.024	0.016	0.021	0.026	0.041
281	–	0.012	0.016	0.021	–	–
282	–	0.024	0.016	–	–	–
283	–	–	–	0.010	0.018	–
284	–	0.012	0.016	–	0.018	0.014
285	–	0.012	0.016	–	0.018	0.027
286	–	0.060	0.063	0.031	–	–
287	0.017	–	–	–	0.018	–
288	–	0.012	0.016	0.031	0.026	0.027
289	0.017	–	–	0.021	0.018	0.014
291	0.017	–	–	–	–	–
292	0.017	–	–	–	0.009	0.014
293	–	0.024	0.031	–	0.009	–
294	0.033	0.012	0.016	–	0.018	0.027
295	–	–	–	–	0.018	0.027
296	–	–	–	0.010	–	–
297	–	–	–	0.010	–	–
298	–	–	–	–	0.009	0.014
299	–	0.012	0.016	–	–	–
300	–	0.024	0.031	0.010	0.026	0.041
301	–	–	–	0.010	0.009	0.014
302	–	0.012	0.016	0.010	–	–
303	0.017	–	–	0.010	–	–
305	–	–	–	0.021	–	–
306	–	0.012	0.016	–	0.009	–
307	–	0.012	0.016	–	–	–

Frecuencias alélicas de *Haliotis corrugata* en El Riíto y La Bocana (continuación).

308	–	0.012	0.016	–	–	–
310	–	–	–	0.021	–	–
311	–	–	–	–	0.009	0.014
313	0.017	0.012	–	–	–	–
314	0.017	–	–	–	–	–
315	–	0.012	–	0.010	–	–
318	0.033	–	–	–	–	–
319	–	–	–	0.010	–	–
323	–	–	–	0.010	–	–
328	–	–	–	–	0.009	0.014
330	–	–	–	0.010	–	–
338	–	0.012	–	–	–	–
344	–	0.012	0.016	–	–	–
363	–	–	–	–	0.009	0.014
375	0.017	–	–	–	–	–

pb, pares de bases; *n*, tamaño de muestra.

Genotipos multilocus de juveniles de *H. corrugata*, asignados en el análisis de parentesco de El Riío.

Individuo	Genotipos									
	<i>Hco15</i>	<i>Hco16</i>	<i>Hco19</i>	<i>Hco22</i>	<i>Hka56</i>					
Juvenil 27	222	222	209	237	164	172	212	221	242	242
ACM101	222	223	212	237	160	172	212	217	242	242
ASM19	218	222	209	212	164	196	221	223	242	242
Juvenil 29	203	222	209	209	166	172	212	223	244	244
ACM11	222	222	209	209	166	166	212	223	242	244
ACM120	203	203	209	209	166	172	212	212	242	244
Juvenil 30	222	222	209	209	164	168	212	217	244	244
ACM90	214	222	209	209	168	170	212	212	244	244
ACM95	217	222	209	209	164	174	217	223	244	244
Juvenil 35	222	222	209	212	168	170	217	223	244	244
ACM3	222	222	209	212	170	188	217	217	242	244
ACM59	222	224	209	209	168	170	223	223	244	244
Juvenil 40	222	222	209	212	166	170	217	223	244	244
ACM11	222	222	209	209	166	166	212	223	242	244
ACM3	222	222	209	212	170	188	217	217	242	244
Juvenil 51	218	222	209	209	170	178	212	212	242	244
ACM28	222	222	209	209	178	182	212	212	242	244
ASM18	203	218	209	209	166	170	212	223	240	244
Juvenil 55	222	222	209	212	166	200	212	217	244	244
ACM61	222	222	209	212	166	174	212	212	244	244
ACM96	222	222	209	209	162	200	212	217	244	254

ACM, Adulto con marca; ASM, Adulto sin marca.