



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**ESTRUCTURA POBLACIONAL EN LA MEDUSA  
BOLA DE CAÑÓN (*Stomolophus meleagris*) EN EL  
NOROESTE DE MÉXICO MEDIANTE ANÁLISIS  
DE MICROSATÉLITES**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

( Orientación **Biología Marina** )

P r e s e n t a

**LEANDRO NICOLÁS GETINO MAMET**

La Paz, Baja California Sur, **Febrero** de **2016**

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 14 horas del día 11 del Mes de Febrero del 2016, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

### "ESTRUCTURA POBLACIONAL EN LA MEDUSA BOLA DE CAÑÓN (*Stomolophus meleagris*) EN EL NOROESTE DE MÉXICO MEDIANTE ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES"

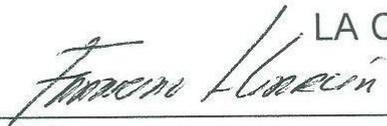
Presentada por el alumno:

#### Leandro Nicolás Getino Mamet

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MARINA

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

#### LA COMISIÓN REVISORA



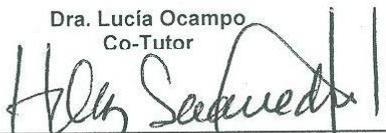
Dr. Francisco García de León  
Director de Tesis



Dr. Ricardo Pérez Enríquez  
Co-Tutor



Dra. Lucía Ocampo  
Co-Tutor



Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

## **COMITÉ TUTORIAL**

Dr. Francisco Javier García de León

Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz, B.C.S.

Dr. Ricardo Pérez Enríquez

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz, B.C.S.

Dra. Lucía Ocampo

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz, B.C.S.

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dr. Francisco Javier García de León

Dr. Ricardo Pérez Enríquez

Dra. Lucía Ocampo

## **JURADO EN EXAMEN DE GRADO**

Dr. Francisco Javier García de León

Dr. Ricardo Pérez Enríquez

Dra. Lucía Ocampo

## **SUPLENTE**

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

## RESUMEN

Los procesos de diferenciación genética poblacional en el Golfo de California y la región han sido estudiados para una amplia gama de especies con ciclos de vida diversos, sin embargo la forma en que las poblaciones se estructuran no es homogénea para todas las especies, sino que la misma depende de una combinación de aspectos como el ciclo de vida o factores ambientales. Dentro de este contexto se estudió la diversidad genética de la medusa bola de cañón, *Stomolophus meleagris*, una especie meroplanctónica distribuida en aguas poco profundas y templadas de América. En México esta especie se encuentra bajo una explotación pesquera recientemente establecida, pero no existen estudios de variabilidad genética, los cuales son cruciales para el manejo sustentable y la conservación de la especie. El objetivo del presente trabajo fue la caracterización genética de la medusa bola de cañón en el noroeste de México utilizando análisis de microsatélites a fin de determinar su variabilidad genética y estructura poblacional. Se recolectaron individuos en el océano Pacífico del norte de México, cuatro al interior del Golfo de California, y uno en la costa externa de la Península de Baja California. Se genotipificaron nueve *loci* microsatélite y se realizaron análisis de diversidad y estructura genética poblacional. Se utilizaron diferentes aproximaciones para estudiar los niveles de diversidad genética por un lado ( $N_a$ ,  $H_o$ ,  $H_e$ ), y la estructura genética poblacional por el otro (AMOVA,  $F_{ST}$ , STRUCTURE, DAPC). Los análisis revelaron una la mayor diversidad genética en el Golfo de Santa Clara y mínima en Mulegé. Se detectó que el número más probable de poblaciones es cinco, con un nivel de diferenciación promedio elevado ( $F_{ST} = 0.17$ ). El Golfo de Santa Clara resultó la localidad más divergente. Estos resultados se discuten bajo diferentes perspectivas, como el ciclo de vida de la especie, procesos oceanográficos y la historia geológica de la región. La información generada representa un aporte al estudio de la diversidad genética en el Golfo de California y la región. Así mismo es el primer antecedente genético para *S. meleagris* bajo una perspectiva poblacional, información que puede y debe ser considerada para regular de forma correcta a la explotación de la especie.

**Palabras clave:** *Stomolophus meleagris*; microsatélites; estructura poblacional.

## ABSTRACT

Population genetics in the Gulf of California has been studied for a wide range of species, however patterns found in population structure is not homogenous for every species because they depend on a variety of different factors, as life cycle or evolutionary history. Based on this context we studied the genetic diversity of the cannonball jellyfish, *Stomolophus meleagris*, a meroplanktonic species distributed in shallow warm waters of America. In Mexico this species is under a recent established fishery and there are no studies of genetic variability that are crucial for its conservation and sustainable management. The aim of this study was to genetically characterize the cannonball jellyfish in northwestern Mexico, using microsatellite analysis to determine its genetic variability and population structure. Individuals were collected from the Pacific ocean of northern Mexico; four locations within the Gulf of California and one in the outer coast of the Peninsula of Baja California. Nine microsatellite *loci* were genotyped to analyze the genetic diversity and population structure. Different approaches were used to evaluate genetic diversity ( $N_a$ ,  $H_o$ ,  $H_e$ ) and population structure (AMOVA,  $F_{ST}$ , STRUCTURE, DAPC). The results revealed significant differentiation among all locations (average  $F_{ST} = 0.17$ ), with five distinct populations. The maximum differentiation and diversity was found at Gulf of Santa Clara. Mulege also presented a large differentiation degree, but had the smallest diversity. These results were discussed from different perspectives, such as the life cycle of the species, oceanographic processes and the geological history of the region. This thesis is a contribution to the study of genetic diversity in the Gulf of California. It also represents the first genetic study for *S. meleagris* under a population perspective, which should be properly considered to regulate its fishery.

**Palabras clave:** *Stomolophus meleagris*; microsatélites; population structure.

## DEDICATORIA

*A la Baja, su Mar, su gente tan linda, y todas sus bondades que tuve el privilegio de vivir...*

## AGRADECIMIENTOS

A las instituciones que posibilitaron la realización de mi trabajo. A CONACyT, por el otorgamiento de la beca de manutención (Reg. 301916), y al CIBNOR por ser la institución en la cual se me permitió llevar a cabo los estudios y darme la formación necesaria, así como por apoyo otorgado.

Al proyecto “*Molecular taxonomy and population genetics of a species targeted by fisheries: the edible cannonball jellyfish (Stomolophidae)*” (liderado por el Dr. FJ García de León y el Dr. MN Dawson) por los fondos necesarios, financiado por el Instituto de la Universidad de California para México y los Estados Unidos (UC MEXUS) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT).

Al Dr. Francisco García de León, Paco, por introducirme al mundo de la genética de poblaciones y todos los conocimientos adquiridos de su parte durante mi formación, pero principalmente por haberme dado la oportunidad de venir a realizar esta experiencia en México.

A mis Co-Tutores, el Dr. Ricardo Pérez Enríquez y la Dra. Lucía Ocampo, por todos los consejos que contribuyeron a mejorar el presente trabajo. También a Liza por estar siempre predispuesta a contestar las dudas y colaborar con lo que fuese necesario.

Al grupo humano que forma GenCon, Tania, Ricardo, Cris, Caro, Cari, David, Sara, Fausto, Pau, Dona, Miguel y todos mis compañeros del labo que estuvieron siempre para darme una mano con lo que necesité, desde los trueques de reactivos, ayuda en el laboratorio hasta los análisis y programas, ayuda sin la que me hubiese sido imposible realizar el trabajo. A Paty quién llevó a cabo las gestiones necesarias para acelerar los tiempos de llegada de reactivos sin los que no podría haber finalizado.

A todos mis amigos de la generación, esa segunda familia que se elige, por todos los momentos compartidos y vividos que hicieron tan ameno el paso por esta etapa, tan necesario para mantenerse cuerdo en el proceso.

A todos los amigos que están lejos pero a la vez están, siempre.

A Jessie, por estar conmigo, darme todo su apoyo, paciencia y aguantarme durante todo este proceso.

A mi Familia, por su apoyo incondicional en este y todos los emprendimientos, por estar siempre.

Muchas gracias!

## CONTENIDOS

RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABLAS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 La medusa bola de cañón.....	3
2.2 Los estudios genéticos en medusas .....	7
2.3 Variación genética en la región.....	8
2.4 El Golfo de California .....	12
3. JUSTIFICACIÓN .....	14
4. HIPÓTESIS .....	16
5. OBJETIVOS .....	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos particulares .....	16
6. MÉTODOS .....	17
6.1 Área de estudio y obtención de las muestras .....	17
6.2 Aislamiento y caracterización de 12 <i>loci</i> microsatélite .....	18
6.3 Extracción de ADN .....	20
6.4 Genotipificación de 12 <i>loci</i> microsatélite .....	22
6.4.1 Amplificación mediante PCR.....	22
6.4.2 Visualización en 3500 Genetic Analyzer .....	22
6.5 Análisis estadísticos.....	24
6.5.1 Calidad y utilidad de marcadores .....	24
6.5.2 Estructura genética .....	28
7. RESULTADOS .....	32
7.1 Extracción de ADN .....	32
7.2 PCR y genotipificación.....	33
7.3 Análisis estadísticos.....	34
7.3.1 Calidad y utilidad de marcadores .....	34
7.3.2 Estructura genética .....	41
8. DISCUSIÓN .....	48
8.1 Calidad y utilidad de los marcadores .....	48

8.2 Diversidad Genética .....	52
8.3 Estructura poblacional .....	54
8.3.1 Diferenciación en el Golfo de Santa Clara .....	58
8.3.2 Diferenciación en Mulegé .....	60
8.3.4 Diferenciación de Guaymas, Bahía La Paz y Bahía Magdalena .....	61
9. CONCLUSIONES.....	62
10. LITERATURA CITADA.....	64
ANEXO I: Calibración entre ABI PRISM 310 y ABI 3500 <i>Genetic Analyzer</i> .....	73
ANEXO II: Electroferogramas obtenidos para los nueve <i>loci</i> utilizados .....	74

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ejemplar de *S. meleagris*, con la morfología típica del Golfo de California. Tomada en playa El Mogote, Bahía de La Paz. *Fotografía: Getino Mamet, LN.* ..... 3
- Figura 2.** Ciclo de vida de la medusa bola de cañón, *S. meleagris*. Tomado de Calder (1982)..... 4
- Figura 3.** Área de estudio: Golfo de Santa Clara (GSC); Guaymas (GUY); Mulegé (MUL); Bahía de La Paz (BAP); Bahía Magdalena (MAG). ..... 18
- Figura 4.** Gráfico de pastel representando el número de *loci* identificados con microsatélites de motivos di, tri, tetra, penta y hexanucleotídicos. .... 19
- Figura 5.** Calidad del ADN visualizado en agarosa. Se muestra la calidad algunos de las extracciones de ADN. La concentración de agarosa fue del 1%, la electroforesis se llevo a cabo a 90V durante 25 minutos. Se utilizó tres  $\mu$ Lde ADN en una proporción 1:1 con RedGel. .... 32
- Figura 6.** Gráficas de  $F_{ST}$  vs Heterocigosidad esperada obtenida a partir de del test de neutralidad utilizando el modelo mutacional IAM. Los puntos negros muestran la ubicación de los nueve *loci*. Las regiones bajo selección positiva, neutra y balanceadora se muestran en blanco, gris claro y negro respectivamente..... 37
- Figura 7.** Promedio del número de alelos por locus en cada localidad..... 38
- Figura 8.** Promedios de heterocigosidad esperada (negro) y observada (en gris) por localidad. Las líneas indican el error estándar. .... 38
- Figura 9.** Gráfico de barras para la frecuencia de alelos privados por localidad y por locus. El rombo negro indica el número de alelos privados detectado por cada localidad. .... 40
- Figura 10.** Gráfico de  $\Delta K$  en función del número de grupos genéticos que integra las 20 repeticiones..... 43
- Figura 11.** Gráfico de barras de los coeficientes de membresía de los individuos obtenido a partir del análisis bayesiano en STRUCTURE para valores de K entre dos y seis. Cada barra vertical representa un individuo con su probabilidad de pertenencia a cada grupo genético. .... 44
- Figura 12.** Representación gráfica de los coeficientes de membresía para cada sitio de muestreo, para K=3 y K=5 . Cada color representa un grupo genético..... 44

- Figura 13.** Mapa del área de estudio, con los resultados obtenidos de STRUCTURE para un  $K=5$ . Los gráficos de pastel indican los coeficientes de identidad poblacional, y el de barras vertical indica los coeficientes de identidad individual (Ver sección Resultados 7.3.2.3 para mayores detalles). ..... 46
- Figura 14.** Análisis Discriminante de Componentes Principales. Se muestran las gráficas de dispersión correspondientes en las tres primeras FD: a) FD1 vs FD2 y b) FD1 vs FD3. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de la varianza explicado por cada una de ellas. En el gráfico c) se muestra el número de individuos pertenecientes a cada localidad que fue asignado a cada grupo. El tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos, indicado encima de cada uno... 47

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Ubicación geográfica de los cinco sitios recolectados, con su respectiva clave, número de muestras y fecha de recolección.....	17
<b>Tabla II.</b> <i>Loci</i> microsatélites utilizados en el trabajo, fluoróforo y secuencia de los iniciadores; el motivo de repetición (con el número de repeticiones entre paréntesis); la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) en °C; y la concentración mili molar de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) y el rango de tamaño esperado. El color del fluoróforo utilizado, VIC (verde), 6-FAM (azul), PET (rojo) y NED (amarillo). .....	21
<b>Tabla III.</b> Concentraciones de reactivos y programa PCR utilizado en las reacciones de PCR. El cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) y la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ), variaron para cada marcador según lo indicado en la Tabla II. ....	22
<b>Tabla IV.</b> Combinaciones de microsatélites corridos conjuntamente (poolplex), y el tamaño esperado para cada uno.....	24
<b>Tabla V.</b> Genotipos faltantes y porcentajes de éxito y error de amplificación. ....	33
<b>Tabla VI.</b> Tasa porcentual de error de genotipificación por locus y por alelo.....	34
<b>Tabla VII.</b> Valores de probabilidad asociada obtenidos a partir de la prueba exacta de Fisher. ....	35
<b>Tabla VIII.</b> Frecuencia de alelos nulos calculada a partir del software FREENA. .	36
<b>Tabla IX.</b> Test de neutralidad utilizando el modelo de mutación por alelos infinitos (IAM) y de mutación por pasos (SMM) .....	37
<b>Tabla X.</b> Parámetros de diversidad genética por locus y sitio de muestreo.....	39
<b>Tabla XI.</b> Número de alelos privados y su frecuencia entre paréntesis, por locus y localidad. ....	40
<b>Tabla XII.</b> AMOVA. Porcentaje de variación a diferentes niveles jerárquicos explicados por el análisis de la varianza molecular en los distintos modelos que se pusieron a prueba. ....	41
<b>Tabla XIII.</b> Valores de $F_{ST}$ calculados con y sin corrección por presencia de alelos nulos.....	42
<b>Tabla XIV.</b> Coeficientes de $\phi$ membresía para cada sitio de muestreo, para un valor $K=5$ grupos genéticos obtenidos a partir de STRUCTURE. ....	45

<b>Tabla XV.</b> Rango de heterocigosidad observada por locus y localidad en el presente trabajo, así como otros trabajos realizados sobre medusas, utilizando microsatélites. ....	53
---	----

## 1. INTRODUCCIÓN

Si bien las bases teóricas de la genética de poblaciones tienen origen en principios del siglo pasado, no es sino hasta las últimas tres décadas que se consiguieron los avances tecnológicos necesarios para su estudio empíricamente. Con el advenimiento de las técnicas de PCR, más recientemente de secuenciación masiva y el poder computacional actual, se tiene acceso a datos que permiten comprender la variabilidad genética colaborando a resolver interrogantes evolutivos y dar bases sólidas e integrales para la conservación y manejo de los recursos naturales.

La conservación desde el punto de vista genético, consiste en evitar la pérdida de la diversidad genética, para lo que primero es necesario conocer el estado de las poblaciones. El concepto de población es un aspecto central en trabajos de ecología, biología evolutiva o conservación; por ello existe una amplia gama de definiciones. Desde el enfoque de la genética, una población se refiere al conjunto de individuos de una misma especie que poseen capacidad potencial de apareamiento entre sí y que coexisten juntos en el espacio y tiempo (Waples y Gaggiotti, 2006). En aquellas poblaciones que se encuentran diferenciadas en el espacio geográfico, el intercambio genético (flujo genético) es quien modula a la estructuración genética. Si el intercambio es elevado, las poblaciones tendrán una composición genética homogénea; mientras que en caso contrario, en poblaciones con un flujo genético limitado, se producirá una diferenciación. Así, la estructuración genética está fuertemente influenciada por los patrones de intercambio genético entre poblaciones (Schaal *et al.*, 1998).

De entre las diferentes aproximaciones utilizadas para caracterizar e identificar la estructura poblacional, una de las más frecuentemente utilizadas es el análisis de la variabilidad genética mediante marcadores moleculares, como los microsatélites (Carvalho y Pitcher, 1995). Éstos, son fragmentos de ADN formados por repeticiones en *tándem* de secuencias (mono, di, tri, tetra o pentanucleotídicas), con una tasa de mutación elevada que resulta en un alto polimorfismo. A partir del

cálculo de las frecuencias alélicas y mediante la aplicación de una batería de análisis estadísticos sobre estos datos es posible determinar el grado de diferenciación poblacional.

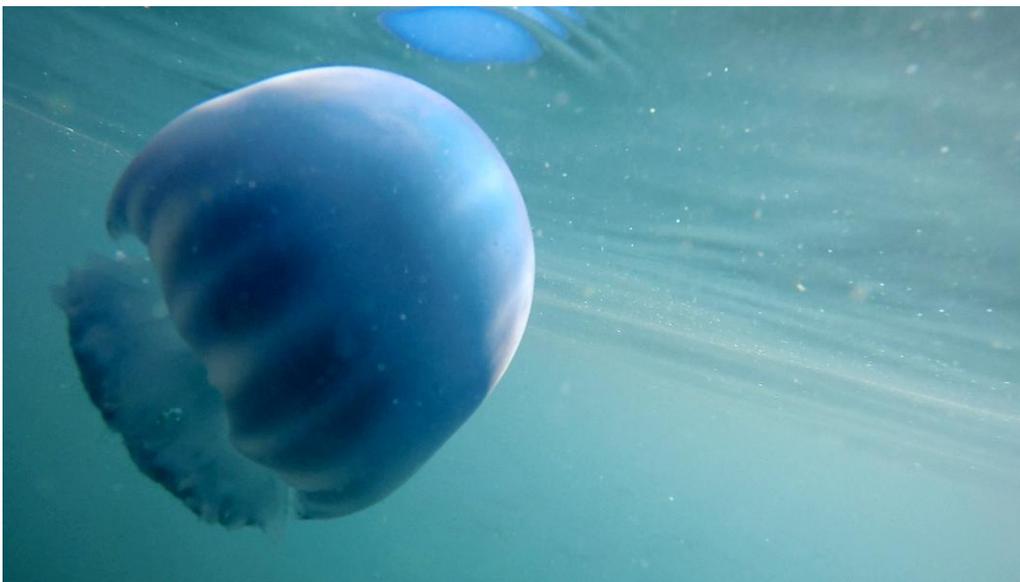
Los avances en técnicas moleculares han posibilitado el estudio de organismos no modelo, como es el caso de la medusa bola de cañón (*Stomolophus meleagris*), una especie de la que se conoce muy poco, existen incertidumbres tanto taxonómicas como en su dinámica poblacional y se encuentra bajo explotación comercial. La explotación de un recurso mediante regulaciones sin un sustento biológico ha demostrado tener consecuencias dramáticas para la diversidad genética de algunas especies (Thorpe *et al.*, 1981; Hauser *et al.*, 2002).

Un factor clave en la formulación de un buen plan de manejo es el conocimiento de la estructura genética poblacional de la especie (concepto fundamental, pero sin atención en los lineamientos expresados en la Carta Nacional Pesquera de México; SAGARPA, 2012), ya que es de crucial importancia para comprender el funcionamiento dinámico de las poblaciones y poder realizar un manejo sustentable optimizando la extracción y minimizando el riesgo de pérdida de diversidad genética. La zona del Noroeste es una región que se encuentra en diferentes etapas en la explotación de la medusa bola de cañón lo que nos coloca en un momento ideal para generar conocimiento científico de los diferentes aspectos de vida de la especie que den lugar a regulación correctamente sustentada. El foco central del presente trabajo es caracterizar la variación genética de la medusa bola de cañón en el Noroeste de México utilizando análisis de microsatélites a fin de determinar su estructura poblacional.

## 2. ANTECEDENTES

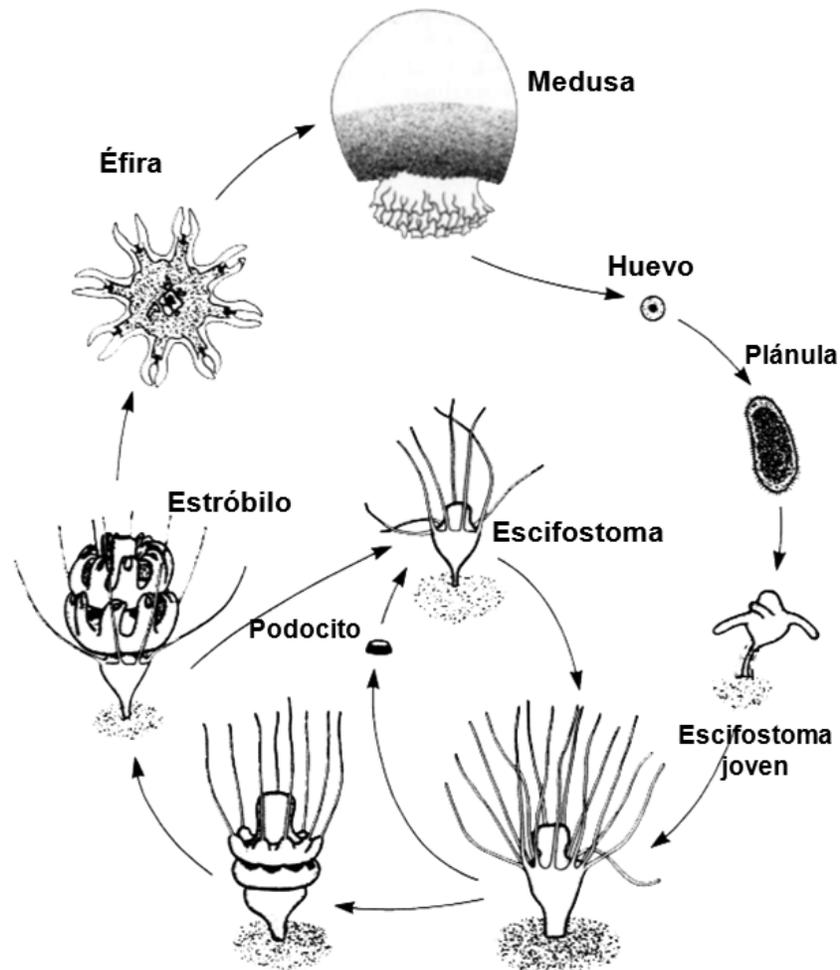
### 2.1 La medusa bola de cañón

La medusa bola de cañón, *Stomolophus meleagris*, es una escifomedusa perteneciente a la familia Stomolophidae. Como su nombre lo indica, presenta una morfología esférica y maciza, destacándose la ausencia de tentáculos y brazos orales fusionados (Figura 1). La dimensión de la mesoglea (campana) alcanza aproximadamente unos 15 cm (López Martínez y Álvarez-Tello, 2013). Si bien la coloración es variable, en el Golfo de California el azul es el más conspicuo, contrastante con el pardo que poseen generalmente en otras regiones, como el Golfo de México. Es una especie que tiene la característica de ser nadadora y depredadora, alimentándose principalmente de zooplancton. La medusa bola de cañón se encuentra distribuida en el océano Atlántico, desde Nueva Inglaterra hasta Brasil y en el océano Pacífico desde el norte de México hasta Ecuador (Kramp, 1961; Hsieh y Rudloe, 1994; Hsieh *et al.*, 1996, 2001; López Martínez y Álvarez-Tello, 2013).



**Figura 1.** Ejemplar de *S. meleagris*, con la morfología típica del Golfo de California. Tomada en playa El Mogote, Bahía de La Paz. *Fotografía: Getino Mamet, LN.*

Al igual que la mayoría de las medusas, *S. meleagris* presenta un ciclo de vida complejo en donde se alterna entre una fase de medusa y una de pólipo, combinando reproducción sexual con asexual. La primera descripción completa del ciclo de vida de la especie fue realizada por Calder (1982), en donde se describen con detalle las características de cada uno de los estadios (Figura 2).



**Figura 2.** Ciclo de vida de la medusa bola de cañón, *S. meleagris*. Tomado de Calder (1982).

El ciclo inicia con la fecundación de un huevo que da origen a una larva plánula, la que nada libremente por unos dos o tres días para luego asentarse en un sustrato duro y dar origen a un pólipo (escifostoma). Este pequeño pólipo (2 mm aproximadamente) desarrolla un estróbilo, el que por un proceso de segmentación

da origen a dos o tres éfiras, las que eventualmente se desarrollarán en medusas, reiniciando el ciclo. Calder (1982) destaca que aproximadamente una semana luego de la estrobilación, el pólipo vuelve a generar un estróbilo que dará origen a nuevas éfiras, aunque esto fue realizado en acuario y se desconoce el número de veces que un pólipo puede estrobilar en condiciones naturales. El ciclo resulta aún más complejo cuando se considera la formación de podocitos, estructuras cónicas de reproducción asexual producidas por el pólipo madre que pueden dar origen a pólipos hijos. Las éfiras son las que dan inicio a la fase de vida pelágica, desarrollándose en las medusas adultas, que poseen sexos separados. Éstas, se reproducen sexualmente para dar origen a las nuevas larvas plánulas que reinician el ciclo. Es importante mencionar que si bien en cautiverio las larvas han demostrado capacidad de vivir hasta por 20 días (Ocampo, *com. pers.*), se cree que en la naturaleza tienen una muy corta longevidad, ya que rápidamente se asientan en el fondo, viviendo en la columna de agua por aproximadamente 3-5 días (Calder, 1982).

Una característica importante que posee la especie es la de presentar explosiones poblacionales (*blooms*) en donde las abundancias son extremadamente altas. Dichas explosiones si bien son mayores de mayo a agosto en el Golfo de California, son de un carácter impredecible (Calder, 1982; Huang, 1988; Carvallo Saucedo *et al.*, 2012; López Martínez y Álvarez-Tello, 2013; Girón-Nava *et al.*, 2015). No se conoce el efecto que la fase de reproducción asexual tiene sobre las explosiones demográficas; si bien hay algunas hipótesis, todavía no hay suficientes datos que permitan sustentar una en particular (Arai, 2008).

La medusa bola de cañón, es una especie perteneciente al orden Rhyzostomae, el cual comprende a las medusas capturadas en forma comercial. Las medusas en general han sido históricamente explotadas desde hace miles de años principalmente por las naciones asiáticas (Omori y Nakano, 2001). Más recientemente, diferentes países se han incorporado a dicha industria con un notable éxito, y el interés por la pesquería de medusas se ha expandido a todo el mundo convirtiéndolas en un importante recurso pesquero, principalmente en

países como Canadá, EEUU, México, Australia o India entre otros (Omori y Nakano, 2001).

En México, los primeros esfuerzos de pesca comercial *S. meleagris* datan de 1999, y el primer permiso de pesca de fomento se otorgó en 2001 en Sinaloa (Mungaray, 2007). El interés en la pesquería de la medusa bola de cañón ha ido en aumento en los últimos años, pasando de menos de 2000 TM en el año 2001, a cerca de 18000 en 2010 (SAGARPA, 2012), y es una actividad que se fortaleció principalmente a lo largo del Golfo de California, en las costas de Baja California, Sonora y Sinaloa (Gomi, 1980; Carvallo Saucedo *et al.*, 2012; López Martínez y Álvarez-Tello, 2013; Padilla-Serrato *et al.*, 2013).

La impredecibilidad de los *blooms* hace difícil el establecimiento de una pesquería formal, y es por ello que la actividad se presenta en forma ocasional. Un interesante ejemplo es el *bloom* ocurrido en 2012 en el Golfo de Santa Clara (región más norteña del Golfo de California), en donde se registró una captura de 20 000 TM y posteriormente a dicho año, no se han registrado nuevamente esos niveles de abundancia (Girón-Nava *et al.*, 2015). Durante los últimos cuatro años, el volumen de captura de este recurso ha registrado un promedio de 14 mil toneladas anuales que son procesadas y empacadas para su comercialización en mercados asiáticos, como la República Popular China, Indonesia, Malasia, Corea, Tailandia y Singapur (SAGARPA, 2012).

Si bien en México aún se encuentra en una etapa inicial de desarrollo, la pesquería de esta especie presenta características que la postulan como una buena candidata para establecerse (Carvallo Saucedo *et al.*, 2012), y es de ahí la importancia de generar planes de manejo y regulación con base en conocimiento científico sólido. La especie fue incluida en 2010 en la Carta Nacional Pesquera de México (SAGARPA, 2012), en donde las medidas de manejo principalmente se enfocan a un control de la pesquería mediante permisos de pesca comercial y tallas mínimas (110 mm de diámetro de campana). Así mismo se priorizan líneas de investigación asociadas a la determinación del ciclo de vida completo; del efecto de la variabilidad interanual sobre la dinámica poblacional del recurso;

localización de las zonas de reclutamiento de pólipos de medusa; estimaciones anuales de biomasa y ampliar los estudios de distribución y abundancia a otras localidades (SAGARPA, 2012), dejando completamente de lado los estudios de su estructura genética.

## **2.2 Los estudios genéticos en medusas**

Los estudios genéticos en medusas se han abordado principalmente desde un punto de vista filogeográfico utilizando diferentes marcadores moleculares, siendo el gen COI (citocromo oxidasa subunidad I) del ADN mitocondrial (ADNmt) el más frecuente. Por ejemplo, (Dawson, 2005) estudió a la medusa mozaico, *Catostylus mosaicus*, en el sudeste de Australia utilizando COI e ITS, en el que encontró una elevada divergencia a una escala geográfica pequeña. Stopar *et al.* (2010) y Ramšak *et al.* (2012) utilizaron los mismos marcadores con un enfoque similar a lo largo de los mares de Europa. Es interesante resaltar que más allá de las diferencias en los ciclos de vida, tanto en *Pelagia noctiluca* como en *Rhizostoma pulmo* se encontró una gran homogeneidad, mientras que *Aurelia spp.* mostró una elevada divergencia en la misma región (Stopar *et al.*, 2010; Ramšak *et al.*, 2012). Y aun más interesante es que *P. noctiluca* presentó homogeneidad genética en el Atlántico Norte, pero divergió en muestras provenientes del Atlántico Sur, en Africa (Miller *et al.*, 2012). Por su parte, la diversidad genética con un enfoque de estructura poblacional ha sido menos estudiada. En un trabajo donde se utilizaron 18 alozimas para estudiar la estructuración genética de *Aurelia aurita* en las costas de Túnez, se encontró homogeneidad genética en una zona relativamente pequeña (Ben Faleh *et al.*, 2009).

Los anteriores ejemplos resaltan dos fenómenos importantes a considerar en estudios de genética de poblaciones de las medusas. Por un lado, la capacidad de dispersión en diferentes etapas de vida y por el otro lado los factores históricos y actuales que limitan o favorecen esa capacidad. Como se mencionó anteriormente, las medusas tienen ciclos de vida complejos y particulares de cada especie, por lo que es esperable que no exista un patrón general de diferenciación

genética, siendo por el contrario, un resultado de una combinación entre factores geográficos, oceanográficos, y sobre todo de la historia de vida, lo que modula la estructura genética. Así mismo, la presencia de corrientes oceanográficas u otras barreras al flujo genético pueden tener una gran injerencia sobre la estructura genética detectada. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la estructura genética que revelan los análisis, no es más que una imagen momentánea de un proceso histórico y dinámico.

Existen pocos estudios que evalúen la diversidad genética en la medusa bola de cañón. Recientemente se desarrolló un proyecto (en el cual se encuentra enmarcada la presente tesis) cuyo principal objetivo fue resolver la incertidumbre taxonómica y la estructura genética de la especie en el noroeste del océano Pacífico mexicano. Se utilizaron secuencias de ADNmt en ejemplares de cuatro localidades distribuidas en el Golfo de California, una en la costa oriental de la Península de Baja California Sur, así como también otras provenientes de El Salvador y del Golfo de México. Los principales resultados muestran que el Golfo de Santa Clara compone un clado diferente al resto del Golfo de California y la costa oriental de la Península de Baja California, posiblemente constituyendo una especie diferente (Gómez Daglio *et al.*, *sin publicar*). Además, ellos no encontraron diferenciación entre las demás localidades del Golfo de California ni en la costa oriental. En el presente trabajo de investigación se pretende estudiar la estructuración genética de la medusa bola de cañón mediante microsatélites por lo que la información generada permitirá definir a una escala fina la estructura genética en la zona del noroeste de México.

### **2.3 Variación genética en la región**

En el Golfo de California, la problemática de la diversidad y estructura genética ha sido estudiada para diferentes especies y los resultados sobre diferenciación genética han sido heterogéneos debido principalmente a los caracteres de la historia de vida de las especies, así como a factores físicos y oceanográficos. Por ejemplo, el camarón, fue estudiado por De la Rosa-Velez *et al.* (2000) quienes

utilizaron 16 alozimas en dos especies de camarón (*Farfantepenaeus californiensis* y *Litopenaeus stylirostris*), recolectados en el Alto Golfo, región media y en la boca (Golfo de Santa Clara, Guaymas y Mazatlán respectivamente). Se encontró que los tres grupos se encuentran diferenciados, siendo el Golfo de Santa Clara el más diferente. Aunque los camarones son capaces de desplazarse (poseen dispersión larval, y de los adultos), las barreras geográficas pueden impedir el movimiento (y el consecuente flujo genético); se atribuyen los resultados a un posible aislamiento debido a las grandes islas (Isla Tiburón e Isla Ángel de la Guarda). Por su parte Lightner y Aubert (2000) utilizaron RAPDs en *L. stylirostris*, y revelaron una estructuración genética más compleja sin alguna concordancia con la distancia geográfica; proponen que las similitudes entre regiones distantes pueden ser atribuidas a las corrientes superficiales que actúan en la fase de dispersión larvaria sin importar las barreras físicas entre los sitios muestreados.

Contrariamente a los resultados en camarón, existen otros invertebrados que han sido estudiados en los que no se encuentra ningún tipo de diferenciación genética en el Golfo de California, a los que se atribuyen esos resultados a la existencia de una fase larvaria prolongada. La liebre de mar californiana, *Aplysia californica*, presentó ese patrón cuando fue estudiada utilizando tres fragmentos RFLP sobre ADN nuclear y un locus microsatélite (Medina y Walsh, 2000). La dispersión larvaria mediada por las corrientes es la causa propuesta mediante la que se previene la diferenciación genética (la larva pelágica llega a durar 35 días). Hurtado *et al.* (2007) trabajaron con secuencias de ADNmt (COI) en las especies de caracoles *Nerita scabricosta* y *N. funiculata* sin encontrar diferenciación alguna en el Golfo de California. Los autores también proponen que la fase de dispersión larvaria extendida que poseen es la causal de la estructura panmíctica encontrada.

Por otra parte, Petersen *et al.* (2010) estudiaron la diferenciación genética para la almeja mano de león, *Nodipecten subnodosus*, en localidades distribuidas a lo largo del Golfo de California, y otras en la costa del océano Pacífico, por fuera de la península. Utilizando 10 *loci* microsatélite, ellos no encuentran diferencia significativa al interior del Golfo de California, las larvas pelágicas que llegan a vivir

en la columna de agua por tres semanas fue la causa propuesta por los autores para explicar la panmixia al interior del Golfo. Por otra parte, ellos encuentran una marcada diferenciación entre el interior y la costa del Pacífico, y sugieren que la Península de Baja California esté actuando como una barrera física al flujo genético (Petersen *et al.*, 2010).

Esta idea de que la Península de Baja California funciona como una barrera para la dispersión ha sido usada por otros autores (Terry *et al.*, 2000; Huang y Bernardi, 2001; Bernardi *et al.*, 2003; Bernardi, 2014) para explicar la diferenciación genética entre poblaciones del Golfo y la costa del océano. En estos estudios se trabajó con diversas especies de peces disjuntos entre el Pacífico y el Alto Golfo de California, es decir, que se encuentran distribuidos en la costa del océano Pacífico en la península, y en el Alto Golfo de California, pero están ausentes en la región de Los Cabos, encontrándose niveles de diferenciación muy elevados. En general, las especies utilizadas poseen hábitos rocosos, presentan una fase de vida adulta bentónica de dispersión limitada, y otra de larva pelágica, donde la dispersión puede ser mayor. En este sistema biológico, se predice que a mayor duración de la fase larvaria es esperable una menor estructuración genética, no obstante, la falta de correlación entre la duración de la fase larvaria y el nivel de estructuración encontrada en las especies sugiere que la dispersión en dicha fase no juega un papel importante en la diferenciación genética (Bernardi *et al.*, 2003).

Por otro lado, en el Golfo de California también se han utilizado diferentes especies de peces asociados a arrecifes rocosos de poca profundidad que poseen una fase adulta de dispersión muy limitada y otra en la que puede darse dispersión restringida a las larvas. Riginos y Nachman (2001) utilizaron ADN mitocondrial (ADNmt) para estudiar la diferenciación poblacional en *Axoclinus nigricaudus* y observaron que las relaciones filogenéticas inferidas a partir del ADNmt revelan una gran división principal entre el Alto Golfo y la Región Central; y dentro de la misma, una diferenciación entre las costas oriental y occidental del Golfo de California. Dichos autores atribuyen los resultados a una combinación entre factores biogeográficos, distancia geográfica y disponibilidad de hábitat.

Posteriormente, Riginos (2005) presenta otro trabajo con el mismo enfoque donde se estudia la diversidad genética en la región control del ADNmt en cinco especies de peces que habitan los arrecifes rocosos y poseen una fase de larva pelágica: *Axoclinus nigricaudus*, *Paralabrax maculatofasciatus*, *Coralliozetus micropes*, *Malacoctenus hubbsi* y *Girella nigricans*. Riginos (2005) encontró una diferenciación genética entre el Alto Golfo y la Región Central y propone un paralelismo entre sus resultados y los encontrados en la fauna terrestre de la Península de Baja California, sugiriendo que ambas discontinuidades se deben a un evento vicariante común: la presencia de un hipotético canal transpeninsular a la altura del desierto del Vizcaíno (Riddle *et al.*, 2000). La presencia de dicho canal pudo haber representado una discontinuidad en el hábitat rocoso costero de los peces estudiados que limitó el flujo genético.

Un enfoque similar se dio al estudio de la congruencia entre la variabilidad genética y la coloración en una especie endémica del Golfo de California, *Acanthemblemaria crockeri*. En este trabajo, Lin *et al.* (2009) analizaron ADNmt (COI y tRNA-Pro/D-loop) a lo largo del Golfo de California. Ellos encontraron dos grupos monofiléticamente recíprocos consistentes con la presencia de dos especies parapátricas separadas por una discontinuidad geográfica a la altura de la bahía de La Paz, esta discontinuidad podría ser consistente con el canal transpeninsular a la altura de la bahía de La Paz que teóricamente existió entre tres y cuatro millones de años atrás aproximadamente (Riddle *et al.*, 2000; Bernardi *et al.*, 2003); esta estimación es incongruente con el tiempo de divergencia estimado por Lin *et al.* (2009) de 1.8 millones de años. Así mismo, los autores encuentran una diferenciación genética significativa entre la región del Alto Golfo y la Región Central y, al igual que el trabajo de Riginos (2005), proponen que dicha discontinuidad pudo haber sido causada por el hipotético canal transpeninsular del Vizcaíno (Riddle *et al.*, 2000), el cual representó una barrera geográfica al flujo genético de esta especie de hábitos costero-rocoso, cuya principal dispersión está dada durante la fase de larva pelágica.

En resumen, la heterogeneidad en los estudios genéticos realizados en el Golfo de California está dada principalmente por las distintas historias de vida que poseen las especies estudiadas en combinación con la historia geológica y al complejo sistema de corrientes presentes en la región. En aquellas con una fase larvaria altamente extendida no se detecta estructura, mientras que en especies de movilidad más restringida, como en el camarón, la diferenciación genética se hace evidente. La Península de Baja California actuando como una barrera a la dispersión ha sido muy estudiada en fauna ictiológica disjunta. Finalmente, al interior del Golfo de California se encuentra una diferenciación a la altura del complejo de las grandes islas cuando se trata de especies de peces cuyo ciclo de vida es semejante al de las medusas, asociados a las zonas poco profundas y con una dispersión limitada a una corta etapa del ciclo de vida.

## **2.4 El Golfo de California**

El Golfo de California es una región extremadamente diversa con una gran complejidad de ambientes y patrones oceanográficos, y ha sido regionalizado teniendo en cuenta una gran diversidad de enfoques, que se han ido modificando a medida que diferentes herramientas metodológicas se han incorporado a la comunidad científica, principalmente por el desarrollo de tecnología (Petatán Ramírez, 2014). Si bien en el presente trabajo no nos detendremos a realizar un recuento histórico de cómo ha variado dicha regionalización, es de gran interés mencionar que existe diversas formas de enfocarse en esa problemática y van a ser diferentes en función a los intereses de cada grupo de trabajo. En particular, cuando el foco del trabajo es la estructura genética presente en las poblaciones de región, es de interés comprender qué factores son los que posiblemente pueden influir sobre el flujo genético entre distintas localidades.

En general el Golfo de California se ha subdividido usando diversos criterios en dos regiones mayores: la del Alto Golfo, al norte del complejo de las grandes islas (Tiburón y Ángel de la Guarda), y la Región Central, al sur de dichas islas (Petatán Ramírez, 2014). Entre ambas zonas existen diferencias en factores fisicoquímicos

como temperaturas, salinidad; así como en régimen de corrientes, profundidad o turbidez del agua (Walker, 1960). La profundidad y salinidad del Alto Golfo es menor al resto del golfo, mientras que las oscilaciones en la profundidad producto de las mareas son de gran magnitud (Riginos y Nachman, 2001; Riginos, 2005; Ainsworth *et al.*, 2011); así mismo está caracterizado por una gran variación estacional de la temperatura del agua. Por su parte, la Región Central posee una menor variación de las temperaturas y mareas, y tiene una diversidad de peces mayor, con especies que muestran afinidad con las zonas tropicales del Pacífico oriental (Walker, 1960; Riginos y Nachman, 2001; Riginos, 2005).

Los profundos canales presentes en el complejo de las grandes islas (Ainsworth *et al.*, 2011), así como también los patrones de circulación oceanográficos (Pegau *et al.*, 2002) son algunos de los factores que pueden contribuir en mayor medida, al aislamiento parcial entre estos sitios. Por otra parte, la heterogeneidad existente dentro de la región ubicada al sur del complejo de las grandes islas, puede tener diferente relevancia en función del objeto de estudio. Por ejemplo, para especies como *Axoclinus nigricaudus*, que se encuentran asociados a arrecifes rocosos someros, el golfo en sí mismo puede representar una barrera a la dispersión (Riginos y Nachman, 2001); mientras que para otras como los caracoles *Nerita scabricosta* y *N. funiculata*, o el camarón *Penaeus stylirostris*, que poseen larvas de vida prolongada, las corrientes superficiales pueden ser suficientes como para permitir el flujo genético y por lo tanto impedir una diferenciación genética (Aubert y Lightner, 2000; Hurtado *et al.*, 2007).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las regiones del planeta en donde existen elevados niveles de biodiversidad y endemismos, como lo es el Golfo de California y la Península de Baja California, requieren de un esfuerzo de conservación con miras a la preservación de los procesos evolutivos subyacentes (Myers *et al.*, 2000; Dolby *et al.*, 2015). La diversidad genética en la región ha sido estudiada a lo largo de diferentes especies tanto terrestres como marinas y costeras, en donde dilucidar los procesos evolutivos en el marco de un proceso de formación de la península extremadamente complejo ha sido el principal motivante.

En general se sugiere que el proceso de formación geológico de la península ha dado lugar a la diversidad genética que se detecta hoy en día, en donde la geografía interactúa con la historia de vida de las diferentes especies, modulando su estructuración poblacional. Eventos geológicos que para algunas especies pueden haber representado una barrera al flujo genético, como el canal transpeninsular propuesto por Riddle *et al.* (2000), para otras especies puede haber sido una posibilidad de flujo genético a ambos lados de la península (Bernardi, 2014). Igualmente, las corrientes marinas juegan un papel similar ya que pueden actuar en la dispersión larvaria a grandes distancias, mientras que en otros, los frentes oceánicos pueden representar una barrera infranqueable para algunas especies. En este contexto es de gran interés estudiar las poblaciones de la medusa bola de cañón, la cual presenta un ciclo de vida interesante, por lo que el presente trabajo representa un paso más direccionado a conocer el modo en que se distribuye la diversidad genética en el Golfo de California.

Por otro lado, Girón-Nava *et al.* (2015) hipotizaron que un *bloom* en el Golfo de Santa Clara tuvo origen en Guaymas, donde la acción de las corrientes pudo tener un rol en el transporte de las medusas. Dado que no se incluyó un estudio de diversidad genética, el presente trabajo brinda una buena oportunidad para poner a prueba dicha hipótesis bajo esta perspectiva.

Los resultados genéticos preliminares en la medusa bola de cañón usando secuencias de ADNmt permiten suponer la existencia un posible proceso de especiación en el Golfo de California (Gómez Daglio *et al.*, *datos sin publicar*), lo que hace aún más interesante el estudio de sus poblaciones, y previendo la importancia de este tipo de estudios dado a sus implicaciones en el manejo y administración de la pesquería. En ese sentido, es de gran relevancia poder utilizar marcadores más polimórficos y variables que el ADNmt, como lo son los microsatélites, para lograr evidenciar posibles procesos de estructuración genética a una escala más fina.

La importancia de la identificación de las poblaciones y su estructuración parte de la conservación del acervo genético y sus características biológicamente relevantes de la especie a lo largo de toda su distribución. Sin embargo, lo más frecuente es que no exista una correlación entre la regulación sobre la explotación del recurso, y las unidades poblacionales genéticamente relacionadas.

Como se mencionó anteriormente, la medusa bola de cañón es un recurso pesquero cuya explotación en México es reciente. Si bien hay algunas recomendaciones para su manejo en la CNP, la estructura genética poblacional no se tiene en cuenta, siendo un aspecto central al momento de implementar un correcto manejo de las poblaciones. Dada la importancia de generar un ordenamiento pesquero con base en conocimiento básico sobre la especie es que el presente estudio cobra relevancia. La etapa inicial del establecimiento de la pesquería nos coloca entonces en un excelente momento para desarrollar investigaciones que permitan realizar un manejo sustentable de la especie.

## 4. HIPÓTESIS

Dada la corta duración de la fase larvaria de la medusa bola de cañón y la nula movilidad de los pólipos, es esperable que exista diferenciación genética a lo largo del Golfo de California. Las condiciones climáticas y oceanográficas presentes en la región de las grandes islas (Isla Tiburón e Isla Ángel de la Guarda) pueden representar una barrera al flujo genético de las poblaciones, por lo que se espera detectar divergencia genética entre el Alto Golfo y las demás localidades. Así mismo, la Península de Baja California puede representar una barrera física que limita el flujo entre las localidades del Golfo de California con respecto a las externas, por lo que también se espera detectar divergencia en dicha región.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Determinar la estructura poblacional de la medusa bola de cañón, *S. meleagris*, en la zona del Noroeste de México utilizando *loci* microsatélites y buscar las explicaciones más plausibles de tal estructura.

### 5.2 Objetivos particulares

- Obtener los genotipos de 12 *loci* microsatélites en la medusa bola de cañón en 5 sitios del Noroeste de México.
- Estimar los parámetros de diversidad genética.
- Determinar y explicar el tipo de estructura genética que presenta la medusa bola de cañón en el Noroeste de México.

## 6. MÉTODOS

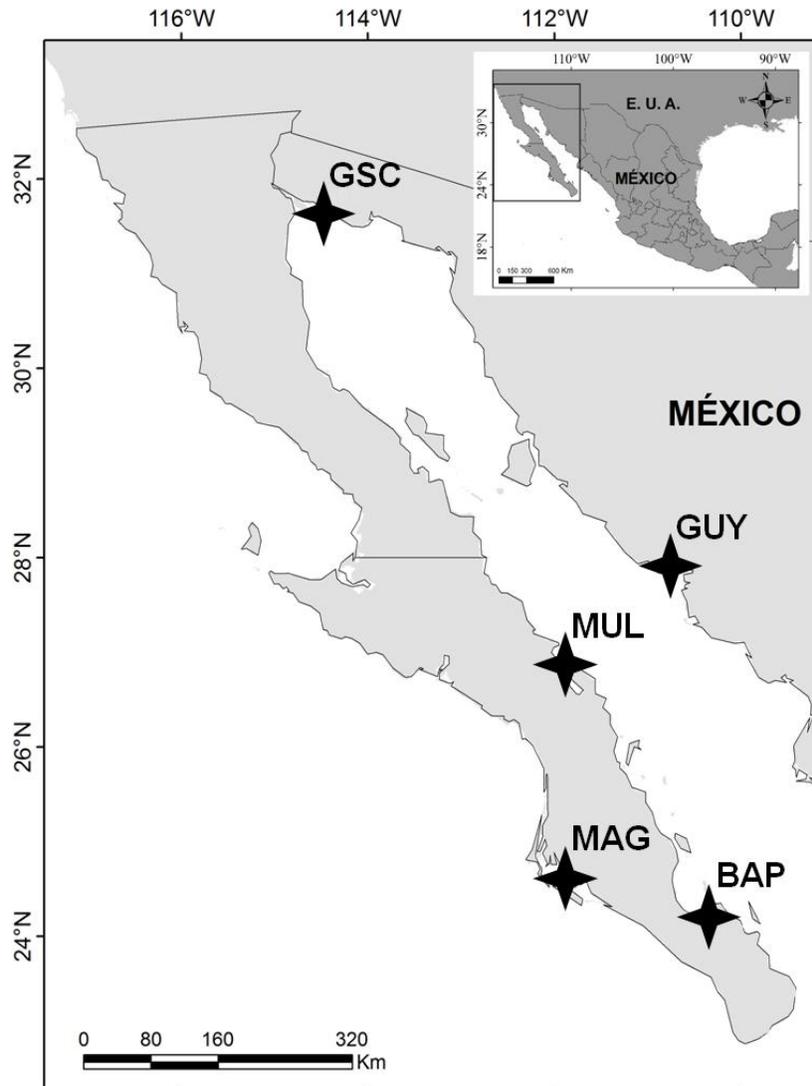
### 6.1 Área de estudio y obtención de las muestras

El Golfo de California es un cuerpo de agua que presenta una gran heterogeneidad ambiental, en donde existen diferentes factores oceanográficos, como frentes permanentes, que pueden contribuir a la presencia de estructura genética poblacional en las especies marinas. Por ello se seleccionaron sitios de muestreo distribuidos a lo largo del Golfo de modo de capturar de la mejor forma posible la extensión del mismo. Se seleccionó un sitio localizado en el Alto Golfo (Golfo de Santa Clara, Sonora), uno en la costa Este (Guaymas, Sonora), dos en la costa Oeste (Mulegé y Bahía de La Paz, B.C.S.), y un último sitio en el exterior del Golfo de California (Bahía Magdalena, B.C.S.) (Tabla I; Figura 3).

Se utilizaron las mismas muestras que en el trabajo de Gómez Daglio *et al.* (*datos sin publicar*), con la diferencia de que se incluyó un número de muestras mucho más grande, adecuado para un estudio de frecuencias alélicas con microsatélites (Kalinowski, 2005). Se recolectaron 124 ejemplares en los cinco sitios previamente mencionados durante 2008-2014; y durante 2014 se completó el muestreo recolectando 28 ejemplares de Bahía de La Paz (Tabla I), dando un total de 152 muestras. En todos los casos se cortó un fragmento de 1 cm del brazo oral y se preservó en etanol 95%.

**Tabla I.** Ubicación geográfica de los cinco sitios recolectados, con su respectiva clave, número de muestras y fecha de recolección.

Localidad	Clave	N	Latitud	Longitud	Fecha
Golfo de Santa Clara	<b>GSC</b>	26	31° 39' 39" N	114° 34' 33" O	03/2009
Guaymas	<b>GUY</b>	31	28° 48' 33" N	111° 56' 26" O	03/2009
Mulegé	<b>MUL</b>	30	26° 53' 56" N	111° 57' 39" O	08/2009
Bahía de La Paz	<b>BAP</b>	35	24° 10' 24" N	110° 18' 56" O	08/2008 - 05/2014
Bahía Magdalena	<b>MAG</b>	30	25° 7' 58 " N	112° 09' 06" O	08/2008

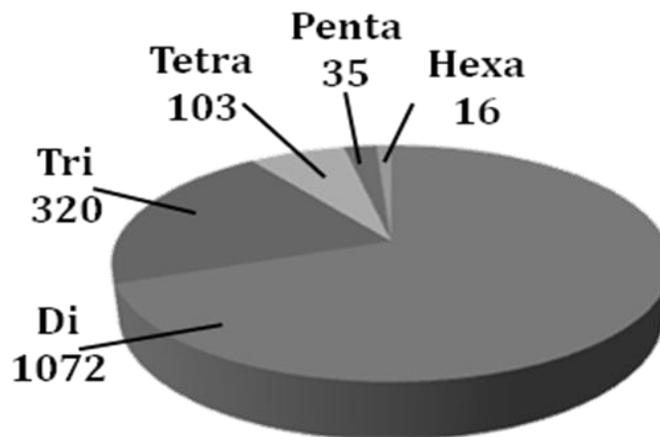


**Figura 3.** Área de estudio: Golfo de Santa Clara (GSC); Guaymas (GUY); Mulegé (MUL); Bahía de La Paz (BAP); Bahía Magdalena (MAG).

## **6.2 Aislamiento y caracterización de 12 loci microsatélite**

Dado que no existían *loci* microsatélites para *S. meleagris*, fue necesario desarrollarlos *de novo*. Dicho trabajo no formó parte de la presente tesis, sino que fue realizado en forma previa (Valdivia-Carrillo *et al.*, *datos sin publicar*). Dado que su publicación se encuentra en proceso de construcción y todavía no se ha formalizado, en esta sección se resume el procedimiento llevado a cabo.

Se extrajo ADN de alta calidad utilizando el kit de purificación EZNA DNA (Omega Bio-Tek, Norcross, GA). Se construyeron librerías de ADN compatibles con Illumina TruSeq mediante fragmentación del ADN en un equipo de sonicación Bioruptor UCD-300 (Diagenode, Denville, NJ). Una vez comprobada su calidad y normalizadas, fueron corridas en Illumina (San Diego, CA) MiSeq v2 500 cycle kit en el *Georgia Genomics Facility* (Universidad of Georgia), produciendo lecturas de 250 bases.



**Figura 4.** Gráfico de pastel representando el número de *loci* identificados con microsatélites de motivos di, tri, tetra, penta y hexanucleotídicos.

Se buscaron *loci* microsatélites de dos a seis pb y un número de repeticiones  $\geq 5$  en un total de 2388064 de lecturas obtenidas de la secuenciación por Illumina en el software Msatcommander 1,03 (Faircloth, 2008). En total se identificaron 1546 *loci* con motivos di, tri y tetranucleótidos (Figura 4). De estos, se seleccionaron 30 tetranucleótidos y se diseñaron los iniciadores (*primers*) utilizando las funciones Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) de Msatcommander con las siguientes especificaciones:

- Temperaturas de alineamiento de 50 a 70° C, con una diferencia máxima de 2°C entre cada iniciador.
- Producto de la PCR entre 90-320 pb de longitud.
- Contenido de GC > 40%.
- Longitud del iniciador entre 17 a 27 nucleótidos.

- Criterios de auto-complementariedad y calidad con los parámetros por defecto.

Se realizaron PCR con gradientes de temperatura y concentración de  $MgCl_2$  con el fin de determinar las mejores condiciones de amplificación para cada marcador. Los productos de PCR fueron genotipificados con un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*) y con el software de análisis de fragmentos GeneMapper Version 4.1 (*Applied Biosystems*). El tamaño de los alelos fue determinado utilizando el marcador estándar GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard v2.0 (*Applied Biosystems*). Una vez realizadas las pruebas, se obtuvieron 14 marcadores probados en la localidad de Bahía de La Paz (Tabla II).

### **6.3 Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de ADN a partir de muestras de tejido de 152 ejemplares depositados en la colección del Laboratorio de Genética para la Conservación (CIBNOR). Para ello, se utilizó el protocolo estándar de extracción con  $NaCl_2$  de (Sambrook *et al.*, 1989), con dos lavados de cloroformo/alcohol isoamílico. La concentración del ADN fue cuantificada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 8000 (*Thermo Scientific*) y su calidad verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando un marcador molecular de alto peso molecular ( $\lambda$ ). Posteriormente, se prepararon soluciones de trabajo a una concentración de 40 ng/ul, utilizando agua doblemente destilada en un sistema Simplicity UV® marca Millipore. Dichas diluciones también fueron verificadas utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 8000. La solución stock de ADN y las diluciones de trabajo fueron almacenadas en tubos 1.5 y 0.2 mL respectivamente a  $-20^\circ C$ , con sus etiquetas correspondientes en la colección de ADN del Laboratorio de Genética para la Conservación (CIBNOR).

**Tabla II.** *Loci* microsatélites utilizados en el trabajo, fluoróforo y secuencia de los iniciadores; el motivo de repetición (con el número de repeticiones entre paréntesis); la temperatura de alineamiento (Tm) en °C; y la concentración mili molar de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y el rango de tamaño esperado. El color del fluoróforo utilizado, VIC (verde), 6-FAM (azul), PET (rojo) y NED (amarillo).

<b>Locus</b>	<b>Color</b>		<b>Primer</b>	<b>Motivo</b>	<b>Tm - [MgCl<sub>2</sub>]</b>	<b>Tamaño</b>
<b>Smel-02</b>	<b>VIC</b>	F	VIC-TCCACCTGCTCCGATTACAC	AAAC(5)	56-[2.5]	90-120
		R	TGAGATTTGCTGTTTCACGC			
<b>*Smel-05</b>	<b>6-FAM</b>	F	6-FAM-CCACCCTTGACCTGCATTAAC	AAGC(5)	58-[1.5]	140-170
		R	CCATCCTCTTCAATGACGGC			
<b>Smel-06</b>	<b>VIC</b>	F	CGATCATTACTGGAGCGTCG	AAAT(5)	58-[2.0]	160
		R	CCAAGCACAGCAGTTGATCC			
<b>*Smel-08</b>	<b>PET</b>	F	PET-GCTACCCTTGTCTCTAATTCGC	ACAT(7)	56-[2.5]	150-200
		R	CGTTCTTTATTGACACCCGC			
<b>*Smel-09</b>	<b>NED</b>	F	NED-AATGCAAGTTGTCGATGGGC	AAGC(13)	68-[2.5]	130-220
		R	GATGTACAGCTGTGAGAACCC			
<b>*Smel-10</b>	<b>VIC</b>	F	VIC-CCTCGTGTTCTCTTCAACGG	AACT(6)	68-[2.0]	240-300
		R	GTCAGCGTCATTCGTAGCC			
<b>Smel-13</b>	<b>NED</b>	F	NED-CACGCTGACACAAGAGAAGC	AAGC(7)	64-[2.5]	130-190
		R	AAATTTGCTTGGTTGCCTGC			
<b>*Smel-15</b>	<b>6-FAM</b>	F	6-FAM-GCGGACGAGTTGTAACATGG	AAAC(5)	58-[1.5]	240-270
		R	TTTGGAGAGCGACATTGTCC			
<b>Smel-18</b>	<b>NED</b>	F	CTTCCAGGGCTGAAATTGGG	AATC(5)	58-[2.5]	160
		R	CTTCTTCATGTCTGGCCACG			
<b>*Smel-25</b>	<b>NED</b>	F	NED-AGCTACATAGGACCACTCGC	AACC(5)	60-[2.0]	320-360
		R	TCTCTGGGAAGACGAACTGC			
<b>*Smel-26</b>	<b>6-FAM</b>	F	6-FAM-GACCTACCTGCCAGTCTAGC	AATT(6)	60-[2.0]	270-300
		R	GGTTTCCTTCTTGACGAGCC			
<b>*Smel-27</b>	<b>PET</b>	F	PET-CTGCCTCCCTCCTCATCATG	ACCT(5)	64-[1.5]	390-420
		R	AGCAACATAGGTCCAACCTCGC			
<b>*Smel-29</b>	<b>VIC</b>	F	VIC-CTCCAGGCCCAACTTAGATG	AAAC(8)	60-[1.5]	320-360
		R	TCCGCCCATTTCTCAACAAATC			
<b>Smel-30</b>	<b>6-FAM</b>	F	6-FAM-TCCTAGTACGACTTCCAAAGGG	AAAC(6)	60-[1.5]	380-400
		R	GTGTTGGAGGAAGTGATGCC			

## **6.4 Genotipificación de 12 loci microsatélite**

### **6.4.1 Amplificación mediante PCR**

Los fragmentos de interés fueron amplificados mediante reacciones de amplificación por PCR de punto final, que se llevaron a cabo utilizando dos termocicladores: un DNA Engine marca BioRad de 96 pozos y un SimpliAmp marca Applied Biosystems de 96 pozos. El volumen total fue de 10  $\mu$ L y contenía aproximadamente 40 ng de ADN, 1x de Buffer para PCR Invitrogen (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), 0.3 mM de cada dNTP, 0.2  $\mu$ M de cada iniciador (marcado con su respectivo fluoróforo, Tabla II), entre 0.3 y 0.4 Unidades de TaqPolimerasa (Invitrogen) y una concentración de  $MgCl_2$  variando entre 1.5-2.5 mM en función del locus (Tabla III). Se utilizó el mismo protocolo estándar que el utilizado en Valdivia-Carrillo *et al.*, (*datos no publicados*) con una extensión final de una hora a 72°C para minimizar la presencia de picos +A/-A (Tabla III). Se añadió BSA (0.1 mg/ $\mu$ L) en el caso del locus Smel 29, para mejorar el rendimiento de la reacción.

**Tabla III.** Concentraciones de reactivos y programa PCR utilizado en las reacciones de PCR. El cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) y la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ), variaron para cada marcador según lo indicado en la Tabla II.

<b>Concentración de reactivos</b>		<b>Programa PCR</b>	
Buffer	1 X	1 x Desnaturalización	94°C, 4'
$MgCl_2$	1.5 - 2.5 mM	Desnaturalización	94°C, 30''
dNTP's	0.3 mM	35 x Alineamiento	$T_m$ , 45''
F-Primer	0.2 $\mu$ M	Extensión	72°C, 30''
R-Primer	0.2 $\mu$ M	1 x Extensión final	72°C, 60'
Taq Pol.	0.3-0.4 U		

### **6.4.2 Visualización en 3500 Genetic Analyzer**

El tamaño de los fragmentos fue obtenido con un secuenciador *3500 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). Se utilizó un arreglo de capilares de 50 cm,

polímero POP-7™, marcador molecular GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard v2.0 (*Applied Biosystems*) y un tiempo de inyección de ocho milisegundos. Las mezclas de reacción estuvieron compuestas por 8.5 µL de Hi-Di Formamida, 0.5 µL de marcador molecular 600 LIZ®, y 1 µL de producto de PCR.

Se realizaron pruebas con diferente factor de dilución de productos de PCR (1:3, 1:5, 1:10, 1:20), a partir de las que se determinó que un factor de 1:10 es el más adecuado, ya que podían leerse los tamaños de los fragmentos sin que se produjera una saturación del láser. Cabe mencionar que dicho factor de dilución debió ser ajustado en forma individual en algunos casos ya que la cantidad del producto de PCR obtenido varió según el locus. Se realizaron tres combinaciones de cuatro *loci* microsatélites (poolplex), marcados con fluoróforos de diferente color (Tabla IV). En el caso de la combinación C se incluyeron dos *loci* de igual color, teniendo en consideración que los tamaños esperados difieran significativamente entre ellos (es decir, que existan al menos 50 pb entre los extremos mayor y menor de los marcadores de menor y mayor tamaño respectivamente). Una vez obtenidos los electroferogramas se realizó la genotipificación utilizando el software de análisis de fragmentos GeneMapper Versión 5.0 (*Applied Biosystems*). Únicamente se utilizaron los picos con una intensidad mayor a 100 unidades de fluorescencia relativa (RFU por sus siglas en inglés); eso siempre y cuando puedan diferenciarse claramente del ruido de fondo. Aquellos de intensidad menor a 100 RFU o que no se pudo precisar el tamaño del pico con seguridad, fueron corridos con una concentración mayor (1:5) y/o repetida la reacción de PCR en caso de no visualizarse correctamente. Durante la genotipificación, los individuos fueron considerados como heterocigotos siempre y cuando el pico de mayor tamaño fue al menos un 25% del de menor. Así mismo, cuando el pico de menor intensidad fue el de un tamaño de fragmento menor, estos fueron considerados como válidos siempre y cuando alcance un 50% del pico de mayor intensidad.

Los individuos de la localidad de La Paz fueron genotipificados durante el trabajo de optimización utilizando un secuenciador *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer*. Los

genotipos provenientes de esa plataforma poseen pequeñas diferencias respecto a los de *3500 Genetic Analyzer*, asociadas a los diferentes tipos de polímero que se utiliza en cada plataforma. Por ello que fue necesario realizar una calibración entre ambos, detallada en el ANEXO I.

**Tabla IV.** Combinaciones de microsatélites corridos conjuntamente (poolplex), y el tamaño esperado para cada uno.

<b>Combinación A</b>		<b>Combinación B</b>		<b>Combinación C</b>	
<b>Smel-10</b>	240 - 300 pb	<b>Smel-29</b>	320 - 360 pb	<b>Smel-02</b>	90 - 120 pb
<b>Smel-08</b>	150 - 200 pb	<b>Smel-27</b>	390 - 420 pb	<b>Smel-13</b>	130 - 190 pb
<b>Smel-25</b>	320 - 360 pb	<b>Smel-09</b>	130 - 220 pb	<b>Smel-05</b>	140 - 170 pb
<b>Smel-15</b>	240 - 270 pb	<b>Smel-26</b>	270 - 300 pb	<b>Smel-30</b>	380 - 400 pb

## **6.5 Análisis estadísticos**

No se logró obtener productos de PCR de los *loci* Smel 02, 13 y 30 para la mayoría de los ejemplares por lo que no fueron utilizados. También se descartaron a todos los ejemplares que tuvieron más de un 20% de error de amplificación. Finalmente, se utilizó una matriz de datos de nueve *loci* (Smel 05, 08, 09, 10, 15, 25, 26 y 29) y 144 individuos (GSC=25, GUY=30, MUL=28, BAP=32, MAG=29; ver detalles en resultados).

### **6.5.1 Calidad y utilidad de marcadores**

Para que los diferentes análisis otorguen resultados robustos, es deseable que los marcadores a utilizar cumplan con una serie de requisitos para garantizar que aportan información independiente entre sí, que sean selectivamente neutros, se hereden de manera mendeliana o exista una baja frecuencia de alelos nulos (Selkoe y Toonen, 2006). Para verificar la óptima calidad y utilidad de los marcadores se realizaron diferentes análisis enumerados a continuación.

### **6.5.1.1 Tasa de error de genotipificación**

Para estimar la tasa de error durante la genotipificación, se seleccionaron al azar 15 individuos, correspondiente a una submuestra del 10% de los individuos analizados en el estudio. Según las recomendaciones de Pompanon *et al.*, (2005), se repitió el proceso desde la extracción de ADN utilizando el mismo método. Posteriormente se realizaron las reacciones de PCR según las condiciones óptimas de amplificación para cada locus y se corrieron los productos en una plataforma *Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems)*. Se realizó la genotipificación en el software *GeneMapper Versión 5.0 (Applied Biosystems)*.

A partir de las dos réplicas para cada individuo y para cada locus, se definió un genotipo de referencia. En casos donde el número de réplicas es mayor a dos, dicho genotipo de referencia es el que minimice los errores respecto a las réplicas. Dado que en el presente trabajo se contó con únicamente dos réplicas, cualquiera de los dos genotipos puede ser usado como referencia. Para el cálculo de la tasa de error por alelo, se determinó el número de alelos que presentaron inconsistencias respecto al genotipo de referencia por individuo,  $m_i$ . Se calculó la razón  $m/2nt$  donde  $m$  es el total de inconsistencias,  $n$  el número de individuos y  $t$  el número de réplicas. Finalmente, para calcular la tasa de error por genotipo, se determinó el número de genotipos por locus que presentaron al menos un alelo diferente con respecto al genotipo de referencia  $g_i$ . Posteriormente se calculó la razón  $g/nt$ , donde  $g$  es el total de inconsistencias,  $n$  el número de individuos y  $t$  el número de réplicas. Cabe destacar que las reacciones de PCR que no tuvieron una amplificación positiva fueron repetidas, y en los casos de no obtener producto luego de la repetición, dicho genotipo no fue incluido en el cálculo (Pompanon *et al.*, 2005).

### **6.5.1.2 Hardy-Weinberg**

El modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg establece la constancia de las frecuencias alélicas en una población, en la cual deben existir ciertas condiciones, como la diploidía, reproducción sexual, reproducción al azar, tamaño poblacional

idealmente *infinito*, o la ausencia de mutación y selección natural sobre el locus en cuestión. Bajo dichas condiciones, es posible predecir las frecuencias alélicas de las distintas generaciones a partir de la anterior, las cuales se mantendrán constantes. El equilibrio de Hardy Weinberg es una de las grandes bases sobre la que se desarrolló la teoría de genética de poblaciones, y por lo tanto es necesario poner a prueba la existencia de posibles desviaciones del mismo.

Para evaluar si las localidades presentan desviación del EHW se calculó la probabilidad de que los valores de heterocigosidad observadas sean significativamente diferentes a los esperados bajo el modelo de equilibrio. Para ello se implementó una prueba exacta de Fisher en el programa GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008) utilizando cadenas de Markov con parámetros por defecto y 10,000 permutaciones para calcular la significancia estadística. La misma ( $\alpha=0.05$ ) fue ajustada empleando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). Dicho análisis fue realizado a nivel de localidad y por locus, así como también por localidad multilocus.

### **6.5.1.3 Alelos Nulos**

Dado que en algunos *loci* se detectaron desviaciones significativas del EHW, se realizó un análisis de alelos nulos. Estos hacen referencia a aquellos alelos que si bien están presentes, no logran amplificarse mediante PCR por problemas técnicos, ya sea por factores intrínsecos a la reacción o bien por mutaciones sitio-específicas en la región de alineamiento de los iniciadores (Shaw *et al.*, 1999). El resultado directo de esto es que los heterocigotos que poseen dicho alelo nulo sean genotipificados como homocigotos produciendo una consecuente subestimación de la heterocigosidad, con posibles efectos sobre los análisis genéticos (Carlsson, 2008). Se evaluó la frecuencia de alelos nulos por locus y por localidad mediante el empleo del algoritmo de Maximización de la Expectativa (Dempster *et al.*, 1977) implementado en el programa FREENA (Chapuis y Estoup, 2007). Así mismo, se utilizó el software MICROCHECKER V.2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004) para estudiar si la presencia de alelos nulos fue debida a

la pérdida de alelos grandes o de errores de genotipificación por bandas supernumerarias (*stutters*, en inglés).

#### **6.5.1.4 Desequilibrio de ligamiento**

El supuesto de segregación independiente entre todos los pares de *loci* fue puesto a prueba utilizando el software GENEPOP v4.0 (Rousset, 2008), aplicando una prueba exacta de Fisher bajo la hipótesis nula de independencia entre locus (MCMC: 10000 dememorizaciones, 100 lotes, 10000 iteraciones por lote). Dicho análisis se realizó tanto por localidades como en forma global. Se aplicó la corrección secuencial de Bonferroni sobre el valor de significancia.

#### **6.5.1.5 Neutralidad**

Si bien por definición los microsatélites están sujetos a un proceso de selección del tipo neutral, dicho supuesto debe de ponerse a prueba ya que existe evidencia de que procesos de selección positiva, negativa y balanceadora, pueden actuar sobre estos marcadores. Para identificar aquellos *loci* bajo selección se utilizó el software LOSITAN (Antao *et al.*, 2008), el cual implementa el método de Beaumont y Nichols (1996), que considera los niveles de endogamia que presentan *loci* neutrales, deben ser iguales debido a su historia demográfica compartida. En este análisis se utilizó un total de 1000000 de simulaciones, intervalo de confianza de 0.99, submuestra 29; considerando tanto el modelo mutación por pasos como el de alelos infinitos (SMM y AIM, por sus siglas en inglés).

#### **6.5.1.6 Diversidad genética**

Se evaluó la diversidad genética por locus y por localidad. Como parámetros de diversidad se estimó el número de alelos por locus, la heterocigosidad observada y esperada ( $H_o$  y  $H_e$ ) en el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

El número de alelos privados por locus y localidad fue calculado utilizando el complemento del programa Microsoft Excel GenAlex (Peakall y Smouse, 2012).

### **6.5.2 Estructura genética**

Se realizaron análisis de estructura genética poblacional utilizando diferentes aproximaciones estadísticas para lograr comprender y establecer los patrones en forma clara y consistente. De este modo, se realizaron los análisis: AMOVA, se calcularon los índices de diferenciación poblacional, análisis de asignación mediante probabilidades bayesianas y Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP).

#### **6.5.2.1 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)**

El AMOVA es un análisis que estima el grado de variación genética presente dentro y entre diferentes agrupaciones, permitiendo estudiar diferentes escenarios. Es una aproximación similar a la del ANOVA para separar jerárquicamente la variación genética total en componentes dentro y entre poblaciones y agrupaciones. El análisis consta en determinar el grado de diferenciación genética que se encuentra contenida al interior de subgrupos (sitios de muestreo en nuestro caso), así como entre esos subgrupos dentro de agrupaciones y entre las agrupaciones, por medio de un análisis jerarquizado con una matriz de distancias (Excoffier *et al.*, 1992) a partir de los estadísticos F de Wright (Weir y Cockerham, 1984). Es interesante aclarar que dichas agrupaciones mayores son definidas *a priori* por el usuario, y eso permite comparar diferentes escenarios con la finalidad de comprender el porcentaje de la varianza genética que explica cada nivel de organización, y qué agrupación maximiza la varianza genética entre los grupos, a la vez que la minimiza al interior de los mismos. En el presente trabajo se implementó el AMOVA en la plataforma ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). Mediante este análisis se probó el desempeño de cinco escenarios, que son detallados a continuación:

- **ADN Mit:** Se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos por Gómez Daglio *et al.* (2015, datos *sin publicar*), en donde los grupos estaban representados por el GSC diferenciado de todos los demás sitios que conforman un mismo grupo genético.
- **Dos barreras:** En este escenario se consideraron dos barreras al flujo genético, conformadas por la región de las grandes islas y la Península de Baja California. De este modo se formaron tres grupos, GSC por un lado, GUY, MUL y BAP, y MAG por otro. Representa la hipótesis del trabajo.
- **Tres barreras:** Al escenario de dos barreras se le incorporó una tercera, formada por el Golfo de California en sí mismo, conformando cuatro grupos. GSC por un lado, GUY por otro, MUL y BAP, y por último MAG.
- **STRUCTURE K3 y K5:** Se utilizaron las agrupaciones propuestas por el enfoque bayesiano (ver sección 7.3.2.3).

#### **6.5.2.2 Índice de diferenciación genética poblacional ( $F_{ST}$ )**

Se estimó el grado de diferenciación genética mediante el cálculo del índice de fijación de Wright,  $F_{ST}$  (Weir y Cockerham, 1984). El mismo mide la magnitud de la diferenciación genética entre poblaciones mediante la comparación de las frecuencias alélicas dentro de una subpoblación respecto a toda la población. El valor de  $F_{ST}$  refleja la divergencia genética, pudiendo tomar valores de cero a uno. De manera general, los valores de cero pueden interpretarse como homogeneidad genética, mientras que valores significativamente diferentes de cero son indicativos de una diferenciación genética poblacional.

Los cálculos de  $F_{ST}$  se hicieron por pares de localidades, así como de manera global según Weir y Cockerham (1984) y su nivel de significancia en el programa ARLEQUIN V 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) (10 000 memorizaciones, 100 000 pasos en la cadena de Markov). La significancia estadística fue posteriormente

ajustada con la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). Dado que se observó la posible presencia de alelos nulos para algunos *loci* y localidades (Ver sección 6.3.1.3), con el objetivo de determinar si los mismos tienen algún efecto sobre la estimación del grado de diferenciación poblacional se realizó un cálculo complementario de los índices de fijación de  $F_{ST}$  implementando una corrección sobre alelos nulos ENA (exclusión de alelos nulos, de sus siglas en inglés), en el software FREENA (Chapuis y Estoup, 2007).

### **6.5.1.3 Análisis de agrupación bayesiana**

Se realizó un análisis de agrupación bayesiana implementado en el programa STRUCTURE v 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003), para inferir la estructuración poblacional y número más probable de poblaciones de *S. meleagris* en el Golfo de California. Este método asigna los individuos (probabilísticamente) a diferentes grupos sin necesidad de conocer a priori las unidades y/o límites poblacionales, mediante un índice de membresía buscando la maximización el equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento gamético dentro de los grupos.

Para el cálculo se utilizan iteraciones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), cuya longitud en el presente trabajo se fijó en 1000000, con un período de precalentamiento de 100000. Se asumió un modelo de mezcla (apropiado en este caso porque se esperaba encontrar flujo genético entre varios de los sitios de muestreo) y frecuencias alélicas correlacionadas. El método asume un modelo con K grupos, cada uno de las cuales está caracterizado por unas frecuencias alélicas en cada locus. El rango de posibles grupos analizados fue de entre uno a ocho (número de sitios de muestreo más tres, según Evanno *et al.* (2005), y para cada K se repitió 20 veces para verificar la consistencia de los resultados. Posteriormente se evaluó la probabilidad acumulada y la probabilidad posterior para cada valor de K, introduciendo los resultados de la simulación al servicio en línea STRUCTURE HARVESTER (Earl y VonHoldt, 2012), que permite detectar el número de grupos para datos simulados, usando el estadístico  $\Delta K$  de Evanno (Evanno *et al.*, 2005).

Una vez asignados los individuos al grupo para el que se tuvo un mayor índice de membresía, se realizó una alineación de los diferentes resultados obtenidos en cada una de las veinte réplicas mediante el software CLUMMP V 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007). Finalmente, se generó un gráfico que recoge la información de las veinte repeticiones para el valor de K más probable utilizando el software DISTRUCT V 1.1 (Rosenberg, 2004).

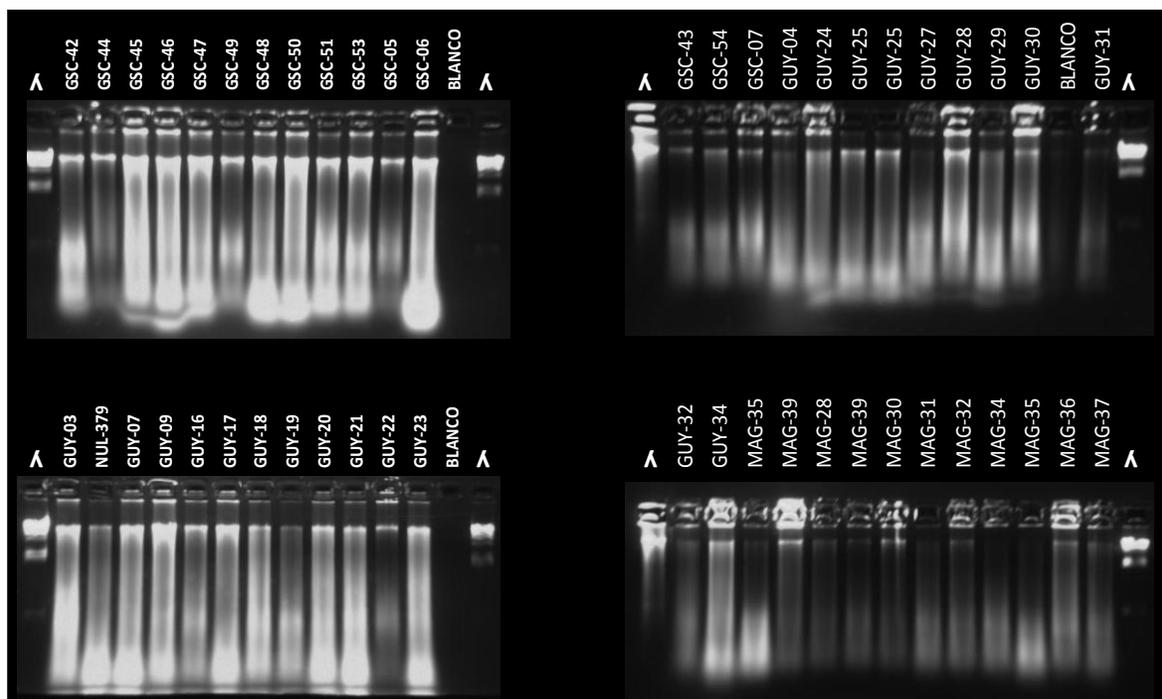
#### **6.5.2.4 Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP)**

El análisis discriminante de componente principales (ADCP) se realizó en el paquete ADEGENET de R (Jombart, 2008) para asignar los individuos al número de clústeres identificados previamente por STRUCTURE. Este método combina la ventaja del análisis de componentes principales al no asumir equilibrio de Hardy-Weinberg o desequilibrio de ligamiento (Patterson *et al.*, 2006; Jombart, 2008) con la ventaja del análisis discriminante de maximizar la separación entre clústeres predefinidos. La matriz de distancias ente pares de individuos empleada para el ADCP se calculó en el paquete POLYSAT (Clark y Jaseieniuk, 2011; R Development Core Team, 2011) de acuerdo a Bruvo *et al.* (2004).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Extracción de ADN

La concentración del ADN promedio de los 152 individuos fue de aproximadamente 180 ng/ul, (50 a 600 ng/ul), la cual fue suficiente para realizar las reacciones de PCR. En los casos en que la concentración fue menos a 50 ng/ul, las mismas fueron repetidas. Los valores de la razón 260/280 indicaron una buena calidad, variando entre 1.9 y 2.2. La buena calidad de las extracciones también pudo visualizarse en geles de agarosa (Figura 5), en donde puede verse que si bien se encuentra parcialmente degradado, en general ADN de alto peso molecular estaba presente.



**Figura 5.** Calidad del ADN visualizado en agarosa. Se muestra la calidad algunos de las extracciones de ADN. La concentración de agarosa fue del 1%, la electroforesis se llevo a cabo a 90V durante 25 minutos. Se utilizó tres  $\mu$ L de ADN en una proporción 1:1 con RedGel.

## **7.2 PCR y genotipificación**

De los 14 *loci* optimizados por Valdivia-Carrillo *et al.* (*datos sin publicar*), dos de ellos resultaron monomórficos y por lo tanto no son de utilidad para el presente estudio. De los doce restantes, los *loci* Smel 02, Smel 13 y Smel 30 lograron ser amplificados únicamente para algunos individuos aislados. Si bien se realizaron ensayos variando las condiciones a fin de utilizarlos, los mismos no mostraron señal de amplificación y por lo tanto no pudieron ser utilizados en el trabajo. Dicho problema también se presentó en los *loci* Smel 25 y 29, los que mostraron un mal desempeño. En esos dos *loci* el problema se solucionó incorporando suero de albúmina bovina (BSA) en una concentración de 0.1 mg/ul en la reacción de PCR.

Los electroferogramas mostraron picos bien definidos para la mayoría de los *loci* utilizados, pudiéndose diferenciar del ruido de fondo (ver ANEXO II para ejemplos de electroferogramas). Para los análisis estadísticos no se utilizaron individuos con más de un genotipo faltante, por lo que se descartaron ocho individuos, dando como resultado una base de datos compuesta por nueve *loci* y 144 ejemplares (GSC=25, GUY=30, MUL=28, BAP=32, y MAG=29). El éxito de amplificación varió entre 92.4 y 100% (Tabla V).

**Tabla V.** Genotipos faltantes y porcentajes de éxito y error de amplificación.

	<b>Smel 05</b>	<b>Smel 08</b>	<b>Smel 09</b>	<b>Smel 10</b>	<b>Smel 15</b>	<b>Smel 25</b>	<b>Smel 26</b>	<b>Smel 27</b>	<b>Smel 29</b>
<b>Datos faltantes</b>	0	1	1	2	6	11	1	8	0
<b>% Éxito</b>	100%	99.3%	99.3%	98.6%	95.8%	92.4%	99.3%	94.4%	100%
<b>% Error</b>	0%	0.7%	0.7%	1.4%	4.2%	7.6%	0.7%	5.6%	0%

## **7.3 Análisis estadísticos**

### **7.3.1 Calidad y utilidad de marcadores**

#### **7.3.1.1 Tasa de error de genotipificación**

Con base a las mediciones reportadas más frecuentemente, se tomaron dos medidas de la tasa de error de genotipificación: tasa de error por alelo y tasa de error por locus. En el primer caso el cálculo arrojó un rango de valores de entre 0% y 6.7% entre los diferentes *loci*, con una media de 3.9%. Así mismo al realizar el cálculo de error de genotipificación por locus (el cual tiene en cuenta como genotipos erróneos a aquellos que poseen al menos un alelo erróneo), dicho valor ascendió a un rango de entre 0% y 7.7%, con una media de 5% (Tabla VI). Cabe aclarar que se utilizó un control negativo en todas las reacciones de PCR para los nueve *loci* para detectar posibles amplificaciones por contaminación. En ninguna de las reacciones de PCR llevadas a cabo se detectaron productos, evidenciando la ausencia de contaminación.

**Tabla VI.** Tasa porcentual de error de genotipificación por locus y por alelo.

<b>Locus</b>	<b>Smel 05</b>	<b>Smel 08</b>	<b>Smel 09</b>	<b>Smel 10</b>	<b>Smel 15</b>	<b>Smel 25</b>	<b>Smel 26</b>	<b>Smel 27</b>	<b>Smel 29</b>	<b>Media</b>
<b>N</b>	30	30	30	30	28	30	28	26	26	28.6
<b>Error / alelo</b>	1.7%	1.7%	6.7%	6.7%	0%	5%	5.4%	1.9%	5.8%	3.9%
<b>Error / genotipo</b>	3.3%	3.3%	6.7%	6.7%	0%	6.7%	7.1%	3.8%	7.7%	5 %

#### **7.3.1.2 Hardy-Weinberg**

Se realizaron múltiples comparaciones, por lo que se ajustó el nivel de significancia según la corrección de secuencial de Bonferroni en cada localidad. Guaymas fue la localidad que mayor número de *loci* con desviaciones del EHW presentó. Las otras cuatro localidades mostraron entre dos y cuatro *loci* desviados

del equilibrio (Tabla VII). El análisis multilocus arrojó desviaciones altamente significativas en todas las localidades.

Los *loci* que menos localidades con desviaciones fueron Smel 05, 08, 09, 26, y 29, con no más que dos localidades en desequilibrio. Por su parte, los *loci* que mayores desviaciones del EHW mostraron fueron Smel 10 con todas las localidades en desequilibrio, Smel 25 con cuatro sitios desviados y los *loci* Smel 15 y Smel 27 con tres (Tabla VII). Al analizar todas las localidades en forma global, vemos que únicamente el locus Smel 05 se encontró en equilibrio, no así los restantes. Cabe aclarar que los *loci* Smel 08 y Smel 09 fueron monomórficos en la localidad de Mulegé, y dado que el EHW hace referencia a la relación entre frecuencias alélicas de dos o más alelos, no pudo estimarse las desviaciones del mismo.

**Tabla VII.** Valores de probabilidad asociada obtenidos a partir de la prueba exacta de Fisher.

	<b>GSC</b>	<b>GUY</b>	<b>MUL</b>	<b>BAP</b>	<b>MAG</b>	<b>Global</b>
<b>Smel 05</b>	0.8153	0.0285	0.6955	0.8982	0.6385	0.498
<b>Smel 08</b>	0.0193	0.0579	**	0.1467	<b>0.0067*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Smel 09</b>	<b>0.0013*</b>	<b>0.0001*</b>	**	0.2941	0.0191	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Smel 10</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>0.0005*</b>	<b>0.0012*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Smel 15</b>	<b>0.0002*</b>	<b>0.0001*</b>	<b>0.0004*</b>	0.0492	0.0727	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Smel 25</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	1	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Smel 26</b>	0.0776	<b>0.0071*</b>	0.1767	0.4928	0.7370	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Smel 27</b>	0.1874	<b>0.0052*</b>	0.1568	<b>0.0047*</b>	<b>0.0065*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Smel 29</b>	0.9412	0.1057	1	<b>0.0003*</b>	0.0673	<b>&lt;0.0001*</b>
<b>Multilocus</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>0.0004*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>	<b>&lt;0.0001*</b>

Nota: (\*) En letra negrita indican las comparaciones significativas luego de la corrección secuencial de Bonferroni. \*\* Pruebas no estimadas por falta de polimorfismo.

### 7.3.1.3 Alelos Nulos

Los resultados están presentes en la Tabla VIII. La mayor parte de los *loci*/sitios poseen frecuencias de alelos nulos bajas o moderadas, mientras que los valores

más altos son los que presentan los *loci* Smel 25 y Smel 15, aunque en el último es únicamente en tres localidades. Por su parte, Smel 25 presentó valores muy elevados en las localidades de GSC, GUY, BAP y MAG, mientras que en MUL fue cercano a cero. Los resultados arrojados por MICRO-CHECKER indican que la señal de alelos nulos no fue debido a una pérdida de alelos grandes, aunque en muy pocos casos se detectó la posible presencia de errores debidos a *stutters* (Tabla VIII).

**Tabla VIII.** Frecuencia de alelos nulos calculada a partir del software FREENA.

	Smel 05	Smel 08	Smel 09	Smel 10	Smel 15	Smel 25	Smel 26	Smel 27	Smel 29
<b>GSC</b>	0	0.10	0.10	0.09	<b>0.22</b>	<b>0.28*</b>	0.09	0.07	0.00
<b>GUY</b>	0.07	0.11	0.19*	<b>0.23</b>	<b>0.25*</b>	<b>0.32</b>	0.15*	0.16	0.09
<b>MUL</b>	0.02	0	0	0.17	<b>0.23</b>	0	0.09	0.10	0
<b>MLP</b>	0	0.09	0.06	0.15	0.11	<b>0.23</b>	0.04	0.14	0.12
<b>MAG</b>	0.04	0.12	0.12	0.18	0.11	<b>0.31</b>	0	0.15	0.08

Nota: Los valores menores a 0.01 se indican como cero. En negrita se indican aquellos con una frecuencia de alelos nulos alta, mayor a 0.2. Con un asterisco \* se muestran los candidatos a errores por *stutters*.

#### **7.3.1.4 Desequilibrio de ligamiento y test de neutralidad**

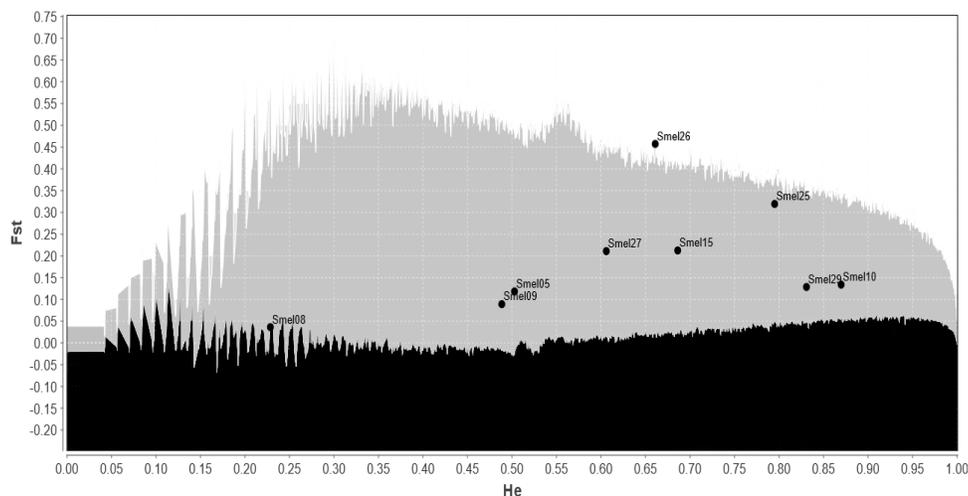
De las comparaciones realizadas entre pares de *loci*, ya sea por cada localidad o para todas las localidades agrupadas, ninguna de las mismas fue significativa luego de implementar la corrección secuencial de Bonferroni.

La prueba de neutralidad realizada en el programa LOSITAN arrojó resultados significativos para los *loci* Smel 26, indicando que es candidato a estar bajo selección positiva (Tabla IX). Se realizaron simulaciones utilizando los modelos de mutación de alelos infinitos (IAM) y de mutación por pasos (SMM); los resultados fueron similares para ambos modelos, por lo tanto se muestra únicamente el gráfico del IAM (Figura 6).

**Tabla IX.** Test de neutralidad utilizando el modelo de mutación por alelos infinitos (IAM) y de mutación por pasos (SMM)

	Smel 05	Smel 08	Smel 09	Smel 10	Smel 15	Smel 25	Smel 26	Smel 27	Smel 29
<b>IAM</b>	0.463	0.144	0.298	0.410	0.727	0.970	<b>0.997*</b>	0.707	0.364
<b>SMM</b>	0.463	0.246	0.330	0.657	0.776	0.977	<b>0.998*</b>	0.730	0.539

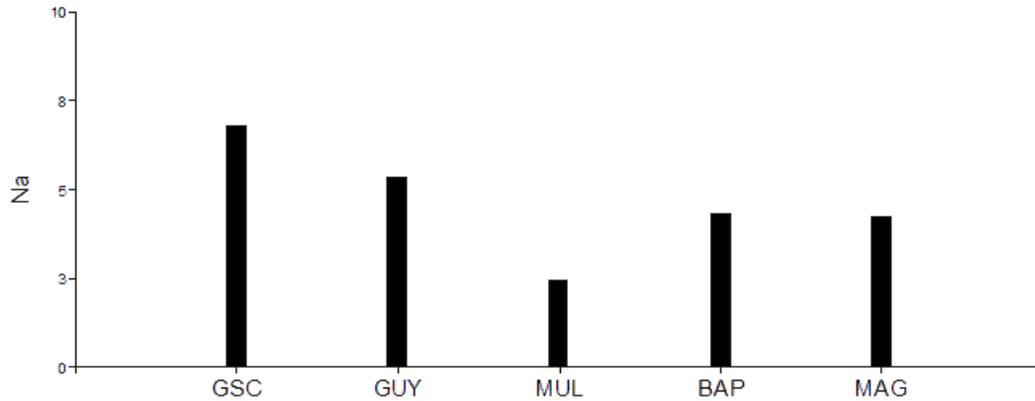
Nota: \* En letra **negrita** con muestran los valores significativos, por fuera del intervalo de confianza del 0.99.



**Figura 6.** Gráficas de  $F_{ST}$  vs Heterocigosidad esperada obtenida a partir de del test de neutralidad utilizando el modelo mutacional IAM. Los puntos negros muestran la ubicación de los nueve *loci*. Las regiones bajo selección positiva, neutra y balanceadora se muestran en blanco, gris claro y negro respectivamente.

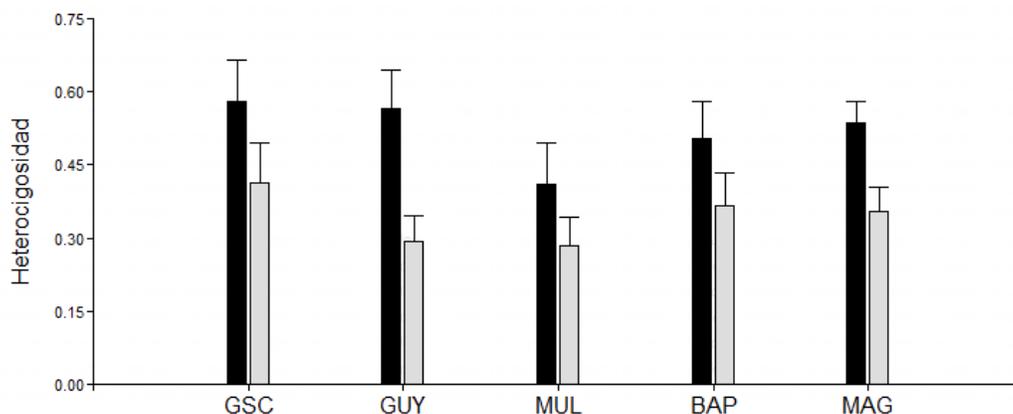
### 7.3.1.5 Diversidad genética

El tamaño de muestra varió a lo largo de las localidades desde 25 en el Golfo de Santa Clara hasta un máximo de 32, en Bahía de La Paz. A nivel global, todos los *loci* resultaron polimórficos mostrando un rango de entre cinco (Smel 05) a 16 (Smel 09) alelos por locus en el total de las localidades, con un promedio de 8.67. El número promedio de alelos por locus y por localidad fue de 3.35, con un máximo en la localidad de GSC con 6.78, y un mínimo en MUL con 2.44 (Figura 7, Tabla X). Es importante destacar que en MUL los *loci* Smel 08 y Smel 09 fueron monomórficos.



**Figura 7.** Promedio del número de alelos por locus en cada localidad

Los valores de heterocigosidad observada promedio variaron entre las diferentes localidades de 0.28 a 0.41, siendo el promedio de 0.33. Por su parte, la heterocigosidad esperada oscilo entre 0.41 y 0.58 con un promedio de 0.60. Tanto en  $H_O$  como en  $H_E$ , el máximo valor se observó en GSC y e mínimo en MUL, mientras que los otros tres sitios permanecieron con valores intermedios.  $H_O$  en todos los casos resultó menor a  $H_E$  (Figura 8), indicando la existencia de un exceso de homocigotos. Los valores de  $F_{IS}$  encontrados fueron elevados, variando entre 0 y 0.78, con una media global de 0.36 (Tabla X). Si bien la mayoría de los marcadores mostraron valores elevados de  $F_{IS}$ , el locus Smel 25 fue el que consistentemente mostró los mayores valores, siempre por encima de 0.7 (a excepción de MUL), lo que demuestra un exceso de homocigotos.



**Figura 8:** Promedios de heterocigosidad esperada (negro) y observada (en gris) por localidad. Las líneas indican el error estándar.

Tabla X. Parámetros de diversidad genética por locus y sitio de muestreo.

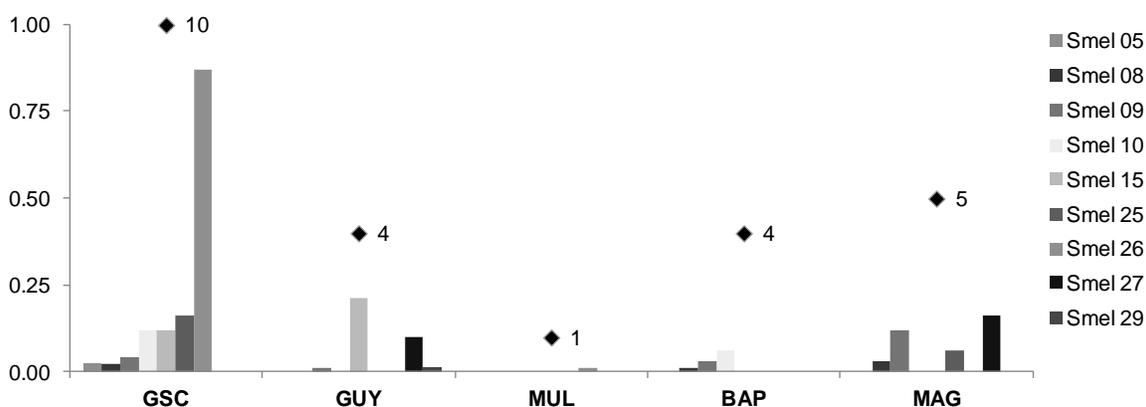
		Smel 05	Smel 08	Smel 09	Smel 10	Smel 15	Smel 25	Smel 26	Smel 27	Smel 29	Promedio
GSC	N	25	25	25	25	24	24	24	25	25	24.66
	Na	5	4	12	12	7	5	4	3	8	6.78
	Ho	0.52	0.12	0.48	0.68	0.42	0.21	0.17	0.28	0.84	0.41
	He	0.51	0.22	0.71	0.87	0.81	0.69	0.23	0.36	0.81	0.58
	FIS	0	0.47	<b>0.33*</b>	<b>0.22*</b>	<b>0.49*</b>	<b>0.70*</b>	0.30	0.24	0	<b>0.22*</b>
	Fn	0	0.10	0.10	0.09	0.22	0.28	0.09	0.07	0	0.11
GUY	N	30	30	30	29	28	26	30	26	30	28.78
	Na	3	2	7	9	5	4	3	5	10	5.33
	Ho	0.33	0.13	0.17	0.38	0.29	0.19	0.17	0.35	0.63	0.29
	He	0.38	0.24	0.38	0.82	0.73	0.76	0.32	0.64	0.82	0.56
	FIS	0.12	0.44	<b>0.56*</b>	<b>0.54*</b>	<b>0.61*</b>	<b>0.75*</b>	<b>0.49*</b>	<b>0.46*</b>	0.23	<b>0.35*</b>
	Fn	0.07	0.11	0.19	0.23	0.25	0.32	0.15	0.16	0.09	0.18
MUL	N	28	27	28	28	26	27	28	28	28	27.56
	Na	2	1	1	5	2	2	3	2	4	2.44
	Ho	0.43	-	-	0.46	0.15	0.11	0.11	0.29	0.43	0.28
	He	0.47	-	-	0.78	0.51	0.11	0.17	0.42	0.41	0.41
	FIS	0.08	-	-	<b>0.41*</b>	<b>0.70*</b>	0	0.37	0.32	0	<b>0.15*</b>
	Fn	0.02	0	0	0.17	0.23	0	0.09	0.10	0	0.07
BAP	N	32	32	32	31	31	30	32	32	32	31.56
	Na	4	4	5	7	2	4	2	3	8	4.33
	Ho	0.53	0.19	0.50	0.48	0.03	0.13	0.44	0.41	0.59	0.37
	He	0.46	0.28	0.56	0.75	0.09	0.47	0.51	0.60	0.82	0.50
	FIS	0	0.32	0.11	<b>0.36*</b>	0.66	<b>0.72*</b>	0.14	<b>0.33*</b>	<b>0.28*</b>	<b>0.27*</b>
	Fn	0	0.09	0.06	0.15	0.11	0.23	0.04	0.14	0.12	0.10
MAG	N	29	29	28	29	29	26	29	25	29	28.11
	Na	2	3	5	6	5	4	3	4	6	4.22
	Ho	0.34	0.24	0.39	0.28	0.41	0.15	0.55	0.20	0.62	0.35
	He	0.41	0.37	0.57	0.55	0.56	0.68	0.56	0.37	0.76	0.54
	FIS	0.15	<b>0.35*</b>	0.32	<b>0.50*</b>	0.26	<b>0.78*</b>	0.02	<b>0.47*</b>	0.18	<b>0.25*</b>
	Fn	0.04	0.12	0.12	0.18	0.11	0.31	0	0.15	0.08	0.12
Global	N	144	143	143	142	138	133	143	136	144	140.67
	Na	5	6	16	15	8	6	5	6	10	8.67
	Ho	0.43	0.14	0.31	0.45	0.25	0.16	0.29	0.31	0.62	0.33
	He	0.48	0.23	0.48	0.84	0.64	0.74	0.59	0.58	0.81	0.60
	FIS	0.11	<b>0.40*</b>	<b>0.35*</b>	<b>0.47*</b>	<b>0.61*</b>	<b>0.79*</b>	<b>0.50*</b>	<b>0.47*</b>	<b>0.24*</b>	<b>0.36*</b>
	Fn	0.05	0.11	0.13	0.21	0.24	0.33	0.20	0.18	0.10	0.17

Nota: Se indica el tamaño de muestra, N; número de alelos por locus, Na; heterocigosidad observada, Ho y esperada, He; índice de endogamia, FIS; y frecuencia de alelos nulos Fn. Los valores con \* y en negrita muestran la desviación significativa del del EHW luego de aplicar la corrección secuencial de Bonferroni. Los valores menores a 0.01 se indican como cero.

Los mayores valores de alelos privados se observaron en la localidad de GSC, con un total de 10, algunos de los cuales se encuentran en frecuencias elevadas, llegando en un caso a ser de 0.87 (Tabla XI, Figura 9). La contraparte la tenemos en la localidad de MUL, en donde un único alelo privado fue detectado, en una frecuencia extremadamente baja, de 0.01. GUY, BAP y MAG presentaron valores similares de alelos privados, con cuatro, cuatro y cinco para cada localidad respectivamente. Así mismo, la frecuencia en la que se encontraron fue menor en BAP (0.025 en promedio), que en GUY y MAG (0.08 y 0.07 en promedio respectivamente).

**Tabla XI.** Número de alelos privados y su frecuencia entre paréntesis, por locus y localidad.

	GSC	GUY	MUL	BAP	MAG
<b>Smel 05</b>	1 (0.02)				
<b>Smel 08</b>	1 (0.02)			1 (0.01)	1 (0.03)
<b>Smel 09</b>	2 (0.04)	1 (0.01)		1 (0.03)	2 (0.12)
<b>Smel 10</b>	2 (0.12)			2 (0.06)	
<b>Smel 15</b>	2 (0.12)	1 (0.21)			
<b>Smel 25</b>	1 (0.16)				1 (0.06)
<b>Smel 26</b>	1 (0.87)		1 (0.01)		
<b>Smel 27</b>		1 (0.10)			1 (0.16)
<b>Smel 29</b>		1 (0.01)			
<b>Total</b>	10	4	1	4	5



**Figura 9.** Gráfico de barras para la frecuencia de alelos privados por localidad y por locus. El rombo negro indica el número de alelos privados detectado por cada localidad.

### 7.3.2 Estructura genética

Se realizaron análisis para poder establecer la confiabilidad de los marcadores microsatélites. Esos análisis arrojaron que el locus Smel 25 era candidato a generar algunos inconvenientes en las estimaciones, y por ello fue descartado del análisis, de modo que en esta sección con únicamente ocho *loci* y 144 individuos.

#### 7.3.2.1 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Independientemente del escenario que se estudió, la mayor varianza genética se encontró entre individuos dentro del sitio de muestreo, la cual varió entre 73.27% y 82.18% a lo largo de las diferentes escenarios probados. El escenario que mejor explicó la repartición de la varianza fue el que postuló a todas las localidades diferenciadas entre sí (STRUCTURE K5), con un 17.82 % de la varianza. El que le siguió muy de cerca con un 16.92% de la varianza explicada fue el que tiene en cuenta únicamente a la región de las grandes islas como una barrera para el flujo genético. En cuanto a la variación entre grupos que menor porcentaje explicó (y por lo tanto el escenario menos adecuado) fue el modelo de tres barreras (1.97%). Si bien todas las agrupaciones resultaron significativas, Meirmans (2015) destaca que comparar la significancia estadística de agrupaciones obtenidas a partir de los mismos datos no es adecuado, y ya que se usan agrupaciones arrojadas por STRUCTURE, no se reportan dichos valores.

**Tabla XII.** AMOVA. Porcentaje de variación a diferentes niveles jerárquicos explicados por el análisis de la varianza molecular en los distintos modelos que se pusieron a prueba.

<b>Modelo</b>	<b>% Entre Grupos</b>	<b>% Entre sitios dentro de grupos</b>	<b>% Dentro sitios</b>
<b>Una barrera</b>	16.92	9.81	73.27
<b>Dos barreras</b>	8.46	11.62	79.91
<b>Tres barreras</b>	1.97	16.03	82.00
<b>STRUCTURE K3</b>	13.01	8.37	78.62
<b>STRUCTURE K5</b>	17.82	-	82.18

### 7.3.2.2 Índice de diferenciación genética poblacional ( $F_{ST}$ )

Tanto a nivel global como entre todas las comparaciones realizadas, los valores de  $F_{ST}$  resultaron diferentes de cero con un alto valor de significancia ( $p < 0.001$ ). Esto es un indicador de la existencia de que la estructura poblacional de la medusa bola de cañón en el Golfo de California presenta un elevado grado de diferenciación entre las muestras analizadas.

**Tabla XIII.** Valores de  $F_{ST}$  calculados con y sin corrección por presencia de alelos nulos.

	<b>GSC</b>	<b>GUY</b>	<b>MUL</b>	<b>BAP</b>	<b>MAG</b>
<b>GSC</b>	-	<i>0.189</i>	<i>0.310</i>	<i>0.216</i>	<i>0.235</i>
<b>GUY</b>	0.216	-	<i>0.123</i>	<i>0.077</i>	<i>0.072</i>
<b>MUL</b>	0.327	0.130	-	<i>0.171</i>	<i>0.151</i>
<b>BAP</b>	0.235	0.096	0.182	-	<i>0.067</i>
<b>MAG</b>	0.254	0.100	0.159	0.078	-

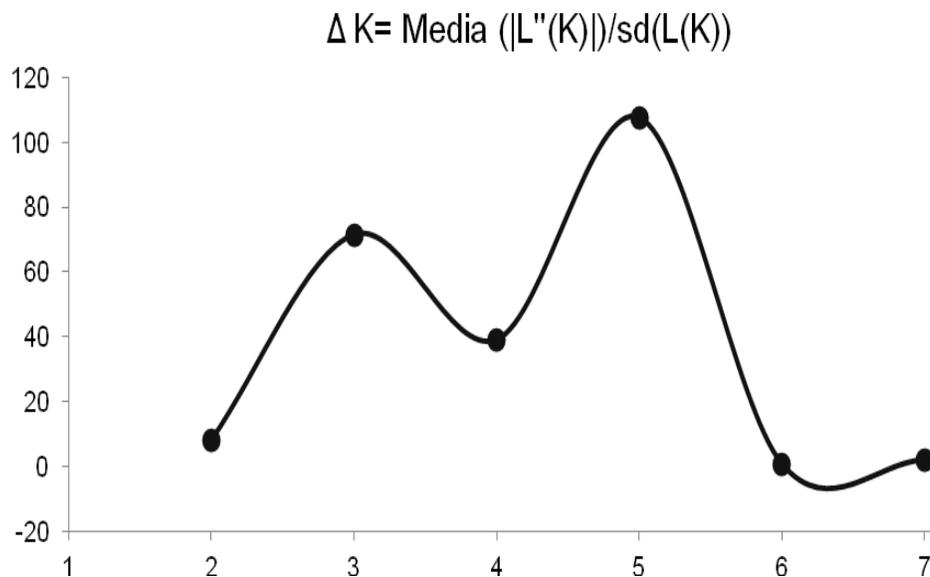
Nota: Por debajo de la diagonal se expresan los valores sin corrección, y por encima, en letra cursiva los corregidos. En todos los casos, los resultados fueron significativos ( $p < 0.001$ ). GSC, Golfo de Santa Clara; GUY, Guaymas; MUL Mulegé; BAP, Bahía de La Paz; MAG, Bahía Magdalena.

Los mayores valores fueron los observados entre la localidad de GSC y el resto de los sitios, alcanzando un máximo entre GSC y MUL (Tabla XIII). Luego del GSC, las comparaciones que mayores valores presentaron fueron las de MUL respecto a las demás localidades. Es importante destacar que si bien GUY, BAP y MAG presentaron los valores más bajos y del mismo orden de magnitud, todas las comparaciones fueron significativas.

Los índices de diferenciación poblacional corrigiéndolos por alelos nulos muestran que si bien existen cambios sutiles en el valor de  $F_{ST}$  al considerar la corrección por presencia de alelos nulos que implementa FREENA, dichas diferencias no son importantes, y los resultados se encuentran en el mismo orden de magnitud. Ello es un indicador de que los potenciales alelos nulos presentes en la base de datos no generan efectos negativos sobre el cálculo de los índices de diferenciación poblacional.

### 7.3.2.3 Análisis de agrupación bayesiana

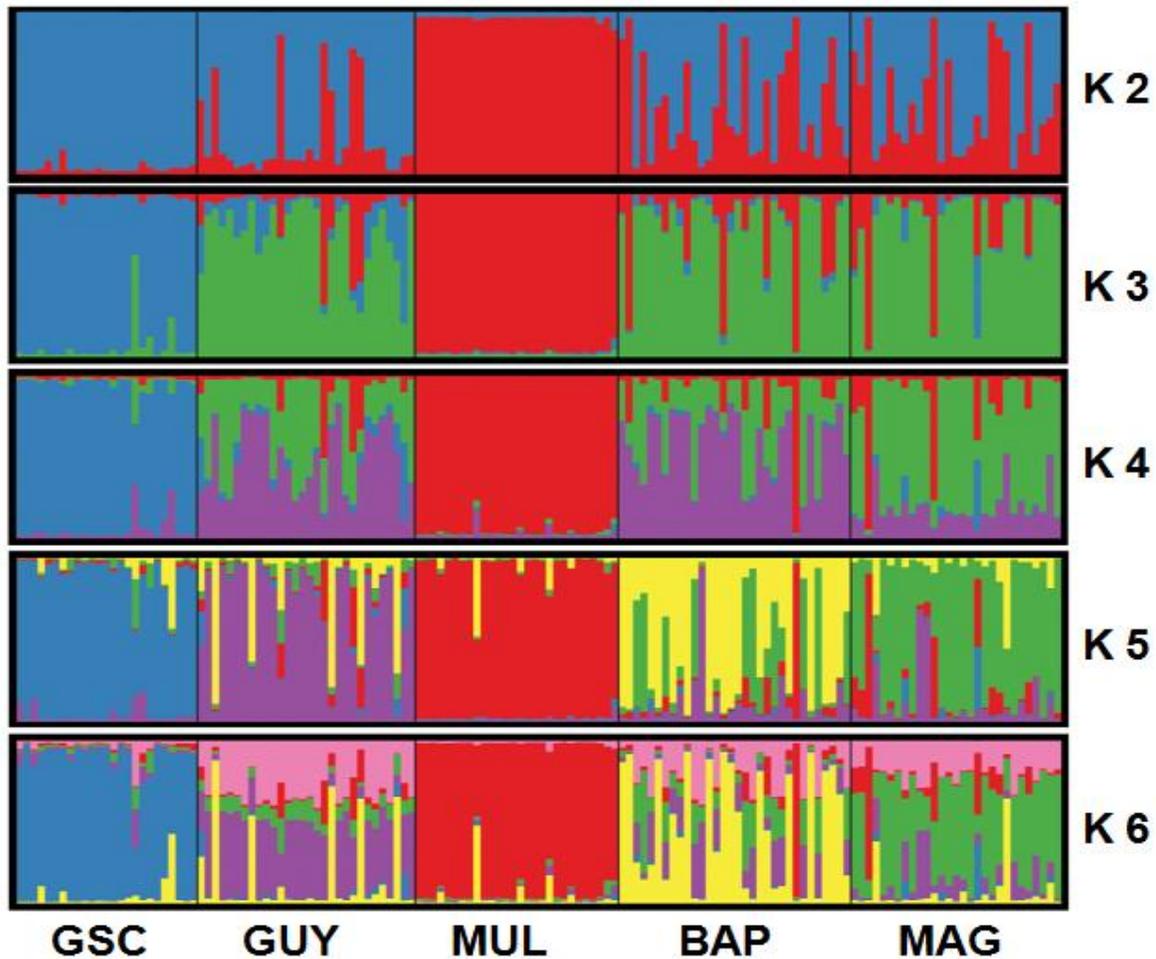
La estimación del número de poblaciones mediante probabilidad bayesiana utilizando el programa STRUCTURE arrojó un valor más probable de cinco grupos genéticos, evidenciado por el máximo de  $\Delta K$  (Figura 10), el cual es mejor estimador para el número de clusters (Evanno *et al.*, 2005). Así mismo, en la gráfica se puede observar un pico de  $\Delta K$  subóptimo para un valor de  $K = 3$ , lo que da indicios de la existencia de una estructuración poblacional a diferentes niveles.



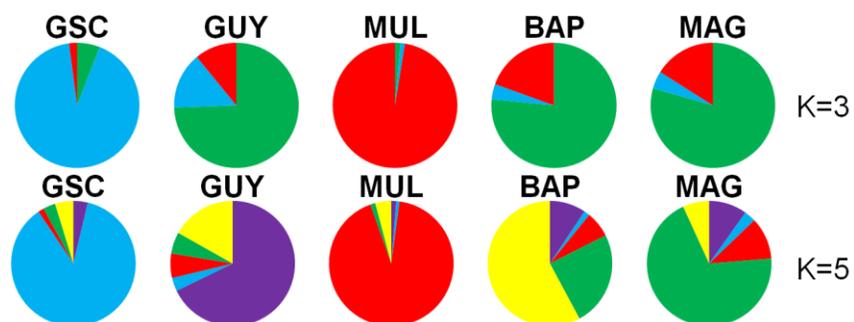
**Figura 10.** Gráfico de  $\Delta K$  en función del número de grupos genéticos que integra las 20 repeticiones.

Para el valor de  $K$  más probable de cinco, los mayores coeficientes de membresía fueron los de las localidades de GSC y MUL, dando cuenta de una mayor homogeneidad (Figura 11). Cabe destacar que la tendencia general de la diferenciación de GSC y MUL es evidente en todos los valores de  $K$  analizados. Al contrario, las otras tres localidades, si bien están mayormente compuestas por un grupo genético particular, evidencian un cierto grado de mezcla entre sí.

Los coeficientes de membresía poblacionales (Figura 12, Tabla XIV) también indican que los mayores valores se ubicaron en el GSC y MUL. En cambio, las



**Figura 11:** Gráfico de barras de los coeficientes de membresía de los individuos obtenido a partir del análisis bayesiano en STRUCTURE para valores de K entre dos y seis. Cada barra vertical representa un individuo con su probabilidad de pertenencia a cada grupo genético.



**Figura 12.** Representación gráfica de los coeficientes de membresía para cada sitio de muestreo, para K=3 y K=5 . Cada color representa un grupo genético.

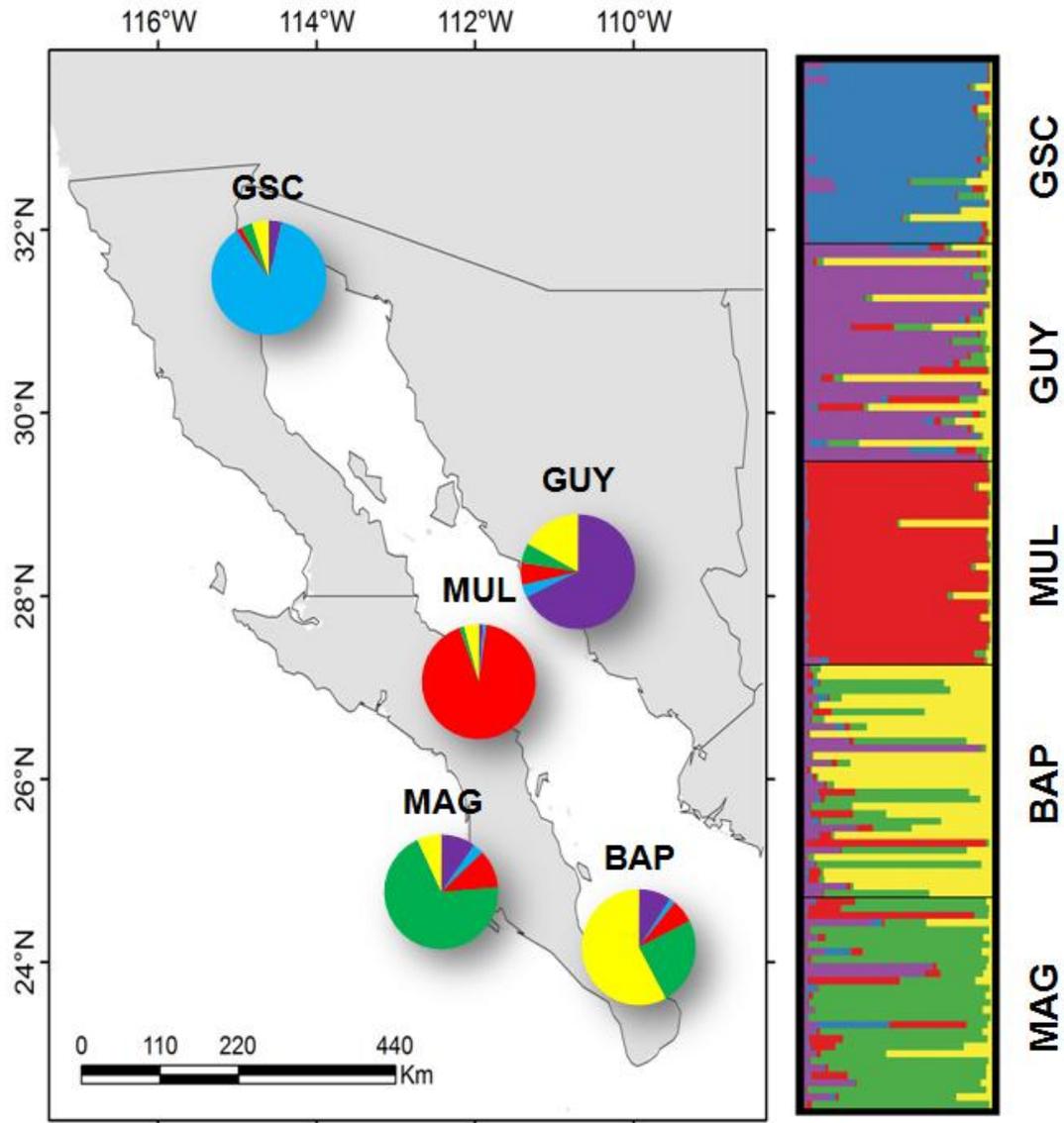
localidades de GUY, BAP y MAG poseen coeficientes menores, lo que indica la existencia de mezcla genética con otras localidades. Para el valor de  $K=5$ , es destacable que la mezcla no se produjo en forma recíproca entre los tres sitios, ya que Guaymas muestra que posee un 0.17 de membresía con el grupo que se asocia mayoritariamente con Bahía de La Paz, pero en BAP hay un 0.25 de identidad con el grupo genético de Bahía Magdalena. Así mismo, el grupo GUY+BAP+MAG tienen más mezcla con MUL que con GSC (Figura 12).

El gráfico de  $\Delta K$  muestra un pico subóptimo para tres poblaciones genéticas. Nuevamente se refuerza la segregación de GSC y MUL, mostrando que las otras tres localidades tienen casi un 25% de mezcla. MAG y BAP tienen una mayor semejanza con Mulegé, mientras que en GUY, el flujo genético se encuentra dividido entre MUL y GSC (Figura 11,  $K=3$ ).

**Tabla XIV.** Coeficientes de o membresía para cada sitio de muestreo, para un valor  $K=5$  grupos genéticos obtenidos a partir de STRUCTURE.

	<b>K5</b>					<b>K3</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>GSC</b>	0.04	0.87	0.02	0.03	0.05	0.06	0.92	0.02
<b>GUY</b>	0.68	0.03	0.06	0.06	0.17	0.74	0.15	0.11
<b>MUL</b>	0.01	0.01	0.92	0.01	0.04	0.01	0.01	0.97
<b>BAP</b>	0.09	0.02	0.07	0.25	0.58	0.77	0.04	0.20
<b>MAG</b>	0.10	0.03	0.11	0.69	0.07	0.79	0.05	0.16

Un resumen de los resultados arrojados por el programa STRUCTURE se presenta en la Figura 13, se observa una mayor homogeneidad genética en los sitios más diferenciados, GSC y MUL, así como el grado de mezcla en las demás localidades.



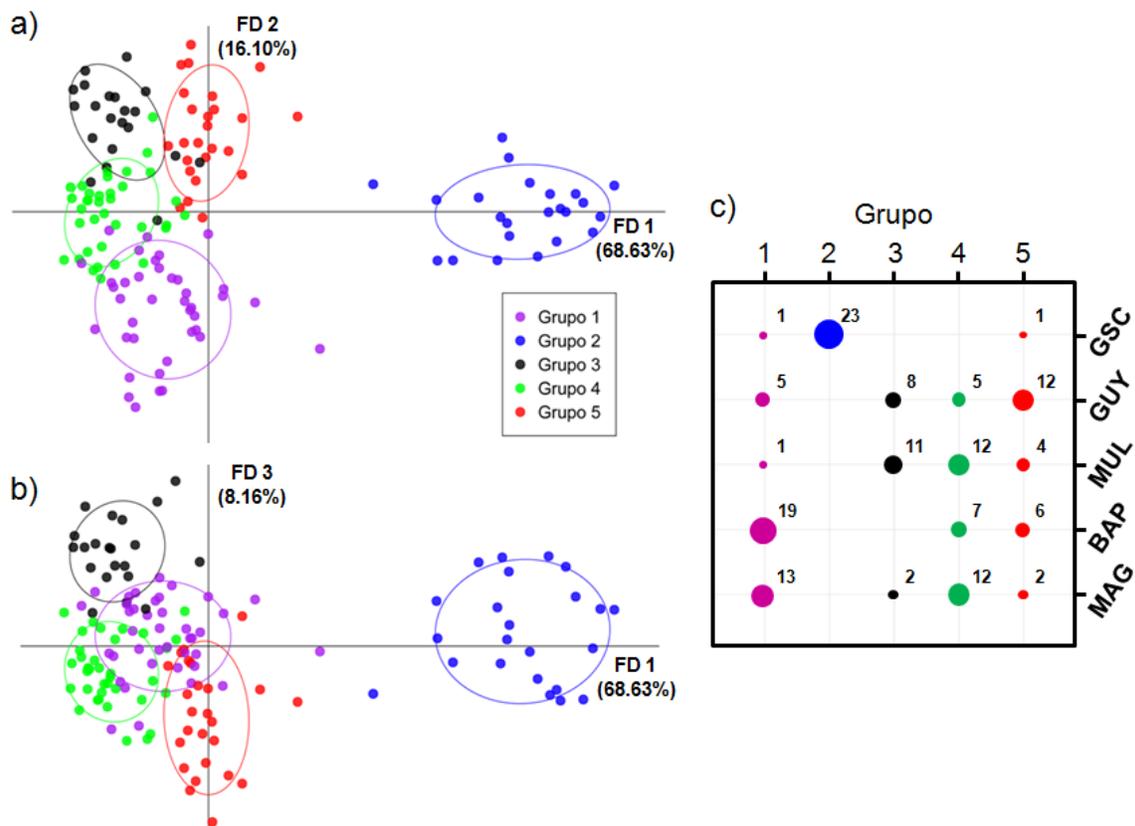
**Figura 13.** Mapa del área de estudio, con los resultados obtenidos de STRUCTURE para un  $K=5$ . Los gráficos de pastel indican los coeficientes de identidad poblacional, y el de barras vertical indica los coeficientes de identidad individual (Ver sección Resultados 7.3.2.3 para mayores detalles).

#### **7.3.2.4 Análisis Discriminante de Componentes Principales (ADCP)**

El ADCP realizado para la diferenciación de cinco grupos, mostró que la primer función discriminante (FD) explica un 68.63% de la variación, y absorbe las diferencias existentes entre el Grupo 2, conformado principalmente por individuos del GSC, y el resto de la población (Figura 14a y 14b). Por otra parte, se puede

ver que tanto en la FD dos como la FD tres muestran una diferenciación entre los demás grupos, siendo más notoria la segregación del Grupo 3 en el FD 3 (Figura 14b). Dicho grupo, si bien contiene individuos de las localidades de MAG y GUY, está formado mayoritariamente por individuos de la localidad de Mulegé.

El único grupo completamente independiente y homogéneo es el Grupo 2 (Figura 14c) formado por ejemplares del GSC. El resto de los grupos muestran un cierto grado de mezcla entre sí, aunque en todos los casos generalmente están compuestos mayoritariamente de ejemplares de una misma localidad.



**Figura 14.** Análisis Discriminante de Componentes Principales. Se muestran las gráficas de dispersión correspondientes en las tres primeras FD: a) FD1 vs FD2 y b) FD1 vs FD3. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de la varianza explicada por cada una de ellas. En el gráfico c) se muestra el número de individuos pertenecientes a cada localidad que fue asignado a cada grupo. El tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos, indicado encima de cada uno.

## 8. DISCUSIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo en el marco de un proyecto que busca dar luz a una problemática de incertidumbre taxonómica y estructura genética poblacional en la medusa bola de cañón. Si bien esta especie es ampliamente explotada comercialmente en el Golfo de México, su pesquería en el Golfo de California es más reciente y por ello es que la correcta explotación requiere del aporte de investigaciones que den cuenta del estado de sus poblaciones. En la Carta Nacional Pesquera (SAGARPA, 2012) se destacan algunas líneas necesarias en las que diferentes grupos de investigación se encuentran actualmente trabajando, pero nada se menciona acerca de la estructura genética poblacional. Por ello es que el presente trabajo cobra relevancia social, ya que la novedosa información que se generó se encuentra íntimamente relacionada con el correcto manejo del recurso.

Como parte de avances previos del proyecto, Gómez Daglio *et al.* (*datos sin publicar*) encontraron que diferentes genes mitocondriales evidencian una diferenciación genética posiblemente a nivel de especie entre los individuos del Alto Golfo de California respecto al resto del golfo; entre estos últimos, sin embargo, no se detectó diferenciación. Gracias a que los microsatélites presentan una elevada tasa de mutación y poseen un elevado polimorfismo son adecuados para analizar la variación más fina, al nivel poblacional. Es por ello que resultó apropiado estudiar la variabilidad genética de la medusa bola de cañón en el Golfo de California, y resolver la falta de información a nivel poblacional de las secuencias del ADNmt.

### **8.1 Calidad y utilidad de los marcadores**

Para brindar información confiable acerca de la estructura poblacional los marcadores deben dar cuenta de su calidad. La mayoría de los *loci* fueron adecuados para el estudio de estructura genética poblacional. Únicamente el locus Smel 25 presentó ciertos problemas. Por un lado fue el que mayor proporción de

datos faltantes tuvo, por encima del máximo aceptable del 5%. Por otro lado, es en el que las desviaciones del EHW estuvieron más marcadas. Los valores de  $F_{IS}$  dieron cuenta de un exceso de homocigotos. Dichas desviaciones fueron asociadas con altas frecuencias de alelos nulos. Estos aspectos no lo convierten en un candidato ideal para ser utilizado en los análisis de la estructura genética. En muchos casos esos inconvenientes no afectan significativamente al análisis, y por eso es que se realizaron los análisis de estructura genética con y sin dicho locus para ver como se comportaban los resultados. Se observó que los mismos varían en gran medida y, dados los aspectos negativos antes descritos, no se consideró adecuado incluirlo en los análisis de estructura genética. Por otro lado, en Smel 10, se observaron desviaciones del EHW, pero no se encontró señal de selección, altas frecuencias de alelos nulos ni tampoco se modificaron las tendencias de los resultados al excluirlos de los análisis, por lo que fue incluido en los análisis.

La tasa de error de genotipificación se calculó para determinar la confiabilidad de la base de datos utilizada. Los valores reportados generalmente en la literatura oscilan entre 0.2% y 15% (Pompanon *et al.*, 2005), por lo que los en el presente estudio se cometió un error de moderado a bajo en comparación a los más frecuentemente reportados (Tabla VI). Cabe destacar que a partir de la utilización de un control negativo pudo determinarse que, al menos en las réplicas realizadas, los errores cometidos no fueron debidos a contaminación durante las diferentes etapas del proceso.

Existen diferentes fuentes de error durante un trabajo, que pueden ir desde una amplificación pobre, inclusión de artefactos de la PCR como verdaderos alelos, presencia de *stutters*, contaminación o errores de tipeo, entre otros (Bonin *et al.*, 2004; Selkoe y Toonen, 2006). En el presente, el trabajo inicial se realizó en la plataforma ABI PRISM 310 y el hecho que hubo otro observador pudo haber incrementado la tasa de error, aunque hay que tener en cuenta los resultados del ensayo que estableció una buena correspondencia entre las dos plataformas utilizadas (ANEXO I). Si bien falta estudiar con mayor profundidad las

consecuencias de los errores de genotipificación sobre estudios de genética de poblaciones basados en frecuencias alélicas, se ha mencionado que los mismos tienen un efecto menor, en comparación a los estudios basados en la identificación de individuos (Pompanon *et al.*, 2005; Selkoe y Toonen, 2006).

La mayor parte de los análisis de estructura poblacional basados en frecuencias alélicas, establecen como hipótesis subyacente la existencia de Equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que el estudio del mismo cobra especial relevancia. En el presente trabajo, se vio un exceso de homocigotos, el cual fue evidenciado por los elevados valores de  $F_{IS}$  que promediaron el valor de 0.36 (Tabla X). Por otro lado, no todas las combinaciones sitio/locus mostraron desviaciones significativas, sino que las mismas se localizaron principalmente en el locus Smel 25, el cual mostró valores de encima de 0.7 en cuatro localidades y cero en Mulegé.

Una de las posibles explicaciones para dichas desviaciones es la presencia de alelos nulos. Por eso se llevó a cabo un análisis para detectar la posible presencia de alelos nulos realizado en FREENA (Tabla VIII). Al igual que las desviaciones del EHW, las mayores frecuencias de alelos nulos las presentó el locus Smel 25, y en los demás *loci* que presentaron frecuencias elevadas, las mismas fueron correspondidas con desviaciones significativas del EHW, como es el caso de Smel 15. Así mismo, es importante resaltar que los análisis demostraron que las frecuencias elevadas de alelos nulos resultan de un exceso de homocigotos más que de errores por *stutters* o pérdida de alelos grandes.

Existen otras causas que pueden explicar desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg, como el sistema de apareamiento. La condición de equilibrio es que la población se reproduzca sexualmente y en forma aleatoria. Dado que la medusa bola de cañón presenta una fase del ciclo de vida de reproducción asexual (Calder, 1982), podría esperarse que se vea reflejado en los niveles de heterocigotos significativamente diferente al esperado bajo EHW. En este sentido, se esperarían desviaciones al EHW afectando a todo el genoma, reflejándose sobre todos los *loci* y localidades estudiadas en su conjunto y no en forma localizada sobre algunos *loci*.

Ese patrón generalizado fue visto en la localidad de Guaymas, en donde una gran proporción de *loci* se desvía del equilibrio. En las demás localidades las desviaciones están localizadas principalmente sobre dos *loci*, Smel 10 y Smel 25, fuera de los que no se observa un patrón. Si bien existe una tendencia al exceso de homocigotos, es difícil atribuirlo en forma categórica al sistema de apareamiento ya que algunas localidades (como GUY) se ven más afectadas que las demás; aunque no puede descartarse que la fase de reproducción asexual sea responsable de las desviaciones del EHW observadas. Por su parte, es muy importante destacar que si bien se conoce que ese sistema de reproducción está presente en la especie, no existen estudios precisos en la región. Se desconoce que fase reproductiva es la que prevalece, así como la longevidad de los pólipos o si una condicionante ambiental es la que determina la reproducción asexual. Por ello es necesario realizar estudios en esos aspectos para poder establecer una relación clara entre las características del sistema reproductivo y los resultados encontrados en la presente tesis.

Los inconvenientes presentes en forma tan marcada en el locus Smel 25, motivaron la realización de ensayos en los análisis de estructura genética sin dicho locus para determinar su influencia sobre los resultados. Se pudo ver que las estimaciones de  $F_{ST}$  y las agrupaciones bayesianas mediante el programa STRUCTURE variaron en forma muy evidente, y es por eso que se decidió descartar este locus de los análisis de estructura genética. Por otra parte, cabe destacar que más allá de la presencia de frecuencias moderadas de alelos nulos según el criterio de Chapuis y Estoup (2007) en el resto de los *loci* (Tabla VIII), las estimaciones de los índices de diferenciación poblacional no fueron fuertemente influenciados por los mismos, lo que le da solidez a las estimaciones realizadas.

Dado que la presencia de ligamiento entre *loci* puede crear pseudo replicación en los análisis genéticos (Selkoe y Toonen, 2006), fueron positivos los resultados encontrados ya que no se observó desequilibrio de ligamiento en ningún caso. Por otro lado, generalmente los *loci* microsatélite no están bajo el efecto directo de la selección natural, pero es posible que los mismos se encuentren en regiones

cercanas a genes que sí lo están, y por lo tanto existe un proceso de selección indirecta sobre los mismos (Slatkin, 1995; Nielsen *et al.*, 2006). En el presente estudio un único locus (Smel 26) resultó como candidato a estar bajo el efecto de selección positiva. Es posible que el elevado grado de diferenciación genética sea la causa de una señal positiva, producto del alto valor de  $F_{ST}$ , por lo que se corrió el análisis sin la localidad más divergente (GSC) y la señal de selección desapareció, indicando que la elevada diferenciación es responsable la señal de selección encontrada, mas no la selección en sí misma.

## **8.2 Diversidad Genética**

Describir la diversidad genética de la medusa bola de cañón en y entre los sitios de muestreo constituyó el segundo objetivo particular del trabajo. Los microsatélites utilizados demostraron ser útiles para el estudio de variabilidad genética y diferenciación poblacional, mostrando polimorfismo en la mayoría de las localidades. El número de alelos por locus se encuentra entre los mayormente reportados para otras especies de medusas (ver Tabla XV). No todos los microsatélites mostraron un mismo nivel de polimorfismo, siendo Smel 09, 10 y 29 los más polimórficos. A nivel global, teniendo en cuenta todas las localidades como una sola, todos a excepción de Smel 05, mostraron desviaciones significativas del EHW, con un exceso de homocigotos.

Cuando dos poblaciones en equilibrio, pero con diferentes frecuencias alélicas son combinadas, se pone de manifiesto el llamado efecto Wahlund, en el que se manifiesta un déficit de heterocigotos causando desviaciones significativas del equilibrio de Hardy-Weinberg (Wahlund, 1928). Dado que en el presente trabajo se detectó una diferenciación genética muy marcada, es esperable que aquellos marcadores que se encuentran en equilibrio en ciertas localidades, muestren fuertes desviaciones al combinar los distintos sitios y realizar el análisis en forma global.

Al comparar la diversidad genética intra-poblacional, la primera tendencia clara que se observa es que la mínima diversidad se dio en la localidad de Mulegé, lo que se ve reflejado en el número de alelos, número de alelos privados y en la heterocigosidad observada. Contrariamente, la mayor diversidad fue detectada en la localidad del Golfo de Santa Clara. Ambos sitios son los más divergentes con los mayores valores de diferenciación, lo que implica que el proceso demográfico detrás de esa diferenciación es distinto, aunque no se puede descartar que se haya submuestreado a las poblaciones de esas regiones; la siguiente discusión supone que se han muestreado todos los alelos y se ha caracterizado poblacionalmente las frecuencias alélicas.

Por otro lado, el rango de  $H_o$  en el trabajo, a lo largo de los diferentes *loci* y localidades es similar al que se observa para otras especies de medusas (Tabla XV). Sin embargo, los valores medios observados para otras especies se encuentran en 0.45 aproximadamente, mientras que en el presente estudio se detectó un promedio de 0.33. Como se mencionó anteriormente, es posible que esto haya sido debido a la presencia moderada de alelos nulos (Chapuis y Estoup, 2007; Carlsson, 2008).

**Tabla XV.** Rango de heterocigosidad observada por locus y localidad en el presente trabajo, así como otros trabajos realizados sobre medusas, utilizando microsatélites.

Referencia	Especie	$H_o$	$N_a$
Este estudio	<i>Stomolophus meleagris</i>	0.11 a 0.84 (0.33)	1 a 16 (8.67)
Aglieri <i>et al.</i> (2014)	<i>Pelagia noctiluca</i>	0.14 a 0.85 (0.48)	5 a 18 (8.00)
Meek <i>et al.</i> (2012)	<i>Maeotias marginata</i>	0.21 a 0.85 (0.64)	3 a 8 (5.75)
Meek <i>et al.</i> (2012)	<i>Moerisia sp.</i>	0.01 a 0.74 (0.45)	2 a 14 (7.90)
Finger <i>et al.</i> (2010)	<i>Medusagyne oppositifolia</i>	0.17 a 0.85 (0.48)	2 a 15 (6.54)
Zhu <i>et al.</i> (2015)	<i>Rhopilema esculentum</i>	0.04 a 0.87 (0.34)	2 a 12 (6.20)

Los alelos privados son aquellos exclusivos de una población y son indicativos de un limitado flujo genético (Lowe y Allendorf, 2010). En el presente trabajo se observó que la localidad del Golfo de Santa Clara es la que mayor número de alelos privados posee y en donde mayores frecuencias presentan. El número de alelos privados es prácticamente el doble que en las localidades de GUY, BAP y

MAG, lo que da idea de una diferenciación muy antigua. En el extremo opuesto, la localidad de Mulegé presentó un único alelo privado en una frecuencia mínima, lo que, junto con el bajo polimorfismo, da idea de una reciente colonización a esa región (Nei *et al.*, 1975). Cabe destacar que todos los sitios tuvieron aproximadamente el mismo tamaño de muestra, lo que permite asegurar que las estimaciones de alelos privados no fueron afectado por tamaños muestrales distintos (Nei, 1978; Gorman y Renzi, 1979), o bien tuvieron el mismo nivel de error. Así mismo, es importante destacar que la especie posee un rango de distribución muy amplio, el presente trabajo se centra únicamente en la región norte de su distribución sobre el océano Pacífico, siendo una pequeña porción del total, por lo que la diversidad genética analizada es únicamente representativa de esa región.

### **8.3 Estructura poblacional**

El tercer y último objetivo particular del trabajo fue dar luz sobre la existencia o no de una diferenciación genética de de las poblaciones en la medusa bola de cañón a lo largo del Golfo de California. La respuesta directa a ello es que efectivamente existe una diferenciación genética entre los cinco sitio de muestreo, la cual es fuerte. Dilucidar los patrones de posible conectividad y explicar la diferenciación encontrada a la luz de los procesos teniendo en cuenta las complejidades existentes en el ciclo de vida de la especie así como la historia geológica de la región es lo que pretendemos explicar en la presente sección. Así mismo daremos cuenta de los principales interrogantes y necesidades futuras para tener una mayor comprensión del proceso de diferenciación genética.

Se utilizaron diferentes enfoques estadísticos para determinar si existe diferenciación genética entre los sitios de muestreo (AMOVA, índices de diferenciación  $F_{ST}$ , bayesiano, ADGP), y en todos los casos hay concordancia en los patrones. Los resultados más robustos son los que otorgan los índices de diferenciación poblacional y el enfoque bayesiano en STRUCTURE. Por un lado los valores de significancia de  $F_{ST}$  indican que todas las comparaciones son

altamente significativas, mientras que STRUCTURE dice que el número más probable de grupos genéticos es de cinco, y que cada grupo genético se encuentra mayormente asociado con una única localidad.

En resumen, los análisis estadísticos sugieren que la localidad del Golfo de Santa Clara presenta una diferenciación antigua respecto a todas las localidades. También dan evidencia de que la localidad de Mulegé posee una identidad genética propia y flujo muy limitado con el resto, con valores de diferenciación más bajos que en el GSC pero con valores de heterocigosidad observada bajos. Por su parte, Guaymas, Bahía de La Paz y Bahía Magdalena presentaron una diferenciación que no fue tan marcada como en los otros casos. Los coeficientes de membresía arrojados por STRUCTURE en esas localidades fueron más bajos que en los otros dos casos (Tabla XIV).

La pregunta obligada al saber que existe fuerte nivel de diferenciación genética en las medusas bola de caño es: ¿Qué factores pueden contribuir a tan marcada diferenciación genética? La presencia de diferenciación genética poblacional implica indirectamente un flujo genético limitado entre las diferentes localidades muestreadas. Independientemente de las barreras que pueden limitar la dispersión de los organismos, las características del ciclo de vida de las especies es uno de los primeros aspectos que vale la pena considerar para lograr comprender los resultados encontrados.

El ciclo de vida de la medusa bola de cañón presenta dos fases: una planctónica y otra bentónica (Calder 1982). En esta especie se desconoce la distribución de la fase bentónica (es decir, la que está representada por los pólipos) y, si bien no se conoce la longevidad en forma precisa, se sabe que son capaces de vivir varios años (Calder 1982). Por otra parte, la de medusa propiamente dicha (fase planctónica) es la que posee movilidad propia y es la más conocida en cuanto a su distribución geográfica (Kramp, 1961; Hsieh y Rudloe, 1994; Hsieh *et al.*, 1996, 2001; López Martínez y Álvarez-Tello, 2013). Si bien son muy nadadoras, lo que les otorga capacidad de dispersión (Rountree, 1983), se ha reportado que *S. meleagris* en algunos casos muestra hábitos muy costeros. Así mismo, existen

indicios de que los desoves se producen en aguas estuarinas, siendo esas regiones poco salinas donde se han observado organismos juveniles (Rountree, 1983). En la localidad de Mulegé, en donde existe un aporte de agua dulce, también se ha reportado que los adultos se encuentran en cercanías de dichas zonas (Ocampo, *com. pers.*). Estas observaciones pueden dar cuenta que las zonas de desove y reproducción se encuentren muy localizadas en áreas poco salinas, aunque es necesario corroborar tales presunciones.

Se ha reportado que en organismos marinos, la duración de la fase larvaria pelágica, puede ser un buen predictor de la diferenciación genética poblacional, existiendo una relación inversa entre la duración de la fase de larva pelágica, y el índice de diferenciación poblacional (Riginos y Victor, 2001). Esto es debido a que una prolongada fase pelágica, puede incrementar las posibilidades de dispersión, ocasionalmente mediada por corrientes, llegando a ser suficiente como para prevenir la existencia de estructura genética. Así mismo, la capacidad de dispersión en animales marinos es frecuentemente asociada con flujo genético (Terry *et al.*, 2000). Tal es el caso de la liebre de mar *A. californica*, en la que no pudo detectarse diferenciación genética desde la costa de California hasta el interior del Alto Golfo de California, en donde se considera su etapa larval la principal responsable, ya que puede llegar a los 35 días (Medina y Walsh, 2000). Descubrimientos similares fueron encontrados por Hurtado *et al.* (2007) para los caracoles *N. scabricosta* y *N. funiculata*, en los que si bien no se reporta la duración exacta de la fase larvaria, se destaca que la misma es extendida y responsable de la falta de diferenciación. Otro ejemplo de esto lo podemos encontrar en la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, en la que no se encontró diferenciación genética al interior del Golfo, en localidades distribuidas desde Bahía de La Paz hasta el Alto Golfo. Esta especie también muestra una fase larval extendida (tres semanas), considerada responsable de la falta de diferenciación (Petersen *et al.*, 2010). El ciclo de vida de la medusa bola de cañón presenta un contraste muy fuerte, ya que si bien no se conoce con gran exactitud la duración de la fase larvaria, se estima que dura aproximadamente tres días (Calder, 1982), por lo que la dispersión durante ese estadio es limitada y esta

conducta ayuda explicar los niveles de diferenciación genética observada en este estudio.

El AMOVA fue utilizado para contrastar diferentes escenarios y determinar qué agrupaciones explican mejor la distribución de la varianza genética tanto dentro como entre localidades. Si bien no es adecuado comparar la significancia estadística de agrupaciones obtenidas a partir de los mismos datos que se utilizan para ponerlas a prueba (algunos modelos provienen del análisis STRUCTURE), es posible comparar los porcentajes de la varianza explicada en cada agrupación (Meirmans, 2015).

El escenario “Dos barreras” representó la hipótesis del presente trabajo, con un grupo en la Región Central del Golfo (GUY, MUL y BAP), separado del Alto Golfo (GSC) por una posible barrera en la región de las grandes islas, y de la costa del océano Pacífico (MAG) por la Península de Baja California. Dicho escenario explicó un porcentaje muy bajo de la varianza (Tabla XII). De entre todos los escenarios probados, el que maximiza la varianza entre grupos, a la vez que la minimiza entre los sitios al interior de los grupos es el de “Una barrera” (sin considerar a la Península de Baja California), lo cual es consistente con muchos otros trabajos realizados en la región (Riginos y Nachman, 2001; Riginos, 2005; Lin *et al.*, 2009), en la que se reconoce la presencia de una barrera al flujo genético en la región de las grandes islas, y se trata de especies con una capacidad de dispersión disminuida. Así mismo, es la misma agrupación encontrada mediante el análisis de ADNmt por Gómez Daglio *et al.* (datos sin publicar).

En resumen, se puede decir que los datos soportan la primera parte de la hipótesis acerca de la barrera a la altura de las grandes islas, pero no lo hacen con la segunda parte, que predice una divergencia entre la localidad de MAG, al exterior del Golfo de California, respecto a las del interior del golfo. A continuación se explican los factores que posiblemente mantienen la diferenciación genética de poblaciones de medusa en el Noroeste de México

### 8.3.1 Diferenciación en el Golfo de Santa Clara

Todos los análisis realizados indican que la localidad de Golfo de Santa Clara conforma un grupo genético independiente. Además estos resultados son concordantes con los encontrados con ADNmt por Gómez Daglio *et al.* (*datos sin publicar*) en los que se detectaron diferencias que sugieren que las medusas del GSC son una especie diferente, pero GUY, MUL, BAP y MAG resultaron ser homogéneos. El elevado polimorfismo de los microsatélites fue capaz de revelar, además de los mismos resultados encontrados con ADNmt, un proceso de diversificación más fina entre las demás localidades. STRUCTURE evidenció un alto grado de pureza genética en el sitio, sin mezcla con los demás grupos, lo que da idea de que el flujo genético entre el GSC y los demás sitios es limitado. Esa idea se ve reforzada por el número de alelos privados y sus frecuencias mayores a las demás localidades, indicando un aislamiento antiguo en el tiempo.

Por otro lado, Girón-Nava *et al.* (2015) mencionan que en el 2012 en el Golfo de Santa Clara ocurrió un *bloom*, el cual fue causado por un elevado éxito reproductivo en la localidad de Las Guásimas (400 km al sur), desde donde las éfiras pudieron ser transportadas por las corrientes hasta el Golfo de Santa Clara y allí encontraron condiciones óptimas para completar su desarrollo. Aunque en ese estudio no se evaluó la genética de poblaciones de las éfiras, es claro que bajo la anterior idea, las medusas del Golfo de Santa Clara deberían presentar una composición genética idéntica o muy parecida a las de Guaymas, sin embargo los resultados encontrados aquí contradicen la hipótesis de Girón-Nava *et al.* (2015).

El proceso geológico de la formación del Golfo de California puede ser de gran relevancia al momento de explicar la diversidad genética de las especies. Se ha propuesto que la región norte del golfo se formó con anterioridad a la sureña dando origen a un *proto-golfo*, aunque la secuencia exacta de pasos durante el proceso no es conocida con claridad (Hurtado *et al.*, 2010). Las explicaciones de cómo se formó el *proto-golfo* han ido evolucionando en la literatura a través del tiempo; se sugirió que el Golfo de California se inundó inicialmente desde la región norte, hace aproximadamente 11 millones de años (Hurtado *et al.*, 2010; Dolby *et*

*al.*, 2015). Por otro lado, sedimentos ricos en fósiles marinos entre la región norte del Alto Golfo y California de 6.3 millones de años de antigüedad (Oskin y Stock, 2003; Bennett, 2013) sugieren que el Alto Golfo se inundó en forma sincrónica desde el sudeste de la Isla Tiburón hasta el sur de California hace aproximadamente seis millones de años. Ledesma-Vázquez (2002) propone que el *proto-golfo* se encontraba inicialmente separado de la región sur, con la que se conectó con posterioridad para formar el presente golfo. De esta manera, es posible que individuos de algunas especies puedan haber ingresado inicialmente, quedando aislados una vez que la península tomó su conformación actual (Dolby *et al.*, 2015). Dicho proceso pudiera haber ocurrido con las poblaciones ancestrales de *S. meleagris*, dando lugar a la huella genética detectada tanto por ADNmt como por los microsátélites. Dadas las diferentes dataciones que existen para los procesos de diversificación, es de gran importancia determinar en forma precisa las estimaciones de tiempos de divergencia para así poner a prueba si los procesos de diferenciación se adecúan a la historia geológica del Golfo de California, a fin de poder establecer una relación causal entre los procesos y los resultados encontrados.

Además de los eventos históricos o geológicos, los procesos climáticos a una escala de tiempo menor, como los períodos glaciales, seguramente también pudieron contribuir a limitar el flujo genético de las especies marinas. Las bajas temperaturas y el avance de los glaciares durante dichos períodos, provocaron una disminución del nivel del mar, la cual pudo llegar hasta de 120 metros, esto determinó el contorno de la línea de costa (Dolby *et al.*, 2015). El último período glacial (ocurrido aproximadamente hace 20.000 años; Betancourt *et al.*, 1990; Hijmans *et al.*, 2005) produjo un retroceso en el nivel del mar tal, que en el caso de la Península de Baja California, la línea de costa avanzó sobre el golfo de modo que en la región de las grandes islas se generó un mayor aislamiento. En ese contexto, el menor nivel del mar pudo haber limitado el flujo genético aún más que en la actualidad. Cabe destacar que al menos en el último millón de años hay registro de unos seis máximos glaciares, lo que da idea de que este proceso

recurrente puede darse a lo largo del tiempo contribuyendo a la diferenciación genética.

Cabe destacar que mas allá de que en el pasado hayan existido factores geológicos que contribuyeran al aislamiento, una conectividad actual entre las poblaciones rápidamente generaría que las frecuencias alélicas se homogenicen entre las localidades, borrando la señal de estructuración. En ese sentido, los profundos canales presentes en el complejo de las grandes islas (Ainsworth *et al.*, 2011), así como también los patrones de circulación como los frentes oceanográficos (Pegau *et al.*, 2002; Marinone, 2003) pueden ser causantes de limitar el flujo genético en algunas regiones, para el caso de la medusa bola de cañón ésta falta de conectividad se vio reflejado en los altos niveles de diferenciación revelados por los *loci* microsatelites. Es necesario continuar con los trabajos de investigación que evalúen la presencia de dichos frentes con miras a evidenciar los procesos de conectividad biológica en el Golfo.

### **8.3.2 Diferenciación en Mulegé**

En las poblaciones aisladas, la única fuente de nuevos alelos es mediante la mutación (Nei *et al.*, 1975), por lo que ante ausencia de flujo genético, los mismos se acumularán en dicha localidad. Las características de Mulegé (aislamiento y baja diversidad) en conjunto con la prácticamente ausencia de alelos privados son señales muy claras de que las medusas de esta región sufrieron un cuello de botella genético, en el que se produce una marcada disminución de la diversidad genética y la frecuencia en la que se encuentran los alelos. Simplemente por azar, es posible que alelos que se encuentren en muy baja proporción en la población de origen, pasen a estar en frecuencias muy elevadas y viceversa, dando señal de una diferenciación marcada. Las características presentes en Mulegé son cualidades propias del cuello de botella que se pudo producir por el efecto fundador de muy pocos individuos, con crecimiento poblacional acelerado a partir de los mismos (Nei *et al.*, 1975), además, este proceso pudo ocurrir recientemente.

### 8.3.4 Diferenciación de Guaymas, Bahía La Paz y Bahía Magdalena

Los estudios filogeográficos realizados en la flora y fauna terrestre de la Península de Baja California ha dejado latente la hipótesis que la existencia de varios canales inter-peninsulares a lo largo de la península funcionaron como barreras físicas impidiendo el flujo genético de los linajes de uno y otro lado de dichos canales (Riddle *et al.*, 2000; Munguía-Vega, 2011). Para el caso de la ictiofauna marina, Riginos (2005) propone que la presencia del hipotético canal a la altura del desierto del Vizcaíno ( $27^{\circ}$  N) pudo haber representado una barrera al flujo genético para cinco especies de peces que habitan en sitios rocosos de poca profundidad. Aunque para muchos organismos terrestres, este canal pudo representar una barrera, según Dolby *et al.* (2015) pudo representar un corredor para muchas otras especies marinas. Bajo ese panorama, los resultados de este estudio deberían mostrar una diferenciación genética baja entre las localidades de MAG y MUL (y posiblemente GUY), ya que dicho canal podría haber posibilitado conexión entre ellas. Sin embargo, los datos obtenidos no soportan esa hipótesis, ya que el valor de diferenciación entre MUL-MAG es elevado ( $F_{ST}=0.16$ ), aunque como se mencionó anteriormente, la localidad de Mulegé presenta características que permiten inferir que es un sitio de reciente colonización. Para poner a prueba esa hipótesis con una mayor certeza, sería interesante realizar el estudio incorporando muestras de Santa Rosalía y del sur del complejo de las grandes islas. Así mismo, es necesario tener estimaciones certeras de las tasas de divergencia entre dichas localidades así como de las tasas de mutación de los marcadores utilizados.

En resumen, los análisis realizados permitieron evidenciar una diferenciación genética poblacional subyacente, la cual es de gran importancia para lograr comprender los procesos evolutivos que le dieron origen a las medusas a la luz de la historia geológica y climática de la región. Dichos fenómenos tienen importancia no solo para el lado de la ciencia que busca comprender los procesos, la ciencia pura como se la define, sino que también es relevante para lograr una correcta preservación del recurso. En ese sentido, es interesante recalcar que la

*preservación* propiamente dicha, hace alusión a la conservación de los recursos y su uso responsable. Es por ello que los resultados del presente trabajo deben necesariamente ser incluidos en las regulaciones planteadas en la Carta Nacional Pesquera de México, con miras a realizar un correcto manejo de la pesquería de la medusa bola de cañón teniendo en cuenta la estructura poblacional detectada. Dados los altos volúmenes de producción que ocasionalmente mostró la localidad del Golfo de Santa Clara, y el impulso y derrama económica que se creó sobre la sociedad local, es aún de mayor importancia que el manejo se realice teniendo en cuenta que las medusas del lugar poseen una identidad genética propia, y que se encuentran asiladas de las otras poblaciones.

## 9. CONCLUSIONES

En general los análisis realizados hasta el momento han generado información novedosa respecto a la medusa bola de cañón en el Golfo de California, evidenciando una estructura genética poblacional con una marcada diferenciación entre todas las localidades bajo estudio. Así mismo, dicha diferenciación no es de la misma magnitud en todas esas localidades, sino que existen algunas con mayor divergencia, como el Golfo de Santa Clara o Mulegé, y otras que permanecen aisladas pero que aun están conectadas por flujo genético mayor entre sí, como sucede entre Guaymas, Bahía de la Paz y Bahía Magdalena. Las principales conclusiones del trabajo se resumen a continuación:

- Se encontraron resultados que concuerdan con los análisis realizados sobre marcadores mitocondriales, otorgando una mayor resolución sobre procesos de diferenciación poblacional no capturados por el ADNmt.
- Tanto  $F_{ST}$ , STRUCTURE, como AMOVA y DAPC identificaron una diferenciación genética entre todos los sitios de estudio, la cual puede ser explicada por las características de los individuos así como por la historia geológica y climática de la región.

- En el presente trabajo se ve una divergencia muy antigua en el Golfo de Santa Clara por un lado, y muy reciente en Mulegé por el otro.
- El Golfo de Santa Clara es la localidad que presenta mayor divergencia, la cual se sugiere que es muy antigua, lo cual va acorde a los resultados con otros marcadores mitocondriales.
- La localidad de Mulegé presenta una identidad genética propia, caracterizada por una muy baja diversidad y la presencia de un posible cuello de botella genético.
- Se detectó diferenciación genética significativa entre Guaymas, Bahía de La Paz y Bahía Magdalena, la cual no fue de tanta magnitud como con el Golfo de Santa Clara y Mulegé, concluyendo que el flujo genético es de mayor magnitud entre estas localidades que con MUL y GSC.
- La estructura genética observada en la medusa bola de cañón es ampliamente relevante en el contexto del desarrollo de la pesquería en la región y la regulación de la misma.

## 10. LITERATURA CITADA

- Aglieri G., C. Papetti, L. Zane, G. Milisenda, F. Boero, S. Piraino. 2014. First evidence of inbreeding, relatedness and chaotic genetic patchiness in the holoplanktonic jellyfish *Pelagia noctiluca* (Scyphozoa, Cnidaria). PLoS One. 9(6): e99647-e99647
- Ainsworth C.H., I.C. Kaplan, P.S. Levin, R. Cudney-Bueno, E.A. Fulton, M. Mangel, P. Turk-Boyer, J. Torre, A. Pares-Sierra, H.N. Morzaria Luna. 2011. Atlantis Model Development for the Northern Gulf of California. U.S. Dept. Commer. NOAA Tech. Memo. NMFS-NWFSC-110, 293 p
- Antao T., A. Lopes, R.J. Lopes, A. Beja-Pereira, G. Luikart. 2008. LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a Fst-outlier method. BMC Bioinformatics. 9:323.
- Arai M.N. 2008. The potential importance of podocysts to the formation of scyphozoan blooms: a review. Hydrobiologia. 616:241–246.
- Aubert H., D.V. Lightner. 2000. Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. Mar. Biol. 137:875–885.
- Beaumont M.A., R.A. Nichols. 1996. Evaluating *loci* for use in the genetic analysis of population structure. Proc. R. Soc. London B Biol. Sci. 236:1619–1626.
- Ben Faleh A., A. Ben Othmen, T. Deli, A. Annabi, K. Said. 2009. High genetic homogeneity of the moon jelly *Aurelia aurita* (Scyphozoa, Semaestomeae) along the Mediterranean coast of Tunisia. African J. Mar. Sci. 31:73–80.
- Bennett S.E.K. 2013. The Role of Rift Obliquity in Formation of the Gulf of California. Tesis doctoral. Department of Geology. Department of Geology
- Bernardi G., L. Findley, A. Rocha-Olivares. 2003. Vicariance and dispersal across Baja California in disjunct marine fish populations. Evolution. 57:1599–1609.
- Bernardi G. 2014. Baja California disjunctions and phylogeographic patterns in sympatric California blennies. Front. Ecol. Evol. 2:1–9.

- Betancourt J.L., T.R. Van Devender, P.S. Martin. 1990. *Packrat Middens: The Last 40,000 Years of Biotic Change*. Tucson, Arizona: University of Arizona Press.
- Bonin A., E. Bellemain, P. Bronken Eidesen, F. Pompanon, C. Brochmann, P. Taberlet. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol. Ecol.* 13:3261–3273.
- Bruvo R., N.K. Michiels, T.G. D'Souza, H. Schulenburg. 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol. Ecol.* 13:2101–2106.
- Calder D.R. 1982. Life history of the cannonball jellyfish, *Stomolophus meleagris* L. agassiz, 1860 (Scyphozoa, Rhizostomida). *Biol. Bull.* 1860162:149–162.
- Carlsson J. 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *J. Hered.* 99:616–623.
- Carvalho G.R., T.J. Pitcher. 1995. Molecular genetics in fisheries. *Oceanogr. Lit. Rev.* 42:892.
- Carvalho Saucedo L.C., J.L. Martínez, F.G. Domínguez. 2012. Fecundidad de la medusa *Stomolophus meleagris* (Rhizostomeae: Stomolophidae) en el Golfo de California. *Rev. Biol. Trop.* 60:1721–1729.
- Chapuis M.P., A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24:621–631.
- Clark L.V., M. Jaseieniuk. 2011. Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 11:562–566.
- Dawson M.N. 2005. Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia. *J. Biogeogr.* 32:515–533.
- De La Rosa-Velez J., R. Escobar-Fernandez, F. Correa, M. Maqueda-Cornejo, J. De La Torre-Cueto. 2000. Genetic structure of two commercial penaeids (*Penaeus californiensis* and *P. stylirostris*) from the Gulf of California, as revealed by allozyme variation. *Fish. Bull.* 98:674–683.
- Dempster A.P., M.N. Laird, D.B. Rubin. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *J. R. Stat. Soc.* 39:1–38.

- Dolby G.A., S.E.K. Bennett, A. Lira-Noriega, B.T. Widler, A. Munguía-Vega. 2015. Assessing the geological and climatic forcing of biodiversity and evolution surrounding the Gulf of California. *J. Southwest.* 57:391–455.
- Earl D.A., M.B. VonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4:539–361.
- Evanno G., S. Regnaut, J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14:2611–2620.
- Excoffier L., H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10:564–567.
- Excoffier L., P.E. Smouse, J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 131:479–491.
- Falush D., M. Stephens, J.K. Pritchard. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked *Loci* and Correlated Allele Frequencies. *Genetics.* 164:1567–1587.
- Finger A., J. Ghazoul, M. Todd, C. Kaiser-Bunbury, C. Kettle. 2010. Development of thirteen polymorphic microsatellite markers for the Seychelles endangered and endemic jellyfish tree *Medusagyne oppositifolia* (Medusagynaceae). *Conserv. Genet. Resour.* 2:173–175.
- George C., J.R. Gorman. 1979. Genetic Distance and Heterozygosity Estimates in Electrophoretic Studies: Effects of Sample Size. *Copeia.* 1979:242–249.
- Girón-Nava A., C. López-Sagástegui, O. Aburto-Oropeza. 2015. On the conditions of the 2012 cannonball jellyfish (*Stomolophus meleagris*) bloom in Golfo de Santa Clara: a fishery opportunity? *Fish. Manag. Ecol.* 22(3):261–264.
- Gomi S.L. 1980. Variación estacional de grandes medusas (Scyphozoa) en un sistema de lagunas costeras del sur del golfo de México (1977/1978). *Bol. do Inst. Ocean.* 29:183–185.
- Hauser L., G.J. Adcock, P.J. Smith, J.H.B. Ramírez, G.R. Carvalho. 2002. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited

- population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). Pnas 99, 11742–11747.
- Hijmans R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones, A. Jarvis. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. Int. J. Climatol. 25:1965–1978.
- Hsieh Y.P., F. Leong, K.W. Barnes. 1996. Inorganic constituents in fresh and processed cannonball jellyfish (*Stomolophus meleagris*). J. Agric. Food Chem. 44:3117–3119.
- Hsieh Y.P., F. Leong, J. Rudloe. 2001. Jellyfish as food. Hydrobiologia. 451:11–17.
- Hsieh Y.P., J. Rudloe. 1994. Potential of utilizing jellyfish as food in Western countries. Trends Food Sci. Technol. 5:225–229.
- Huang D., G. Bernardi. 2001. Disjunct Sea of Cortez-pacific ocean *Gillichthys mirabilis* populations and the evolutionary origin of their Sea of Cortez endemic relative, *Gillichthys seta*. Mar. Biol. 138:421–428.
- Huang Y. 1988. Cannonball Jellyfish (*Stomolophus meleagris*) as a Food Resource. J. Food Sci. 53:341–343.
- Hurtado L.A., M. Frey, P. Gaube, E. Pfeiler, T.A. Markow. 2007. Geographical subdivision, demographic history and gene flow in two sympatric species of intertidal snails, *Nerita scabricosta* and *Nerita funiculata*, from the tropical eastern Pacific. Mar. Biol. 151:1863–1873.
- Hurtado L.A., M. Mateos, C.A. Santamaria. 2010. Phylogeography of supralittoral rocky intertidal ligia isopods in the Pacific region from central California to central Mexico. PLoS One. 5:e11633.
- Jakobsson M., N.A. Rosenberg. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics. 23:1801–1806.
- Jombart T. 2008. Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. Bioinformatics. 24:1403–1405.
- Kalinowski S.T., 2005. Do polymorphic *loci* require large sample sizes to estimate genetic distances? Heredity. 94: 33–36.
- Kramp P.L. 1961. Synopsis of the medusae of the world. J. Mar. Biol. Assoc. 40:7–496.

- Ledesma-Vázquez J. 2002. A gap in the Pliocene invasion of seawater to the Gulf of California. *Rev. Mex. Ciencias Geol.* 19:145–151.
- Lin H.C., C. Sánchez-Ortiz, P.A. Hastings. 2009. Colour variation is incongruent with mitochondrial lineages: cryptic speciation and subsequent diversification in a Gulf of California reef fish (Teleostei: Blennioidei). *Mol. Ecol.* 18:2476–88.
- López Martínez J., J. Álvarez-Tello. 2013. The jellyfish fishery in Mexico. *Agric. Sci.* 04:57–61.
- Lowe W.H., F.W. Allendorf. 2010. What can genetics tell us about population connectivity? *Mol. Ecol.* 19:3038–51.
- Marinone S.G. 2003. A three-dimensional model of the mean and seasonal circulation of the Gulf of California. *J. Geophys. Res.* 108:1–27.
- Medina M., P.J. Walsh. 2000. Comparison of Four Mendelian *Loci* of the California Sea Hare (*Aplysia californica*) from Populations of the Coast of California and the Sea of Cortez. *Mar. Biotechnol.* 2:449–455.
- Meek M.H., A. Wintzer, N. Shepherd, B. May. 2012. Genetic diversity and reproductive mode in two non-native hydromedusae, *Maeotias marginata* and *Moerisia sp.*, in the upper San Francisco Estuary, California. *Biol. Invasions.* 15:199–212.
- Meirmans P.G. 2015. Seven common mistakes in population genetics and how to avoid them. *Mol. Ecol.* 24:3223–3231.
- Miller B., S. Von der Heyden, M. Gibbons. 2012. Significant population genetic structuring of the holoplanktic scyphozoan *Pelagia noctiluca* in the Atlantic Ocean. *African J. Mar. Sci.* 34:425–430.
- Mungaray J.V. 2007. La Medusa Bola de Cañón: Un producto marino muy apreciado en Oriente es abundante en las costas de Sonora. *Revista SonoraEs* 41:14–15.
- Munguía-Vega A. 2011. Habitat Fragmentation in Small Vertebrates from the Sonoran Desert in Baja California. Tesis doctoral. University of Arizona, Tucson.
- Myers N., R.A. Mittermeier, C.G. Mittermeier, G.A. da Fonseca, J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:853–8.

- Nei M., T. Maruyama, R. Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*. 29:1–10.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89:583–590.
- Nielsen E.E., M.M. Hansen, D. Meldrup. 2006. Evidence of microsatellite hitchhiking selection in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): implications for inferring population structure in nonmodel organisms. *Mol. Ecol.* 15:3219–3229.
- Omori M., E. Nakano. 2001. Jellyfish fisheries in southeast Asia. *Hydrobiologia*. 451:19–26.
- Oskin M., J.M. Stock. 2003. Marine incursion synchronous with plate-boundary localization in the Gulf of California. *Geology*. 31:23–26.
- Padilla-Serrato J.G., J. López-Martínez, A. Acevedo-Cervantes, E. Alcántara-Razo, C.H. Rábago-Quiroz. 2013. Feeding of the scyphomedusa *Stomolophus meleagris* in the coastal lagoon Las Guásima, northwest Mexico. *Hidrobiologica*. 23:218–226.
- Palo J.U., R.B. O'Hara, A. Laugen, A. Laurila, C.R. Primmer, J. Merilä. 2003. Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural selection: evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data. *Mol. Ecol.* 12:1963–1978.
- Patterson N., A.L. Price, D. Reich. 2006. Population Structure and Eigenanalysis. *PLoS Genet.* 2:e190.
- Pegau W.S., E. Boss, A. Marti. 2002. Ocean color observations of eddies during the summer in the Gulf of California. *Geophys. Res. Lett.* 29:1–3.
- Petatán Ramírez D. 2014. Propuesta de zonación del Golfo de California con base en variables oceanográficas y distribución de Macro invertebrados. Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas.
- Petersen J.L., A.M. Ibarra, B. May. 2010. Nuclear and mtDNA lineage diversity in wild and cultured Pacific lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus* (Baja California Peninsula, Mexico). *Mar. Biol.* 157:2751–2767.
- Pompanon F., A. Bonin, E. Bellemain, E. Taberlet. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nat. Rev. Genet.* 6:847–859.

- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155:945–959.
- R Development Core Team. 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: the R Foundation for Statistical Computing.
- Ramšak A., K. Stopar, A. Malej. 2012. Comparative phylogeography of meroplanktonic species, *Aurelia spp.* and *Rhizostoma pulmo* (Cnidaria: Scyphozoa) in European Seas. *Hydrobiologia*. 690:69–80.
- Reusch T.B.H., S. Bolte, M. Sparwel, A.G. Moss, J. Javidpour. 2010. Microsatellites reveal origin and genetic diversity of Eurasian invasions by one of the world's most notorious marine invader, *Mnemiopsis leidyi* (Ctenophora). *Mol. Ecol.* 19:2690–9.
- Rice W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225.
- Riddle B.R., D.J. Hafner, L.F. Alexander, J.R. Jaeger. 2000. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California peninsular desert biota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:14438–14443.
- Riginos C., M.W. Nachman. 2001. Population subdivision in marine environments: the contributions of biogeography, geographical distance and discontinuous habitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Mol. Ecol.* 10:1439–1453.
- Riginos C., B.C. Victor. 2001. Larval spatial distributions and other early life-history characteristics predict genetic differentiation in eastern Pacific blennioid fishes. *Proc. Biol. Sci.* 268:1931–1936.
- Riginos C. 2005. Cryptic vicariance in Gulf of California fishes parallels vicariant patterns found in Baja California mammals and reptiles. *Evolution*. 59:2678–2690.
- Rosenberg N. 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Mol. Ecol. Notes*. 4:137–138.
- Rountree R.A. 1983. The ecology of *Stomolophus meleagris*, the cannon ball jellyfish, and its symbionts, with special emphasis on behavior. Thesis doctoral. Universidad de Carolina del Norte, Wilmington. 70pp.
- Rousset F. 2008. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8:103–106.

- SAGARPA. 2012. Carta Nacional Pesquera. Diario Oficial de la Federación, 24 de Agosto de 2012. p 21–128.
- Sambrook J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2d ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schaal B.A., D. Hayworth, K. Olsen, J.T. Rauscher, W.A. Smith. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol. Ecol.* 7:465–474.
- Schlötterer C. 2004. The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? *Nat. Rev.* 5:64–69.
- Selkoe K.A., R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 9:615–29.
- Shaw P.W., G.J. Pierce, P.R. Boyle. 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Mol. Ecol.* 8:407–417.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics.* 462:457–462.
- Stopar K., A. Ramsak, P. Trontelj, A. Malej. 2010. Lack of genetic structure in the jellyfish *Pelagia noctiluca* (Cnidaria: Scyphozoa: Semeostomeae) across European seas. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57:417–28.
- Terry A., G. Bucciarelli, G. Bernardi. 2000. Restricted gene flow and incipient speciation in disjunct Pacific Ocean and Sea of Cortez populations of a reef fish species, *Girella nigricans*. *Evolution.* 54:652–659.
- Thorpe, J.E., J.F. Koonce, D. Borgeson, B. Henderson, A. Lamsa, P.S. Maitland, M.A. Ross, R.C. Simon, C. Walters. 1981. Assessing and managing man's impact on fish genetic resources. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38:1899–1907.
- Van Oosterhout C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Willis, P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes.* 4:535–538.
- Wahlund S. 1928. Zusammensetzung von Population und Korrelationserscheinung vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas.* 11:65–106.

- Walker B.W. 1960. The distribution and affinities of the marine fish fauna of the Gulf of California. *Syst. Zool.* 9:123–133.
- Waples R.S, O. Gaggiotti. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol. Ecol.* 15:1419–39.
- Weir B.S., C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38:1358–1370.
- Zhu L, A. Yang, C. Zhou, H. Yang, X. Luo, S. Chen, Z. Zhuang. 2015. Characterization of 15 polymorphic microsatellite *loci* for the jellyfish *Rhopilema esculentum*. *Conserv. Genet. Resour.* 7:551–556.

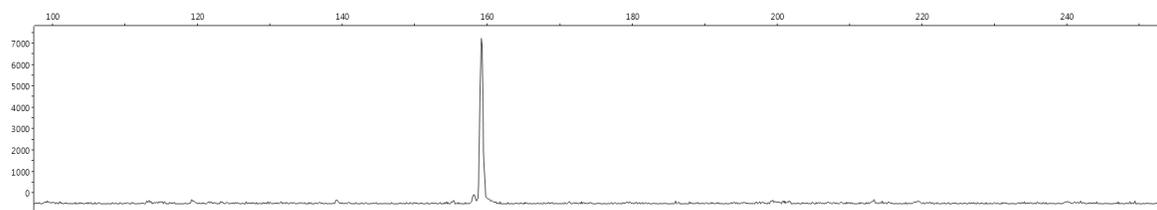
## **ANEXO I: Calibración entre ABI PRISM 310 y ABI 3500 *Genetic Analyzer***

Los individuos de la localidad de La Paz fueron genotipificados en un secuenciador *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* de forma previa al presente estudio. Los genotipos obtenidos en dicho equipo poseen pequeñas diferencias con respecto a los que arroja *3500 Genetic Analyzer*, las cuales están dadas por una migración de los fragmentos diferente en cada equipo, asociada a los diferentes tipos de polímero que se utiliza en cada uno. Ello introduce pequeñas diferencias en la estimación del tamaño de los picos entre ambos equipos por lo que fue necesario realizar una calibración entre ambos. Para esto se genotipificaron entre ocho y 10 individuos de la localidad de La Paz para cada microsatélite, utilizando *3500 Genetic Analyzer* de modo de establecer una correspondencia entre el tamaño de los alelos obtenido a partir de ambos equipos. Los individuos fueron elegidos de modo que se abarcara la mayoría de los alelos existentes para cada microsatélite

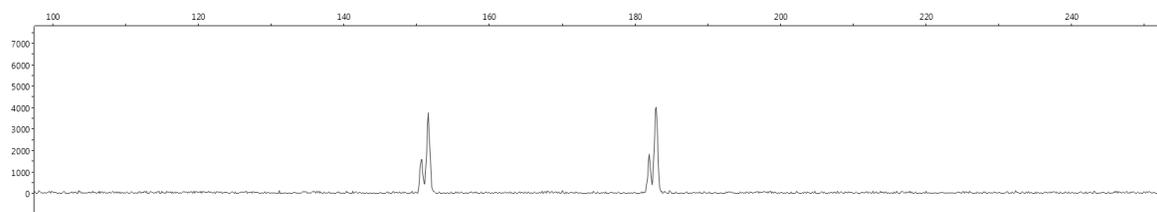
La correspondencia entre el tamaño de los alelos obtenidos a partir de ambas plataformas consistente en las diferencias obtenidas en cada uno a lo largo de los diferentes alelos. En el caso de Smel 29 y Smel 25, no se observaron diferencias y el tamaño obtenido en ABI 3500 fue igual al de ABI PRISM 310. Por su parte, Smel 09, Smel 15 y Smel 27 arrojaron fragmentos con un solo par de bases más grande en que en ABI PRISM 310, mientras que para los *loci* Smel 08, 10 y 26, el tamaño observado fue de dos pares de bases más grande que en ABI PRISM 310; y finalmente el locus Smel 05 arrojó fragmentos tres pares de bases más grandes. Estas pruebas permitieron transformar el tamaño de los alelos del trabajo previo, ahorrando tanto tiempo de trabajo como reactivos químicos.

## ANEXO II: Electroferogramas obtenidos para los nueve *loci* utilizados

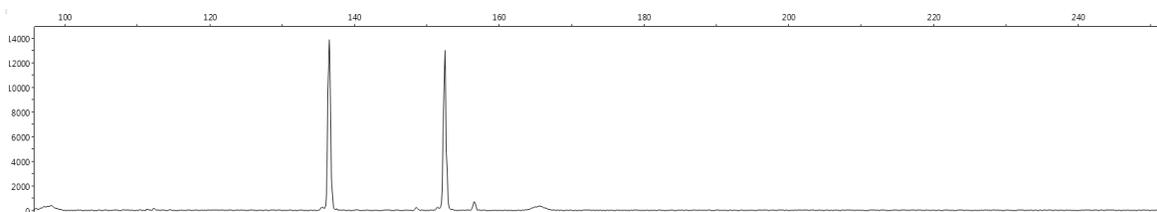
### Smel 05



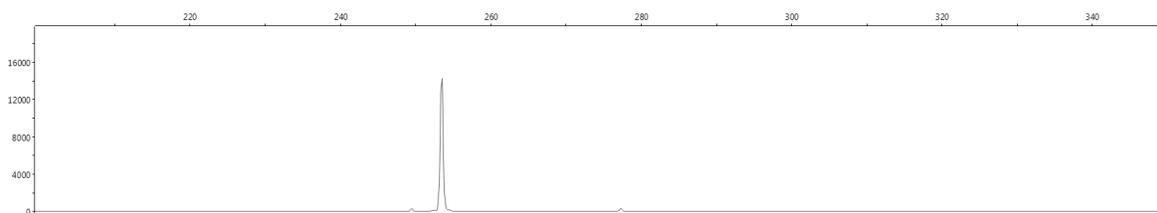
### Smel 08

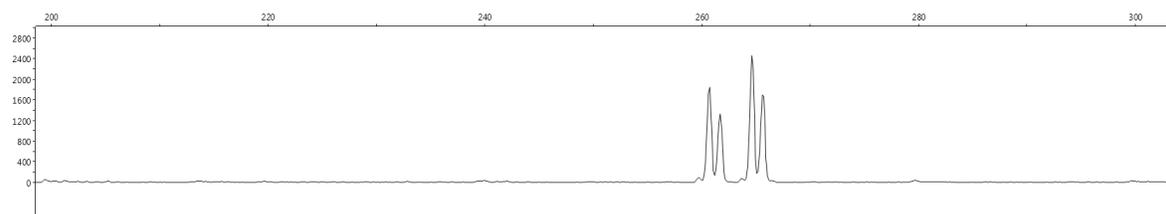
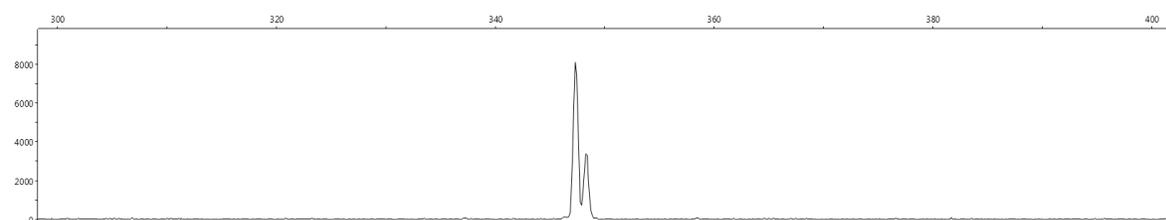
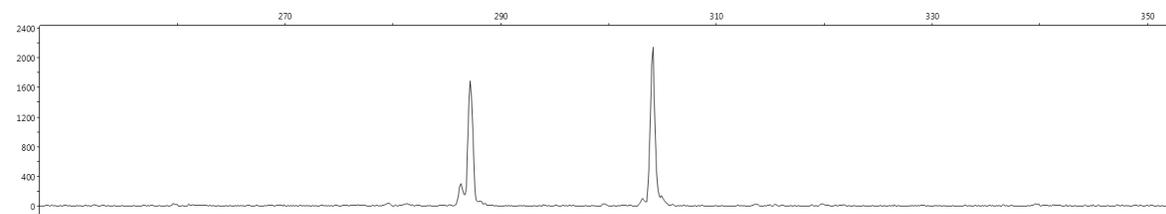
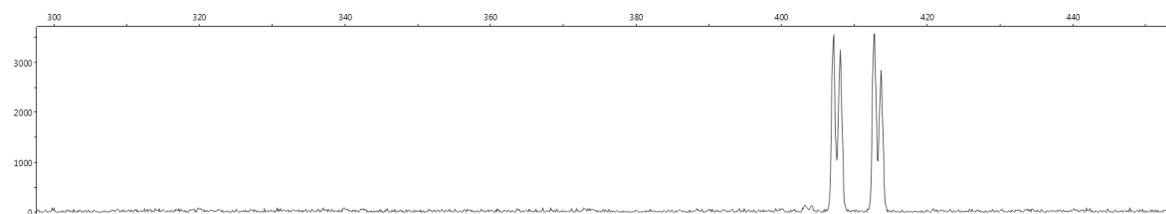


### Smel 09



### Smel 10



**Smel 15****Smel 25****Smel 26****Smel 27****Smel 29**