



Terror cósmico. Rufino Tamayo, 1954.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Diversidad Genética y Morfometría de
Fissurella virescens en el Pacífico Oriental
Tropical**

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y
Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

Arizbeth Alonso Domínguez

Zapopan, Jalisco

16 de Diciembre de 2013



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Diversidad Genética y Morfometría de *Fissurella virescens* en el Pacífico Oriental Tropical

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo
de Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

Arizbeth Alonso Domínguez

Director

Dr. Eduardo Ríos Jara

Co-director

Dra. Ofelia Vargas Ponce

Zapopan, Jalisco

16 de Diciembre de 2013



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

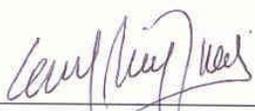
Diversidad Genética y Morfometría de *Fissurella virescens* en el Pacífico Oriental Tropical.

Por

Biol. Arizbeth Alonso Domínguez

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos
Naturales y Agrícolas

Aprobado por:



Dr. Eduardo Ríos Jara
Director de Tesis e integrante del jurado

4 Dic 2013
Fecha



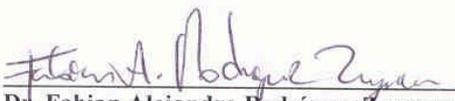
Dra. Ofelia Vargas Ponce
Co-Director de Tesis e integrante del jurado

4 Dic 2013
Fecha



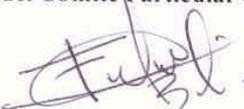
Dr. Carlos González Salas
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

4-12-2013
Fecha



Dr. Fabian Alejandro Rodríguez Zaragoza
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

4 / Dic / 2013
Fecha



Dr. Ernesto López Uriarte
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

4 / Dic / 2013
Fecha

A mis padres, por todo

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Humberto Alonso y Yolanda Domínguez, por su cariño. Y por financiar parte de esta tesis, por ayudarme en algunas colectas y por todo ese tiempo perdido en la playa.

A mis directores de tesis Dr. Eduardo Ríos Jara y Dra. Ofelia Vargas Ponce por su apoyo para realizar este trabajo. Por su paciencia y su tiempo, por lo consejos y los regaños y todas las enseñanzas que me dejaron.

Al mis sinodales, Dr. Fabián Alejandro Rodríguez Zaragoza y Dr. Ernesto López Uriarte por sus consejos y sus aportes a este trabajo. En especial al Dr. Carlos González Salas por su ayuda y disposición durante mi estancia en la Universidad de Yucatán.

A mis profesores que durante este tiempo siempre me apoyaron y me dieron un buen consejo.

Al Laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Botánica del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara y a todos los que trabajan ahí por el apoyo prestado para la realización de la parte genética de este trabajo.

Al Laboratorio de Ecosistemas Marinos y Acuicultura y a las personas que lo componen, por permitirme trabajar y realizar la parte morfométrica de esta tesis.

Al proyecto PROMEP (103.5/08/2919 y 103.5/10/927) dirigido por el Dr. Fabián Alejandro Rodríguez Zaragoza gracias al cual se realizó el trabajo de campo en las playas de Isla Isabel.

Al proyecto CONABIO (Ref. HJ026) dirigido por el Dr. Luis Calderón Aguilera que permitió la colecta de los especímenes de la playa Cuastecomate.

Al Dr. Félix Rodríguez por su apoyo en la colecta de *Fissurella virescens* en las playas de Panamá.

A la cuasidoctora Dafne Bastida, por su apoyo en las colectas, por su amistad y cariño, por sus consejos para mejorar este trabajo y por desvelarse conmigo.

A mis amigos del Laboratorio de Sistemática Molecular por ayudarme tanto y enseñarme todo lo que necesitaba saber sobre extracciones de ADN, PCRs y geles de acrilamida. A Pilar Zamora, Luis Villa y Georgina Vargas, mil gracias por todo, sobre todo por su amistad.

A mis amigos porque siempre estuvieron ahí para dar consejos ayudarme o escucharme Carmen Esqueda, Ceciel Caravantes, Cristian Galván, Leslie Martínez, Carolina Magaña, Arlet Estévez.

A Norma Barrientos Lujan por su ayuda y todo el apoyo para la búsqueda de especímenes en Oaxaca. Gracias.

A la Universidad de Guadalajara por todo el apoyo prestado.

A las *Fissurella virescens* que son las principales protagonistas de este trabajo.

ÍNDICE

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS | vi |
| LISTA DE CUADROS | viii |
| LISTA DE ANEXOS | ix |
| RESUMEN | x |
| ABSTRACT | xi |
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| <i>Fissurella virescens</i> | 3 |
| OBJETIVOS | 5 |
| Objetivo general..... | 5 |
| Objetivos particulares..... | 5 |
| HIPÓTESIS | 5 |
| ÁREA DE ESTUDIO | 6 |
| Sitios de muestreo..... | 7 |
| Bahía de Mazatlán, Sonora..... | 7 |
| Isla Isabel, Nayarit..... | 7 |
| Bahía Banderas, Jalisco..... | 8 |
| Bahía de Chamela, Jalisco..... | 8 |
| Cuastecomate, Jalisco..... | 9 |
| Ixtapa, Guerrero..... | 9 |
| Panamá..... | 9 |
| LITERATURA CITADA | 10 |
| | |
| CAPÍTULO 1. MORFOMETRÍA DE <i>Fissurella virescens</i> EN EL PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL | 17 |
| Introducción..... | 17 |
| Materiales y métodos..... | 19 |
| Área de estudio..... | 19 |
| Análisis morfométrico..... | 20 |
| Morfometría geométrica..... | 20 |
| Morfometría Tradicional..... | 22 |

| | |
|--|-----------|
| Elipses de Fourier..... | 23 |
| Resultados..... | 26 |
| Morfometría geométrica..... | 26 |
| Morfometría tradicional..... | 29 |
| Elipses de Fourier..... | 33 |
| Discusión..... | 36 |
| Literatura citada..... | 40 |
| CAPÍTULO 2. DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE <i>Fissurella</i> | |
| <i>virescens</i> EN EL PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL..... | 46 |
| Introducción..... | 46 |
| Materiales y métodos..... | 48 |
| Material estudiado..... | 48 |
| Generación de marcadores moleculares ISSR..... | 48 |
| Análisis de datos..... | 50 |
| Diversidad genética..... | 50 |
| Diferenciación genética..... | 50 |
| Resultados..... | 52 |
| Diversidad genética..... | 52 |
| Diferenciación genética..... | 53 |
| Discusión..... | 56 |
| Diversidad genética..... | 56 |
| Diferenciación genética..... | 59 |
| Literatura citada..... | 63 |
| CAPÍTULO 3. ESTRUCTURA GÉNÉTICA DE POBLACIONES DE <i>Fissurella</i> | |
| <i>virescens</i> EN EL PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL..... | 69 |
| Introducción..... | 69 |
| Materiales y métodos..... | 72 |
| Recolecta de muestras..... | 72 |
| Extracción y cuantificación de ADN..... | 72 |
| Generación de marcadores moleculares ISSR..... | 72 |
| Análisis de datos..... | 73 |

| | |
|------------------------------------|-----------|
| Resultados..... | 74 |
| Discusión..... | 78 |
| Literatura citada..... | 81 |
| DISCUSIÓN GENERAL..... | 85 |
| CONCLUSIONES GENERALES..... | 88 |
| LITERATURA CITADA..... | 90 |
| ANEXOS..... | 92 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura A. Sitios de muestreo en el Pacífico oriental tropical..... | 7 |
| Figura 1.1. Landmarks digitalizados en <i>Fissurella virescens</i> . a) Landmarks utilizados para calcular el centroide a partir del cual se genera el abanico que permite elegir los semilandmarks. A y C representan la parte más larga de la concha, mientras B y D se encuentran a altura del final del foramen. b) Los veinte semilandmarks utilizados para el análisis de morfometría geométrica..... | 22 |
| Figura 1.2. Diagrama de dispersión del análisis de funciones discriminantes de la morfometría geométrica de las siete poblaciones de <i>Fissurella virescens</i> estudiadas..... | 28 |
| Figura 1.3. Gradilla de deformación creada con veinte landmarks que describen la forma general de <i>F. virescens</i> , generada con 255 individuos de siete poblaciones. Las flechas más grandes señalan en donde hay mayor variación..... | 29 |
| Figura 1.4. Diagrama de dispersión del análisis discriminante canónico, basado en siete variables utilizadas para describir la forma de la concha de <i>F. virescens</i> provenientes de siete poblaciones. Se muestran las dos primeras discriminantes describen el 94% de la variación..... | 31 |
| Figura 1.5. Análisis PCA de siete poblaciones de <i>F. virescens</i> estudiadas. a) separación de las poblaciones usando los dos primeros componentes principales del PCA b) proyección de las variables Altura (A), Largo (L), relación largo/ancho (L/An), Ancho del Foramen (AnF), Largo del Foramen (LF) y relación largo/ancho del foramen (LF/AnF) en los dos primeros componentes principales del PCA que explican el 83.3% de las diferencias..... | 32 |
| Figura 1.6. Poder de Fourier acumulado. Con los primeros 6 armónicos se describe el 99.99% de la forma..... | 33 |
| Figura 1.7. Diagrama de dispersión del análisis discriminante canónico basado en 20 coeficientes de Fourier que describen la forma de la concha de <i>F. virescens</i> . Estas dos discriminantes describen el 59% de la variación..... | 34 |
| Figura 2.1. Dendrograma generado con UPGMA y distancias genéticas de Nei (1978)..... | 54 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.1. Análisis de asignación Bayesiana calculado con el programa Structure (Pritchard <i>et al.</i> , 2000). Se presenta el coeficiente de ancestría calculado (q) agrupado por población ($k=7$). Cada individuo se representa con una línea vertical, 1) Mazatlán, 2) Isla Isabel, 3) Bahía Banderas, 4) Bahía de Chamela, 5) Cuastecomate 6) Ixtapa y 7) Panamá..... | 75 |
| Figura 3.2. Agrupamiento de las poblaciones en el que se sugiere tres grupos génicos de las poblaciones de <i>Fissurella virescens</i> . a) Probabilidades de las poblaciones y su desviación estándar calculado con el programa Structure (Pritchard <i>et al.</i> , 2000). b) Valores de Δk generados con el método de Evanno y colaboradores (2005) con el programa Structure Harvester (Earl y VonHoldt, 2011)..... | 76 |
| Figura 3.3. Análisis de asignación Bayesiana calculado con Structure (Pritchard <i>et al.</i> , 2000) para las poblaciones de <i>Fissurella virescens</i> . Se presentan tres grupos formados a partir del análisis de Evanno ($k=3$). Grupo 1) Isla Isabel, Bahía Banderas, Bahía de Chamela y Cuastecomate. Grupo 2) Mazatlán y Panamá. Grupo 3) Ixtapa..... | 77 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1.1. Número de conchas de <i>F. virescens</i> por población utilizadas para cada tipo de análisis morfométrico..... | 20 |
| Cuadro 1.2. Matriz de clasificación de individuos por población del análisis discriminante canónico para los PW, generado a partir de las distancias de Mahalanobis. El 60.75% de los individuos fueron clasificados correctamente dentro de su población de origen..... | 27 |
| Cuadro 1.3. Matriz pareada de distancias cuadradas de Mahalanobis (D^2) del análisis discriminante canónico y sus valores p asociados. Los valores por encima de la diagonal corresponden a los valores de p , mientras que los que se encuentran por debajo de la diagonal son los valores D^2 | 27 |
| Cuadro 1.4. Matriz de clasificación de individuos por población del análisis discriminante canónico para los valores de la morfometría tradicional basados en las distancias de Mahalanobis. Solo el 66.27% de los individuos fueron clasificados correctamente dentro de su población de origen..... | 30 |
| Cuadro 1.5. Matriz pareada de distancias cuadradas de Mahalanobis (D^2) del análisis discriminante canónico y sus valores p asociados. Los valores por encima de la diagonal corresponden a los valores de p , mientras que los que se encuentran por debajo de la diagonal son los valores D^2 | 31 |
| Cuadro 1.6. Matriz de clasificación de individuos del análisis discriminante canónico basado en las distancias de Mahalanobis. Solo el 45.64% de los individuos fueron clasificados correctamente dentro de su población de origen..... | 35 |
| Cuadro 1.7. Matriz pareada de distancias cuadradas de Mahalanobis (D^2) del análisis discriminante canónico y sus valores p asociados. Los valores por encima de la diagonal corresponden a los valores de p , mientras que los que se encuentran por debajo de la diagonal son los valores D | 35 |
| Cuadro 1.8. Comparación de la PERMANOVA y el análisis discriminante canónico de los tres métodos utilizados para determinar las diferencias en la forma de la concha de <i>F. virescens</i> | 35 |

| | |
|--|----|
| Cuadro 2.1. Número de individuos por población utilizados para el análisis de diversidad y diferenciación genética..... | 49 |
| Cuadro 2.2. Cebadores utilizados para la evaluación de diversidad genética de las poblaciones de <i>Fissurella virescens</i> | 50 |
| Cuadro 2.3. Índices de diversidad genética para siete poblaciones de <i>Fissurella virescens</i> del Pacífico oriental tropical. H_e = heterocigocidad esperada, L_p = porcentaje de loci polimórficos, H_B = índice de heterocigocidad bayesiano..... | 52 |
| Cuadro 2.4. Valores de diferenciación genética con diferentes estimadores dentro y entre poblaciones de <i>Fissurella virescens</i> en el Pacífico oriental tropical. El valor de la AMOVA es altamente significativo con una $p < 0.0001^{**}$ | 55 |
| Cuadro 2.5. Matriz de distancia genética de Nei (1978) (debajo) en seis poblaciones de <i>Fissurella virescens</i> y matriz de valores de p (arriba) para el análisis de la prueba de exactitud de Fisher (Raymond y Rousset, 1995)..... | 55 |
| Cuadro 2.6. Matriz de los valores de F_{st} pareados (abajo) y la matriz de valores de p correspondientes (arriba), calculados a partir de la AMOVA (Excoffier y Schneider, 2005) para siete poblaciones de <i>Fissurella virescens</i> en el Pacífico oriental tropical..... | 55 |
| Cuadro 3.1. Cebadores utilizados para la evaluación de diversidad genética de las poblaciones de <i>Fissurella virescens</i> | 73 |
| Cuadro 3.2. Matriz del análisis de asignación Bayesiana calculada con el programa Structure (Pritchard <i>et al.</i> , 2000). Se muestran los coeficientes de ancestría vertical compartidos entre pares de poblaciones..... | 75 |
| Cuadro 3.3. Matriz de asignación bayesiano para los tres grupos formados con el análisis de Evanno para siete poblaciones de <i>F. virescens</i> del Pacífico oriental tropical. Se presenta el coeficiente de ancestría calculado con Structure-Harvester..... | 77 |
| LISTA DE ANEXOS | |
| Anexo 1. Gradillas de deformación para cada población, generados por medio de Morfometría geométrica..... | 92 |
| Anexo 2. Estadística básica de la morfometría tradicional de las conchas. Donde S.D. es desviación estándar. Cf coeficiente de variación..... | 95 |
| Anexo 3. Protocolo de Extracción de ADN por CTAB modificado por McCarthur (2008) para moluscos..... | 96 |

Resumen

La forma más común de determinar la conectividad de las poblaciones es a través de análisis genéticos y morfométricos que miden el grado de variación entre y dentro de las poblaciones. La lapa *Fissurella virescens* es un molusco que se distribuye desde la Bahía de Mazatlán en el norte de México hasta las Islas Galápagos en Perú. Posee una larva pelágica de poca duración lo que nos hace creer que posee poblaciones cerradas y bien estructuradas. Su concha es aplanada y presenta una variación a simple vista, principalmente en tamaño y coloración. La especie no es consumida de forma comercial a gran escala, como otras lapas del mismo género. El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética y la variabilidad de la concha de *F. virescens* en siete poblaciones del Pacífico oriental tropical. Se recolectaron 270 conchas para el análisis morfométrico y 158 para el análisis genético. El análisis de morfometría se llevó a cabo con tres métodos: 1. Morfometría clásica, 2. Morfometría geométrica y 3. Elíptica de Fourier. El análisis genético se llevó a cabo con tres marcadores ISSR's. Se determinó la diversidad genética, la diferenciación y la estructura genética de las poblaciones. Se encontraron diferencias significativas en la forma de la concha con los tres métodos morfométricos utilizados, las pruebas de asignación fueron inferiores al 66% para los tres métodos, $p= 0.001$. Las poblaciones analizadas presentaron una diversidad genética alta a comparación de otros invertebrados marinos ($He= 0.2001$ a 0.3235). La mayor diferenciación se encontró dentro de las poblaciones con una $F_{st}= 0.2935$, aunque los valores de diferenciación entre poblaciones también fueron significativos. El análisis de asignación bayesiana clasificó a la mayoría de los individuos en sus poblaciones correspondientes, evidenciando una estructura genética alta. Las poblaciones de *F. virescens* analizadas presentan diferencias significativas en su forma y una plasticidad fenotípica moderada, es probable que la forma de la lapa este influenciada fuertemente por las condiciones específicas del hábitat. Presenta una diversidad genética alta, una diferenciación alta y una estructura genética fuerte probablemente influenciada por el aislamiento por distancia, la baja conectividad y la limitada duración de la larva en la columna de agua.

Abstract

The most common way to determine the connectivity of populations is by genetic and morphometric analyzes which measures the degree of variation between and within populations. The limpet *Fissurella virescens* is a mollusk that distributes from Mazatlán Bay in northern Mexico to Galapagos Islands in Peru. Has a short-lived pelagic larvae, which makes us believe that has closed and well structured populations. Their shell is flat and shows a variation to the naked eye, primarily in size and color. The species is not consumed on a commercial basis a large scale, like other limpets from the same gender. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity and variability of the shell of *F. virescens* in seven populations of the eastern tropical Pacific. We collected 270 shells for morphometric analysis and 158 for genetic analysis. Morphometrics analysis was performed with three methods: 1. Classic morphometrics, 2. Geometric morphometrics and 3. Elliptical Fourier. Genetic analysis was carried out with three ISSR's markers. Genetic diversity, differentiation and genetic structure of populations were determined. Significant differences were found in the form of the shell with the three morphometric methods, assignment tests were less than 66 % for all three methods, $p= 0.001$. The populations studied showed high genetic diversity compared to other marine invertebrates ($He= .2001$ to $.3235$). The greatest differentiation was found within populations with $F_{st} = 0.2935$, although the values of differentiation between populations were also significant. Bayesian assignment analysis classified the majority of individuals in their respective populations, showing high genetic structure. Populations of *F. virescens* presents significant differences in form and a moderate phenotypic plasticity, it's likely that the form of this limpet is strongly influenced by specific conditions of the habitat. They had a high genetic diversity, high differentiation and a strong genetic structure probably influenced by isolation by distance, low connectivity and limited duration of the larva in the water column.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La conectividad se refiere al intercambio de individuos entre poblaciones separadas geográficamente (Cowen *et al.*, 2007). Ésta es crucial para el mantenimiento de las poblaciones y para entender la respuesta de sus individuos a los cambios en las condiciones ambientales (Palumbi, 2003; Gawarkiewicz *et al.*, 2007). En la mayoría de los invertebrados marinos, la conexión entre las poblaciones se da a través de la dispersión de las larvas pelágicas, (Becker *et al.*, 2007; Cowen *et al.*, 2007; Cowen y Sponaugle, 2009; Levin, 2011). La dispersión puede contribuir significativamente a la tasa de crecimiento, al flujo génico y a la persistencia de las especies (Lowe y Allendorf, 2010).

De manera general se considera que las poblaciones de la mayoría de los animales marinos son abiertas y se distribuyen en amplios rangos geográficos, esto se ha atribuido al hecho de que potencialmente las larvas de estos animales se pueden dispersar libremente (Swearer *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2005). Las larvas planctónicas con mayor longevidad, aquellas que pasan semanas o meses en la columna de agua a merced de las corrientes, tienden a formar poblaciones panmícticas y reducen su adaptación a las condiciones locales (Krug, 2011). Por otra parte las especies con larvas de menor duración tienden a poseer poblaciones más estructuradas genéticamente y a estar sometidas a deriva génica. Se ha encontrado que además de la habilidad de dispersión, las larvas se ven afectadas por diferentes factores ambientales, como la salinidad, las corrientes y la temperatura, las cuales pueden crear barreras para la dispersión y afectar la conectividad entre las poblaciones, por lo que las poblaciones marinas no son tan abiertas como se pensaba (Palumbi, 2003; Pineda *et al.*, 2007).

La conectividad de las poblaciones usualmente se estima a través de métodos indirectos, dada la dificultad de medir directamente el movimiento de las larvas. Por lo tanto, el uso de marcadores moleculares neutrales ayuda en la estimación de la diversidad, la diferenciación y la estructura genética de las poblaciones (Selkoe y Tonnen, 2011). A partir de los valores estimados es posible inferir la conexión que existe entre las poblaciones, ya que detectan los cambios en las frecuencias alélicas entre éstas (Hedgecock, *et al.*, 2007). Dos métodos analíticos son los que se han usado principalmente para especular respecto a la conectividad de las poblaciones, el modelo de “Stepping Stone” (Wright, 1943) o de un salto a través de

la estimación de aislamiento por distancia y el uso de pruebas de asignación basado en análisis bayesianos, series de Monte Carlo o pruebas de máxima verosimilitud (Manel *et al.*, 2005; Beerli, 2006; Cowen y Spounagle, 2009). Los parámetros genéticos ayudan a entender la interrelación entre las poblaciones de una especie y su proceso evolutivo.

El estudio de la variación de las poblaciones no se limita sólo al análisis genético. Diferentes enfoques son utilizados, de manera paralela o independiente, para analizar la variación morfológica que los organismos presentan a lo largo de escalas geográficas amplias. Esto, con el fin de identificar la variabilidad fenotípica determinada por las presiones ambientales a las que se ven sometidos los individuos, para encontrar patrones de distribución de la variación e identificar rasgos o atributos que caracterizan a las poblaciones de invertebrados marinos (Zelditch, 2004; Márquez y Van der Mollen, 2011). En los moluscos, en especial la variabilidad fenotípica es utilizada como una herramienta taxonómica (Silva *et al.*, 2005). Las mediciones por medio de métodos directos, donde se registra la variabilidad de las conchas de los moluscos a partir de medir la distancia entre puntos, se ha usado en distintas especies por ejemplo en algunos bivalvos como *Macoma balthica* (Beukema y Meehan, 1985) y *Meretrix meretrix* (Deng *et al.*, 2008) en especies de gasterópodos como *Fissurella pulchra* (Bretos y Chihuailaf, 1990) o en especies de escafópodos de la familia *Gadilidae* (Silva *et al.*, 2005). Sin embargo, dada la ambigüedad de los métodos directos, en los últimos años se han desarrollado métodos que permiten evaluar y cuantificar la forma de los organismos de una manera más analítica, métodos como las Elipses de Fourier o la Morfometría Geométrica (Zelditch, 2004). En algunas especies de moluscos bivalvos como *Mytilus edulis* (Ferson *et al.*, 1985), *Mytilus trossulus* (Innes y Bates, 1999), *Chamalea gallina* (Palmer *et al.*, 2004), *Mytilus chilensis* (Krapivka *et al.*, 2007), se han utilizado las Elipses de Fourier para hacer análisis de las conchas. Mientras que la morfometría geométrica ha sido utilizada para el caso de *Brachidontes purpuratus* (Aguirre *et al.*, 2006) o para diferenciar entre las especies de *Panopea globosa* y *P. generosa* (Leyva-Valencia *et al.*, 2012).

El hábitat juega un papel importante en la evolución de las especies. Esto es particularmente importante en hábitats heterogéneos donde las condiciones cambiantes actúan como factores selectivos o limitantes para el desarrollo y la reproducción. Las playas

rocosas son ambientes heterogéneos muy estresantes, debido a que presentan fuertes gradientes de temperatura, cambios en la radiación solar y oleaje, además de estar sometidos a los ciclos de marea (Menge y Branch, 2001). Las poblaciones que se desarrollan en este tipo de hábitats deben contar con una mayor capacidad de respuesta para adecuarse a los cambios. Esto provoca que exista una gran variación tanto morfológica como genética entre los individuos de una misma población e incluso que se genere divergencia genética a pesar de la existencia de un alto flujo génico. (Hoffman *et al.*, 2010). En algunas especies de moluscos intermareales se ha demostrado un alto grado de plasticidad fenotípica, un ejemplo de esto se da en las litorinas, que presentan diferencias conspicuas en la forma de la concha entre individuos de la misma población debido a la acción de las olas, la desecación y la depredación por cangrejos (Butlin *et al.*, 2008; Queiroga, *et al.*, 2011); lo que ha generado barreras parciales para el flujo génico (Roland-Álvarez *et al.*, 2004; Galindo *et al.*, 2009). La composición genética de las poblaciones determina su habilidad para adaptarse a los cambios en las condiciones ambientales o incluso los provocados por la invasión de otras especies a su hábitat (Stepien *et al.*, 2002; Zhan *et al.*, 2008); por lo que es importante evaluar la variación y la diversidad genética de las especies en escalas geográficas amplias, además esto tiene un valor intrínseco para su conservación (Lowe *et al.*, 2004; Diz y Presa, 2009).

Fissurella virescens

La familia Fissurellidae posee alrededor de 37 géneros y aproximadamente 600 especies de moluscos llamados lapas, la mayoría de las cuales están repartidas en cuatro géneros *Diodora*, *Fissurella*, *Emarginella* y *Puncturella* (Olivares, 2007). Esta familia está comprendida dentro del suborden Vetigastropoda. Se considera que los géneros dentro de este grupo son monofiléticos. Los trabajos filogenéticos realizados con las secuencias de los genes de la Histona H3, citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) y dos segmentos de ARNr 18s han clasificado a la familia Fissurellidae como la más reciente dentro de los Vetigastropodos (Geiger y Thacker, 2005).

Las lapas son comunes en los ensamblajes de invertebrados en las playas rocosas. El género *Fissurella* está constituido por un grupo de lapas que posee una concha tipo pateliforme con una abertura al centro que permite el flujo del agua (foramen). La concha posee simetría

bilateral y carece de enroscamiento (Olivares, 2007). Las conchas están claramente ornamentadas con crenulaciones. El cuerpo del animal esta adherido a la concha por medio del manto y de un musculo en forma de herradura. El interior de la concha presenta la cicatriz del musculo y el callo, el cual es un área plana que rodea al foramen (McLean, 1984). Las especies del género *Fissurella* son en general organismos sedentarios, algunas especies pueden ser filtradoras o alimentarse de esponjas o algas (McLean, 1984; Olivares-Paz, 2007).

Las especies de este género son animales gonocóricos (los sexos están separados), y no existe dimorfismo sexual (Bretos *et al.*, 1983; McLean, 1984; Pérez *et al.*, 2007). Los individuos presentan fecundación externa. En especies como *Fissurella maxima* (Bretos, *et al.*, 1983), *F. crassa* (Huaquín *et al.*, 1998) y *F. nigra* (Pérez *et al.*, 2007) se ha demostrado que la maduración gonadal está relacionada con la disminución gradual en la temperatura del agua. En el hemisferio sur, se ha demostrado que los desoves ocurren casi todo el año. Presentan una larva pelágica, en *F. barbadiensis* (Lewis, 1960; Ward, 1966) en *F. picta* (González, *et al.*, 1999) y en *F. vulcano* (Reynoso *et al.*, 2007) se ha descrito una larva libre nadadora del tipo trocofora. Las larvas de *F. barbadiensis* duran aproximadamente tres días como libre nadadoras (Lewis, 1960).

La lapa *Fissurella virescens* se destaca por ser usual en las playas rocosas del Pacífico mexicano, principalmente en la costa de Jalisco y Colima, donde posee una gran abundancia y es frecuente en los registros (Ríos-Jara *et al.*, 2001). Se distingue por poseer una concha aplanada, de color blanquecino o grisáceo en la superficie y un color verde brillante en la parte interior. Está ampliamente distribuida en el Pacífico, se conoce desde la Bahía de Mazatlán, Sinaloa, México hasta las Islas Galápagos, Ecuador (Keen, 1971). Es extraída con fines de alimentación por los pescadores o para fabricar artesanía en la costa de Jalisco. No se sabe si esta lapa es aprovechada de forma comercial en otras áreas de su distribución.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la morfometría y la diversidad genética de siete poblaciones de *Fissurella virescens* en el Pacífico oriental tropical.

Objetivos Particulares

Evaluar la variabilidad conchiliológica de siete poblaciones de *F. virescens*.

Estimar la diversidad y la diferenciación genética de las poblaciones de *F. virescens*.

Evaluar la estructura poblacional de *F. virescens* aplicando métodos de asignación y análisis bayesiano.

HIPÓTESIS

Si las siete poblaciones estudiadas de *Fissurella virescens* del Pacífico oriental tropical son distintas entre sí, tendrán diferencias en la forma de la concha.

Dado que las poblaciones de *F. virescens* están alejadas geográficamente unas de otras, existen diferencias en sus niveles de diversidad y diferenciación genética.

ÁREA DE ESTUDIO

La ecoregión llamada Pacífico oriental tropical se extiende desde la punta de Baja California Sur a lo largo de la costa del Pacífico mexicano y centroamericano hasta las Islas Galápagos en Ecuador (Spalding *et al.*, 2007). Esta zona está definida por la intrusión de aguas cálidas provenientes de la región del Pacífico oriental norecuatorial, que tienen mayor influencia en la zona durante el verano llegando hasta los 21°N (Galicía-Pérez *et al.*, 2006) y de la Corriente Costanera de Costa Rica. Durante el invierno y la primavera el efecto de estas corrientes frente a la costa de Jalisco, Colima y Nayarit, se minimiza y la zona es invadida por las aguas frías de la Corriente de California y las aguas templadas de la Corriente de Cortes proveniente del Golfo de California (Wyrski, 1965; Kessler, 2006). Está caracterizada por poseer una variación climática anual de la temperatura del agua del orden de 18° a 23° C y de estar sometida a la variación interanual del fenómeno oceánico-atmosférico de El Niño (ENSO) (Wang y Fiedler, 2006; Fiedler y Tally, 2006). Estas variaciones en la temperatura del agua y de las corrientes provocan zonas de transición, donde las especies suelen encontrar sus límites de distribución y ocurren las barreras biogeográficas (Spalding *et al.*, 2007; Rosales-Nanduca *et al.*, 2011), por lo que existe una biodiversidad alta y la zona presenta especies tropicales y templadas, además de algunos endemismos (Rosales-Nanduca *et al.*, 2011; Vega *et al.*, 2012).

Las recolectas de especímenes de *Fissurella virescens* se llevó a cabo en siete poblaciones del Pacífico oriental tropical. Seis de ellas en el Pacífico mexicano y una en la parte norte de la Bahía de Panamá (Figura A). La muestra total incluyó 270 conchas para el análisis morfométrico y 158 para el análisis genético.

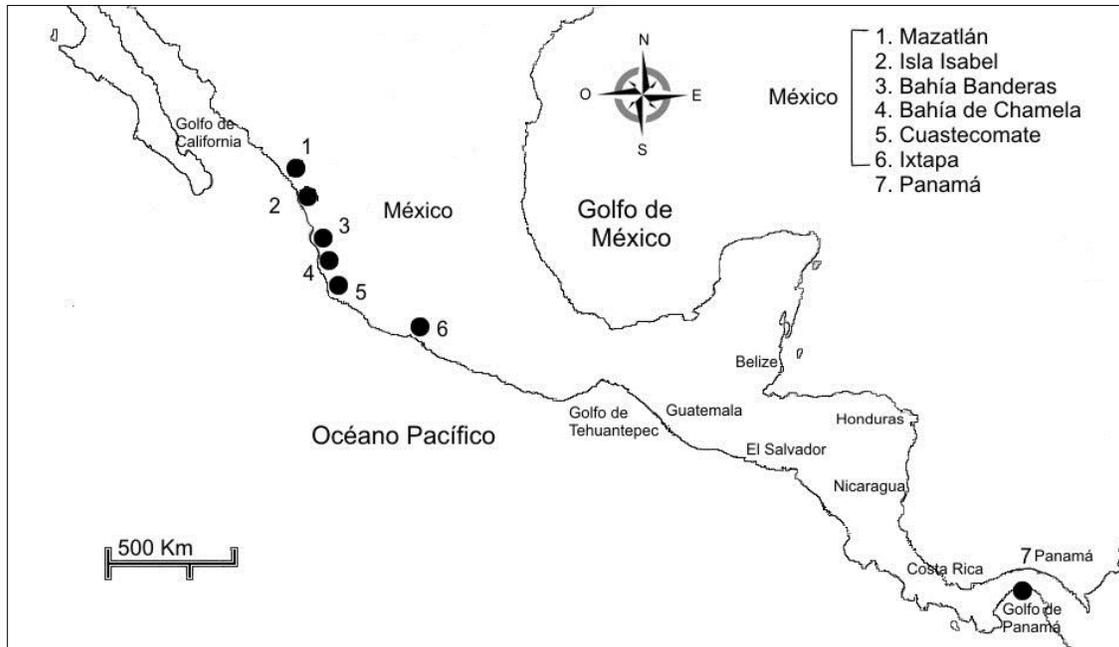


Figura A. Sitios de muestreo en el Pacífico oriental tropical.

Sitios de muestreo

Bahía de Mazatlán, Sinaloa

La Bahía de Mazatlán se localiza en la porción sur del estado de Sinaloa ($23^{\circ} 08' 48''$ y $23^{\circ} 16' 00''$ N y $106^{\circ} 29' 24''$ y $106^{\circ} 23' 36''$ O), precisamente en la boca del Golfo de California. Es una zona muy dinámica ya que se está influenciada por las corrientes de California y la Corriente de Cortés. La temperatura media anual de la superficie del agua es de 25.4°C . El clima es cálido subhúmedo con lluvias en verano, con una precipitación promedio de 812mm (Alonso-Rodríguez, 2004). La bahía esta densamente poblada y el 60% de las aguas negras descargan directamente en las playas. La recolecta se realizó en la playa rocosa Casa del Marino que se encuentra en la porción sur de la bahía, en la zona vieja del puerto de Mazatlán. Es una playa expuesta con oleaje fuerte.

Isla Isabel, Nayarit

La Isla Isabel decretada como Parque Nacional en 1980 está situada a 28km frente a la costa de Nayarit en las coordenadas $21^{\circ} 51' 21''$ y $21^{\circ} 50' 23''$ y $105^{\circ} 53' 31''$ y $105^{\circ} 53' 05''$ O. Es una isla volcánica y presenta un lago salado en el centro. Posee un clima tropical

subhúmedo y la temperatura oscila entre los 22°C y los 30°C. La temperatura del agua varía de entre 29°C y 30°C (CONANP, 2005). La recolecta se hizo en la playa El Ocaso, ubicada al noreste de la Isla, se caracteriza por ser una playa rocosa formada por derrames de lava. Es semiexpuesta y se encuentra sometida a un oleaje fuerte.

Bahía Banderas, Jalisco

Bahía Banderas (20°15' y 20°47'N y 105°15' y 105°42' O) se ubica en la costa norte de Jalisco y sur de Nayarit. La bahía es de aproximadamente 1000 km², con una profundidad media de 300 m, cuenta con una línea de costa de 120 km; se encuentra limitada al norte por Punta de Mita y al sur por Cabo Corrientes. Está en el límite de dos subprovincias biogeográficas la del Golfo de California al norte y la Mexicana al sur. Debido a su ubicación en la boca del Golfo de California, es susceptible a los procesos de circulación Pacífico oriental y provoca una gran variabilidad ambiental (Gallegos *et al.*, 2006). El clima es subhúmedo tropical, las temperaturas anuales varían de entre 22°C a 29°C y la precipitación media anual es de 325mm (Cupul-Magaña, 2007). La recolecta se hizo en la playa Yelapa, que se encuentra en la porción sur de la bahía. Es una pequeña playa arenosa con una zona rocosa hacia el noreste. Se encuentra dentro de una zona turística que no está densamente poblada. La playa es una zona protegida y las olas no suelen ser muy fuertes.

Bahía de Chamela, Jalisco

La Bahía de Chamela se encuentra, en las costas del municipio de La Huerta en Jalisco (19° 32' N y 105° 06' O), se ubica entre las desembocaduras de los ríos Cuitzmala y San Nicolás. Se extiende desde Punta Rivas en el norte hasta punta Etiopía, a lo largo de 7.5 km en dirección noroeste-sureste. Es una zona seca con poca precipitación (alrededor de 748 mm al año), la temperatura marina varía de 26°C a 32°C. La bahía se ubica en una zona de convergencia de corrientes superficiales de procedencia norte (Corriente de California y de Reflujo del Golfo de California) y sur (Corriente ecuatorial) (CONANP, 2008). La recolecta se llevó a cabo en la playa Negritos que se sitúa en la parte sur de la bahía, es una pequeña playa con macizos rocosos y algunas piedras grandes sueltas que generan pozas marinas. En el momento de la recolecta no existía ningún tipo de desarrollo turístico en la playa Negritos. La playa está protegida y el oleaje es tranquilo.

Cuastecomate, Jalisco

La Bahía de Cuastecomate está situada en la parte sur de la costa de Jalisco. La bahía se encuentra entre Punta Carrizalillo y Punta Cuastecomatito ($19^{\circ}13'29''$ y $19^{\circ}14'18''$ N y $104^{\circ}43'45''$ y $104^{\circ}45'29''$ O), posee una superficie de aproximadamente 325 hectáreas. Está compuesta casi en su totalidad por playas rocosas. Las temperaturas anuales oscilan entre los 20.6°C y los 32.3°C y la mayor precipitación se da en el mes de septiembre (Esqueda *et al.*, 2000). El sitio tiene una pequeña zona turística visitada principalmente por los lugareños. La recolecta de especímenes se hizo en la porción sur de la bahía, en una zona con macizos rocosos y canto rodado. La playa está protegida y posee un oleaje calmado.

Ixtapa, Guerrero

La costa de Ixtapa Zihuatanejo se encuentra en el estado de Guerrero. Posee un clima cálido subhúmedo con una temperatura media anual mayor a 22°C (Tovilla *et al.*, 2009). La recolecta se hizo en la zona sur de Playa Linda ($17^{\circ}40'10''$ N y $101^{\circ}38'29''$ O), que se encuentra dentro de la zona turística de Ixtapa-Zihuatanejo. El lugar de la recolecta es una pequeña playa rocosa caracterizada por macizos rocosos y piedras sueltas que forman pozas marinas. Está situada en un extremo de una playa arenosa muy larga. El sitio se encuentra rodeado por una intensa actividad turística y grandes complejos hoteleros. La zona de colecta es una playa semiprotegida con oleaje de tranquilo a moderado.

Panamá

La Bahía de Panamá. Se encuentra ubicada en la costa del Pacífico al este de la ciudad de Panamá. La costa del Pacífico de Panamá se caracteriza por poseer un clima tropical lluvioso con promedio de precipitación anual de 2600mm. La temperatura oscila entre los 26 y 27°C . Está influenciada por la corriente ciclónica de Colombia. Es una zona de aguas poco profundas y cálidas que oscilan entre los 23°C y los 28°C (Bennet, 1965). La recolecta se llevó a cabo en la playa de Veracruz ($8^{\circ}57'$ N y $79^{\circ}32'$) en la zona costera del Distrito de Arraijan, que se sitúa en la parte sur de la bahía. Es una playa protegida con poco oleaje.

LITERATURA CITADA

- Aguirre, M. L., S. I. Pérez y Y. N. Sirch. 2006. Morphological variability of *Brachidontes Swainson* (Bivalvia, Mytilidae) in the marine Quaternary of Argentina (SW Atlantic). *Paleogeography, Paleoclimatology, Paleoecology* 239: 100-125.
- Alonso-Rodríguez, R. 2004. Hidrología y condiciones ambientales que determinan la proliferación de dinoflagelados causantes de marea roja en la Bahía de Mazatlán, Sin., México. Tesis de doctorado. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.
- Becker, B. J., L. A. Levin, F. J. Fodrie y P. A. McMillan. 2007. Complex larval connectivity patterns among marine invertebrate populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (9): 3267-3272.
- Beerli, P. 2006. Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics* 22: 341-345.
- Bennet, E. B. 1965. Corrientes observadas en la Bahía de Panamá durante septiembre-octubre 1958. *Inter-american tropical tuna commission bulletin* 10(7): 399-429.
- Beukema, J. J., y B. W. Meehan. 1985. Latitudinal variation in linear growth and other shell characteristics of *Macoma balthica*. *Marine Biology* 90: 27-33.
- Bretos, M., L. Tesorieri y L. Álvarez. 1983. The biology of *Fissurella maxima* Sowerby (Mollusca: Archeogastropoda) in Northern Chile. Notes on its reproduction. *Biology Bulletin* 165: 559-568.
- Bretos, M. y R. H. Chihuailaf. 1990. Biometría y otros aspectos biológicos de *Fissurella pulchra* (Mollusca: Prosonbranchia). *Revista de Biología Marina, Valparaíso* 25(1): 1-14.
- Butlin, R.K., J. Galindo, J. W. Grahame. 2008. Sympatric, parapatric or allopatric: the most important way to classify speciation? *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences* 363: 2997-3007.

- CONANP. 2005. Programa de conservación y manejo Parque Nacional Isla Isabel. Comisión Nacional de Áreas Protegidas. México. 164pp.
- CONANP. 2008. Programa de conservación y manejo del Santuario Islas de la Bahía de Chamela. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, México. 149 pp.
- Cowen, R. K., G. Gawarkiewicz, J. Pineda, S. R. Thorrold y F. E. Werner. 2007. Population connectivity in marine systems. *Oceanography* 20: 14-21.
- Cowen, R. K. y S. Sponaugle. 2009. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science* 1: 443-466.
- Cupul-Magaña, A. L. 2007. Programa de conservación y manejo Parque Nacional Islas Marietas. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 155p.
- Deng, Y., X. Du, R. Huang, Q. Wang. 2008. Morphological and karyotypic variation in three wild populations of *Meretrix meretrix*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 26(1): 76-80.
- Diz, A.P., y P. Presa. 2009. The genetic diversity pattern of *Mytilus galloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). *Aquaculture* 287: 278-285.
- Esqueda, M. C., E. Ríos-Jara, J. E. Michel-Morfín y V. Landa-Jaime. 2000. The vertical distribution and abundance of gastropods and bivalves from rocky beaches of Cuastecomate Bay, Jalisco. *Revista de Biología Tropical* 48: 765-775.
- Person S., F. J. Rohl, R. K. Koehn. 1985. Measuring shape variation of two dimensional outlines. *Systematic Zoology* 34: 59-68.
- Fiedler, P.C., y L. D. Talley. 2006. Hydrography of the eastern tropical Pacific: a review. *Progress in Oceanography* 69 (2-4), 143-180.
- Galicia-Pérez, M. A., J. H. Gaviño-Rodríguez, E. Torres-Orozco y M. Sánchez-Barajas. 2006. Condiciones hidrológicas y de circulación en el litoral de Colima durante el año 2002. En: M. del C. Jiménez-Quiroz y E. Espino-Barr (ed.). 2006. Los recursos pesqueros y acuícolas de Jalisco, Colima y Michoacán. SAGARPA 622p.

- Galindo, J., P. Morán, E. Rolán-Alvarez. 2009. Comparing geographical genetic differentiation between candidate and non candidate loci for adaptation strengthens support for parallel ecological divergence in the marine snail *Littorina saxatilis*. *Molecular Ecology* 18: 919-930.
- Gallegos, A., R. Rodríguez, E. Márquez, R. Lecuanda y J. Zavala-Hidalgo. 2006. Una climatología de la temperatura de la superficie del mar de las aguas adyacentes a las costas de Jalisco, Colima y Michoacán, México: 1996-2003. 17-28. En: M. del C. Jiménez-Quiroz y E. Espino-Barr (ed.). 2006. Los recursos pesqueros y acuícolas de Jalisco, Colima y Michoacán. SAGARPA 622p.
- Gawarkiewicz, G., S. Monismith, J. Largier. 2007. Observing larval transport processes affecting population connectivity: Progress and challenges. *Oceanography* 20: 40-53.
- Geiger, D. y C. E. Thacker. 2005. Molecular phylogeny of Vetigastropoda reveals non-monophyletic Scissurellidae, Trochoidea and Fissurelloidea. *Molluscan Research* 2(1): 47-55.
- González, M. L., M. C. Pérez, D. A. López, J. M. Uribe y J. M. Castro. 1999. Early development in *Fissurella picta* (Gmelin). *Veliger* 42: 275-277.
- Hedgecock, D., P. H. Barber y S. Edmands. 2007. Genetic approaches to measuring connectivity. *Oceanography*, 20 (3): 70-79.
- Hoffman, J. I., L. S. Peck, G. Hillyard, A. Zieritz, M. S. Clark. 2010. No evidence for genetic differentiation between Antarctic limpet *Nacella concinna* morphotypes. *Marine Biology* 157: 765-778.
- Huaquín, L., R. Guerra y M. Bretos. 1998. Identificación del sexo y morfología de gametos de la lapa *Fissurella crassa* (Lamarck, 1822) (Mollusca: Archaeogastropoda). *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 33: 223-239.
- Innes, D. J., J. A. Bates. 1999. Morphological variation of *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus* in eastern Newfoundland. *Marine Biology* 133: 691-699.

- Jones G.P., S. Planes, S. R. Thorrold. 2005. Coral reef fish larvae settle close to home. *Current Biology*. 15: 1314-1318.
- Keen, A. M. 1971. Seashells of Tropical West America. Marine mollusks from Baja California to Peru. Stanford Univ. Press, Stanford. 1065p.
- Kessler, W. S. 2006. The circulation of the eastern tropical Pacific: A review. *Progress in Oceanography* 69: 181-217.
- Krapivka, S., J. E. Toro, A. C. Alcapán, M. Astorga, P. Presa, M. Pérez y R. Guiñez. 2007. Shell-shape variation along the latitudinal range of the Chilean blue mussel *Mytilus chilensis* (Hupe 1854). *Aquaculture Research* 38: 1770-1777.
- Krug. P. J. 2011. Patterns of speciation in Marine Gastropods: A review of the phylogenetic evidence for localized radiations in the sea. *American Malacological Bulletin* 29(1/2): 169-186.
- Leyva-Valencia, I., S. T. Álvarez-Castañeda, D. B. Lluch-Cota, S. González-Peláez, S. Pérez-Valencia, B. Vadopalas, s. Ramírez-Pérez y P. Cruz-Hernández. 2012. Shell shape differences between two *Panopea* species and phenotypic variation among *P. globosa* at different sites using two geometric morphometrics approaches. *Malacologia* 55 (1): 1-13.
- Levin L. A. 2011. Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and digressions. *Integrative comparative biology*. 46 (3):282-297.
- Lewis, J. B. 1960. The fauna of rocky shores of Barbados, West Indies. *Cannadien Journal of Zoology* 38: 391-435.
- Lowe, A., S. Harris y P. Ashton. 2004. Ecological genetics. Design, analysis and application. Blackwell Publishing Company. Malden U.S.A. 326 pp.
- Lowe W. H., y F. W. Allendorf. 2010. What can genetics tell us about population connectivity?. *Molecular ecology* 19: 3038-3051.

- Manel, S. O. E. Gaggioti y R. S. Waples. 2005. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 136-142.
- Márquez F. y S. Van Der Molen. 2011. Intraespecific shell-shape variation in the razor clam *Ensis macha* along the Patagonian coast. *Journal of Molluscan Studies* 0: 1-6.
- McLean, J. H. 1984. Systematics of *Fissurella* in the Peruvian and Magellanic faunal provinces (Gastropoda: Prosobranchia). Natural History Museum of Los Angeles County, Contributions in Science, 354: 1-70.
- Olivares-Paz, A. N. 2007. Sistemática molecular del género *Fissurella* en el Pacífico sudoriental. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Palmer M., G. X. Pons, y M. Linde. 2004. Discriminating between geographical groups of a Mediterranean commercial clam (*Chamelea gallina* (L): Veneridae) by shape analysis. *Fish Research* 67: 93-98.
- Palumbi, S. R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, 13(1): 146-158.
- Pérez, M. C., M. L. González y D. A. López. 2007. Breeding cycle and early development of the keyhole limpet *Fissurella nigra* Lesson, 1831. *Journal of Shellfish Research* 26 (2): 315-318.
- Pineda J., H. A. Hare, y S. Spounagle. 2007. Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography* 20: 22-39.
- Queiroga, H., R. Costa, N. Leonardo, D. Soares y D. F. R. Cleary. 2011. Morphometric variation in two intertidal littorinid gastropods. *Contributions to Zoology* 80 (3): 201-211.
- Reynoso-Granados, T., P. Monsalvo-Spencer, E. Serviere-Zaragoza, S. A. Guzmán-Del-Proo. 2007. Larval and early juvenile development of the volcano keyhole limpet, *Fissurella volcano*. *Journal of Shellfish Research* 26 (1): 65-70.

- Ríos-Jara, E., M. Pérez-Peña, E. Juárez-Carrillo, E. López-Uriarte, I. Enciso-Padilla, E. G. Robles-Jarero. 2001. Moluscos macrobénticos del intermareal y plataforma continental de Jalisco y Colima. Informe CONABIO.
- Rolán-Alvarez, E., M. Carballo, J. Galindo, P. Morán, B. Fernández, A. Caballero, R. Cruz, E. G. Boulding, K. Johannesson. 2004. Nonallopatric and parallel origin of local reproductive barriers between two snail morphotypes. *Molecular Ecology* 13: 3415–3424.
- Rosales-Nanduca, H., T. Gerrodette, J. Urbán-R., G. Cárdenas-Hinojosa y L. Medrano-González. 2011. Macroecology of marine mammal species in the Mexican Pacific Ocean: diversity and distribution. *Marine Ecology Progress Series* 431: 281-291.
- Selkoe K. A. y R. J. Toonen. 2011. Marine connectivity: a new look at pelagic larval duration and genetic metrics of dispersal. *Marine Ecology Progress Series* 436: 291-305.
- Silva A. R., P. H. de Almeida S., T. Silva de P. 2005. Shell morphometrics in four species of *Gadilidae* (Mollusca, Scaphopoda) in Southwestern Atlantic Ocean, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 22 (1): 175-179.
- Spalding, M. D., H. E. Fox, G. R. Allen, N Davidson, Z. A. Ferdaña, M. Finlayson, B. S. Halpern, M. A. Jorge, A. Lombana, S. A. Lourie, K. D. Martin, E. Mcmanus, J. Molnar, C. A. Recchia, y J. Robertson. 2007. Marine ecoregions of the world. A bioregionalization of coastal and shelf areas. *Bioscience* 57: 573-583.
- Stepien, C. A., C. D. Taylor y K. A. Dabrowska. 2002. Genetic variability and phylogeographical patterns of a nonindigenous species invasion: a comparison of exotic vs native zebra and quagga mussel populations. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 314-328.
- Swearer S. E., J. S. Shima, M. E. Hellberg, S. R. Thorrold, G. P. Jones. 2002. Evidence of self-recruitment in demersal marine populations. *Bulletin of Marine Science*. 70(Suppl. 1): 251-271.

- Tovilla-Hernández, C., S. A. Mora-Corro, J. Rojas-García y A. D. Vázquez-Lule 2009. Caracterización del sitio de manglar Coyuca–Mitla, en Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Sitios de manglar con relevancia biológica y con necesidades de rehabilitación ecológica. CONABIO, México, D.F.
- Vega, C., C. J. Hernández-Guerrero y J. A. Cruz-Barraza. 2012. Biogeografía de esponjas marinas (Phylum Porifera); estudios en el Pacífico oriental. CICIMAR Oceanides 27(1): 35-50.
- Wang, C., y P. C. Fiedler. 2006. ENSO variability in the eastern tropical Pacific: A review. Progress in Oceanography 69 (2-4): 239-266.
- Ward, J. 1966. The breeding cycle of keyhole limpet *Fissurella barbadensis* Gmelin. Bulletin of Marine Science 16: 685-695.
- Wyrтки, K. 1965. Surface currents of the Eastern Tropical Pacific Ocean. Inter-American Tropical Tuna Commission Bulletin. IX: 271-304.
- Zelditch, M. L., D. L. Swiderski, H. D. Sheets y W. L. Fink. 2004. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Amsterdam: Elsevier/Academic Press.
- Zhan, A., J. Hu, X. Hu, Z. Zhou, M. Hui, S. Wang, W. Peng, M. Wang y Z. Bao. 2009. Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): do local marine currents drive geographical differentiation?. Marine Biotechnology 11: 223-235.

CAPÍTULO 1. MORFOMETRIA DE *Fissurella virescens* EN EL PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL

INTRODUCCIÓN

El estudio de la forma es importante para determinar las diferencias taxonómicas entre las especies y para cuantificar su variación morfológica (Conde-Padín *et al.*, 2007). Determinar esto es crucial para entender la evolución y la ecología de las especies (Queiroga *et al.*, 2011). La variación en la forma de los organismos puede estar determinada por la genética y por las presiones ambientales a las que las especies están sometidas (Zelditch, 2004; Márquez y Van der Mollen, 2011).

Las conchas de los moluscos son un buen ejemplo para estudiar la variabilidad y la plasticidad fenotípica, ya que están sujetas a los factores ambientales, como el oleaje, la desecación y la depredación, entre otros (Vermeij, 1973; Queiroga, 2011). Esto es importante sobre todo en las especies que viven en la zona intermareal rocosa, pues éste es un ambiente muy estresante (Khouw, 2006). En esta zona las especies se ven amenazadas por la desecación y la acción de las olas que podrían arrancarlas de la roca. Se ha propuesto que la forma y el tamaño, así como las ornamentaciones de las conchas están determinados por estos factores (Carvajal-Rodríguez *et al.*, 2005).

La morfometría es el estudio de la variación de la forma a partir de métodos estadísticos (Adams *et al.*, 2004). Para evaluar las diferencias en la forma, se ha utilizado la descripción de la morfología combinada con diferentes análisis estadísticos que permiten hacer comparaciones. Para esto, han surgido distintos enfoques desde los más tradicionales en los que se combinan análisis multivariados con un grupo de variables como la altura, el ancho o el alto de las conchas entre otros (Adams *et al.*, 2004) así como la medición entre puntos combinados con análisis de sumas de cuadrados (Krapivka *et al.*, 2007). Éstos llamados análisis tradicionales (Reyment, 1991) han sido ampliamente utilizados en moluscos, como en los bivalvos *Macoma balthica* (Beukema y Meehan, 1985), *Corbicula fluminea* (Bagatini *et al.*, 2005) *Meretrix meretrix* (Deng *et al.*, 2008), o en los gasterópodos *Fissurella pulchra* (Bretos y Chihuailaf, 1990) *F. latimarginata* (Olivares *et al.*, 1998), *Cypraea annulus* (Irie, 2006) y *Gundlachia ticaga* (Lacerda *et al.*, 2011) entre otros. Sin

embargo este tipo de variables están sujetas al tamaño del individuo lo que puede sesgar la información obtenida respecto a la forma general de la concha (Adams *et al.*, 2004), sobre todo en aquellas especies donde las diferencias no son muy conspicuas (Márquez *et al.*, 2011). Un ejemplo es el trabajo realizado en *Littorina saxatilis* donde estos métodos no lograron discriminar entre distintos ecotipos (Johannesson *et al.*, 1993); por lo que se han propuesto métodos alternativos que minimicen el efecto del tamaño en el análisis de la variación, como los morfométricos basados en landmarks (caracteres morfológicos homólogos en los especímenes) (Bookstein, 1986; Rholf y Slice, 1990) o los que delimitan los contornos como el Análisis de Elipses de Fourier (AEF) (Khul y Giardina, 1982).

Algunos trabajos han utilizado la morfometría geométrica basada en landmarks para analizar la forma de la concha en moluscos (Stone, 1998; Carvajal-Rodríguez *et al.*, 2005; Queiroga *et al.*, 2011; Leyva-Valencia *et al.*, 2012). Sin embargo, en algunas especies este enfoque puede ser difícil de aplicar por la falta de landmarks concretos (Johnston *et al.*, 1991). El Análisis de Elipses de Fourier ha sido de gran utilidad para determinar las diferencias en la forma de varias especies, ya que captura toda la forma de la concha aun en la ausencia de landmarks (Rholf y Archie, 1984). Este método ha sido usado para discriminar entre poblaciones de bivalvos como en *Mytilus chilensis* (Krapivka *et al.*, 2007); *Ameghinomya antiqua* (Márquez *et al.*, 2010), *Ensis macha* (Márquez y Van der Molen, 2011), o entre especies de gasterópodos de los géneros *Strombus* y *Lambis* (Latiolais *et al.*, 2006). Ambos métodos utilizan los ejes de coordenadas para hacer una proyección bidimensional de la forma. La diferencia principal radica, en que AEF digitaliza puntos a lo largo de una curva, delineando la forma y ajustándola a la función matemática de Fourier, mientras que el método basado en landmarks, elige puntos o caracteres morfológicos análogos y proyecta cada uno en ejes de coordenadas para después superponer las diferentes formas y eliminar así el efecto del tamaño en la muestra (Adams *et al.*, 2004).

El molusco gasterópodo *Fissurella virescens* posee una concha en forma cónica o de lapa y es común en las playas rocosas del Pacífico oriental tropical. Esta especie es un buen ejemplo para el estudio de la variación morfológica dada su amplia distribución, ya que se le encuentra desde Mazatlán, México hasta las Islas Galápagos, Ecuador (Keen, 1970) y a

diferencia de las fisurelas de Chile, esta especie ha sido poco estudiada. La *F. virescens* se encuentra distribuida en tres provincias biogeográficas, 1) Provincia de Cortés, cuyos límites van de Bahía Magdalena hasta Cabo Corrientes, Nayarit, 2) Provincia Mexicana, desde Cabo Corrientes hasta su límite sur en Oaxaca y 3) Provincia Panámica, que tiene su límite en Cabo Blanco al norte de Perú. Los individuos de las poblaciones de esta lapa presentan una gran variación morfológica. Sin embargo, no existen trabajos que analicen la variabilidad en la forma de la concha de esta especie.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la variación morfológica de *F. virescens* en siete poblaciones a lo largo de su distribución en el Pacífico oriental tropical. Para este estudio se utilizaron tres diferentes métodos morfométricos para describir las diferencias en la forma de la concha, se comparan las ventajas y desventajas de cada método y se proponen algunas posibles causas de la variabilidad observada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de Estudio

Se recolectaron 270 conchas de siete poblaciones diferentes. Seis se encuentran en México: Mazatlán (Sinaloa), Isla Isabel (Nayarit), Bahía Banderas, Bahía de Chamela, Cuastecomate (Jalisco) e Ixtapa (Guerrero); y una de Panamá (Figura A). Un total de 252 individuos fueron colectados vivos, mientras que 18 eran conchas sin la parte blanda. La recolecta se realizó de manera directa y al azar en la parte media del intermareal, sin ningún tipo de equipo especial.

Los especímenes se lavaron con agua dulce y se llevaron al laboratorio. Las partes blandas se extrajeron de la concha y se preservaron en alcohol al 95%. Las conchas fueron limpiadas de epibiontes y fueron etiquetadas y guardadas individualmente. El número de individuos utilizados para cada metodología varió dependiendo de la conservación de las conchas, ya que se utilizaron únicamente las conchas completas y poco erosionadas (Cuadro 1).

Cuadro 1.1. Número de conchas de *F. virescens* por población utilizadas para cada tipo de análisis morfométrico.

| Población | Morfometría geométrica | Morfometría Tradicional | Análisis de Elipses de Fourier |
|------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Mazatlán | 31 | 26 | 29 |
| Isla Isabel | 58 | 58 | 50 |
| Bahía Banderas | 47 | 47 | 42 |
| Bahía de Chamela | 33 | 29 | 33 |
| Cuastecomate | 33 | 33 | 32 |
| Ixtapa | 34 | 33 | 29 |
| Panamá | 29 | 29 | 26 |
| Total | 265 | 255 | 241 |

Análisis morfométrico

El análisis morfométrico de las conchas consistió en tres diferentes metodologías: la Morfometría Tradicional, la Morfometría Geométrica basada en semilandmarks (Rohlf y Slice, 1990) y las Elipses de Fourier (Khul y Giardina, 1982).

Morfometría Geométrica

Esta metodología nos permite cuantificar la forma, removiendo los efectos de tamaño, rotación y escala (Rohlf y Slice, 1990). La diferencia en la forma se puede describir a partir de caracteres morfométricos llamados landmarks o a partir de caracteres seleccionados artificialmente o semilandmarks los cuales sirven generalmente para determinar las diferencias entre curvas (Bookstein, 1996). Las coordenadas correspondientes a cada landmark son utilizadas para determinar las diferencias entre las poblaciones (Bookstein, 1991).

Para remover los efectos no deseados se utiliza el Análisis Procrustes Generalizado (GPA por sus siglas en inglés) (Rohlf y Slice, 1990), que nos permite generar una superimposición de los organismos. Después de que los landmarks son generados para cada espécimen, se ajustan por medio del GPA; para esto se calcula el centroide y los valores x y y de las coordenadas de cada individuo son centradas en el origen. Después se ajustan todos los individuos a la misma escala dividiendo la configuración total de los landmarks entre el

tamaño del centroide (definido como la raíz cuadrada de la suma del cuadrado de las distancias de cada landmark al centroide) después se rota cada organismo hasta que el valor de los cuadrados de los centroides sea mínimo (Bookstein, 1991; Adams *et al.*, 2004). Cuando se tiene a todos los individuos alineados, se puede generar una media de los organismos, ésta nos permite cuantificar las diferencias en la forma, estimando los valores mínimos de deformación o partial warps (PW) necesarios para alterar la forma media en cada individuo (Parsons *et al.*, 2003; Adams *et al.*, 2004). Tanto el centroide como los partial warps son valores morfométricos que se pueden utilizar en análisis multivariados para determinar las diferencias significativas. Además las coordenadas son utilizadas para generar modelos de gradillas de deformación que permiten visualizar la deformación de los individuos (Bookstein, 1996). Para la elección de los semilandmarks se utilizó el método Fan-Based (generado a partir de abanicos) que se basa en generar líneas radiadas en forma de abanico a partir de un centroide calculado (Leyva-Valencia *et al.*, 2012).

En el caso de los individuos de *F. virescens* se eligieron veinte semilandmarks (Figura 1.1). Estos se calcularon a partir de cuatro landmarks principales, dos puntos (A y C) que representan el largo máximo de la concha y dos (B y D) que están a lo ancho justo a la altura de la parte posterior del foramen; y el centroide generado a partir de estos, con el programa Makefan 6, Beta (Sheets, 2006). Cada coordenada de los semilandmarks, los cuales pueden ser utilizados como landmarks (Adams *et al.*, 2004) fue calculada con el programa TPSDig 2.12 (Rohlf, 2008). Para cada espécimen las coordenadas x y y fueron ajustadas por medio de un GPA y se calcularon los valores de PW con el programa CoordGen 6f (Sheets, 2006), mientras que el centroide fue calculado por medio del programa TPSRelw 1.46 (Rohlf, 2008). Los valores de PW fueron utilizados en un análisis de componentes principales y un análisis de gradillas de deformación con el programa PCAGen 6n (Sheets, 2006) para cada población. Por último estos valores fueron sometidos a un análisis discriminante canónico por medio del programa CVAGen6j (Sheets, 2006) para obtener las gradillas de deformación totales. Asimismo los valores PW fueron sometidos a un análisis de permutaciones de la varianza (PERMANOVA) para comparar entre la forma de la concha de las poblaciones. La PERMANOVA univariada de Tipo I se calculó a partir de una matriz de semejanza generada por distancias euclidianas y su significancia estadística se probó con 9,999 permutaciones, se utilizaron factores aleatorios

con un 95% de confianza. A demás, se llevó a cabo un análisis discriminante canónico para determinar si las variables eran lo suficientemente fuertes como para discriminar entre poblaciones, se utilizaron las distancias de Mahalanobis para clasificar la diferencia entre centroides de grupo. Los análisis se llevaron a cabo con los programas PRIMER 6.1.11 (PRIMER-E, 2008) y Statistica 7.0. (StatSoft, 2004).

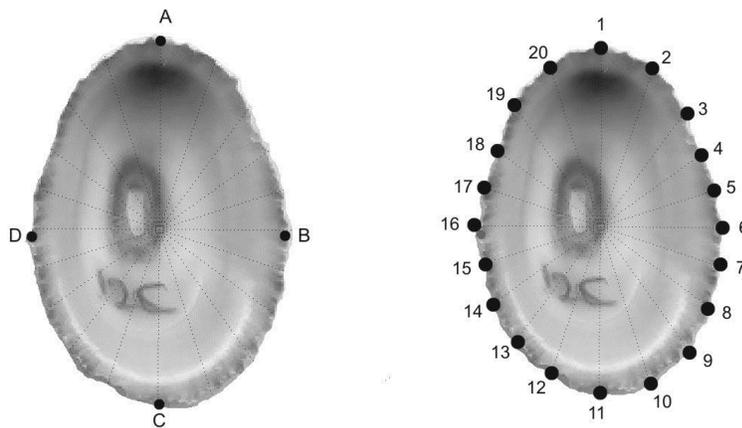


Figura 1.1. Landmarks digitalizados en *Fissurella virescens*. a) Landmarks utilizados para calcular el centroide a partir del cual se genera el abanico que permite elegir los semilandmarks. A y C representan la parte más larga de la concha, mientras B y D se encuentran a altura del final del foramen. b) Los veinte semilandmarks utilizados para el análisis de morfometría geométrica.

Morfometría Tradicional

Para el análisis de morfometría tradicional se usaron 255 conchas (Cuadro 1.1). Se utilizaron sólo las conchas que estaban bien conservadas, esto es completas y poco erosionadas.

Se consideraron once variables tomadas de manera directa y dos de proporciones estimadas a partir de la combinación de dos variables. El análisis biométrico consistió en estimar las medidas de largo (LA), alto (A) y ancho (An) de la concha. También se midió el ancho (Anf) y largo del foramen (Lf). A demás, se calculó la relación largo-ancho de la concha (L/AC) y largo-ancho del foramen (Lf/Af), así como la distancia desde el extremo anterior

de la concha, hasta el borde anterior del foramen apical (LFA) y la distancia desde el borde anterior del foramen apical hasta la parte posterior de la concha (AFA) (Olivares *et al.*, 1998). Asimismo, se estimó el peso de la concha y de la parte blanda por separado con una balanza digital. Se contaron las crenulaciones de la concha y se midió el ancho de éstas. Para la toma de las medidas se utilizó un Vernier digital de 0.01 mm de precisión. Se determinaron los valores máximos y mínimos de cada variable por población y se calcularon los valores de la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (Anexo 1). Se agregó como variable adicional al centroide calculado por los semilandmarks a partir del análisis de morfometría geométrica.

Se probó si existía colinealidad entre las variables por medio de correlaciones de Pearson (r); se eligieron sólo aquellas que presentaron una $r < 0.90$. Se escogieron siete variables altura (A), largo total (L), la relación largo-ancho (L/An), largo del foramen (LF), ancho del Foramen (AnF) y la relación largo-ancho del foramen (LF/AnF) y al centroide generado por el análisis de morfometría geométrica, mientras que el resto (seis) no fueron consideradas. Para comparar entre poblaciones, las variables seleccionadas se usaron en una PERMANOVA univariada de tipo I basada en distancias Euclidianas y la significancia estadística se probó con 9,999 permutaciones, se utilizaron factores aleatorio con un 95% de confianza. Además se les sometió a un análisis canónico discriminante (ACD) para definir si eran lo suficientemente fuertes para discriminar entre las poblaciones. Se utilizaron las distancias de Mahalanobis para clasificar las diferencias entre centroide de grupos. Asimismo se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para saber que variables aportan más a la diferenciación. Todos los análisis se llevaron a cabo con los programas PRIMER 6.1.11 (PRIMER-E, 2008) y Statistica 7.0. (StatSoft, 2004).

Elipses de Fourier

Se obtuvieron imágenes digitalizadas de 241 especímenes, 29 de Mazatlán, 50 de Isla Isabel, 42 de Bahía Banderas, 33 de Bahía de Chamela, 32 de Cuastecomate, 29 de Ixtapa y 26 de Panamá. Se escogieron conchas completas y poco erosionadas. Se tomaron fotografías de cada concha con una cámara digital FujiFilm de 12 Mega píxeles, en un fondo oscuro para generar el mayor contraste posible, para que las líneas de las conchas fueran nítidas.

Las forma de las conchas fue analizada por medio del Análisis de Elipses de Fourier (Khul y Giardina, 1982) el cual se recomienda cuando los individuos carecen de landmarks homólogos obvios (Crampton, 1995) como en el caso de *F. virescens*. Este análisis puede ayudarnos a delinear cualquier tipo de forma, ajustándola a un contorno de dos dimensiones (Iwata y Ukai, 2002). Describe el contorno con diferentes componentes llamados armónicos, que están formados por cuatro coeficientes que resultan de la proyección de cada punto del contorno en sus ejes x y y (González-Salas y Lenfant, 2007; Lord *et al.*, 2012). Estas variables se calculan por medio de las expansiones de Fourier como la suma infinita de funciones trigonométricas de longitudes de onda (ω) sucesivas decrecientes con los siguientes armónicos:

$$x(t) = (a_0^{-2}) + \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos n\omega t + b_n \sin n\omega t)$$

$$y(t) = (c_0^{-2}) + \sum_{n=1}^{\infty} (c_n \cos n\omega t + d_n \sin n\omega t)$$

donde t es la suma del desplazamiento en las direcciones x y y , que se expresa como: k que es el número de puntos a lo largo del contorno (p) y Δx_p es el desplazamiento en el eje de las x entre los pasos $p - 1$ y p . Además Δt_p es la longitud del segmento lineal entre estos pasos, t_p es el acumulado y $T = tk$ es la longitud total del contorno aproximada a partir de un polígono traza. T es además el periodo de $x(t)$ y $y(t)$ por lo tanto la longitud de onda es expresada como $\omega = 2\pi^{-T}$. Por lo tanto a partir de lo anterior se pueden calcular los coeficientes de Fourier para los coordenadas x aplicando las siguientes ecuaciones:

$$A_n = (T^{-2\pi^2 n^2}) \sum_{p=1}^K (\Delta x_p^{-\Delta t_p}) \cdot [\cos(2\pi n t_p^{-T}) - \cos(2\pi n t_{p-1}^{-T})]$$

$$B_n = (T^{-2\pi^2 n^2}) \sum_{p=1}^K (\Delta x_p^{-\Delta t_p}) \cdot [\sin(2\pi n t_p^{-T}) - \sin(2\pi n t_{p-1}^{-T})]$$

Mientras que los coeficientes para las coordenadas y se calculan de la misma manera, mediante los cambios incrementales en el eje de las y (Kuhl y Giardina, 1982; González-Salas y Lenfant, 2007):

$$C_n = (T^{-2\pi^2 n^2}) \sum_{p=1}^K (\Delta y_p^{-\Delta t_p}) \cdot [\sin(2\pi n t_p^{-T}) - \sin(2\pi n t_{p-1}^{-T})]$$

$$D_n = (T^{-2\pi^2 n^2}) \sum_{p=1}^K (\Delta y_p^{-\Delta t_p}) \cdot [\sin(2\pi n t_p^{-T}) - \sin(2\pi n t_{p-1}^{-T})]$$

La suma de los armónicos tanto para x como para y forman una elipse. Todos los armónicos calculados son independientes entre sí, por tanto pueden ser usados como descriptores morfológicos únicos. Además se calcula el espectro del poder de Fourier (PF) para determinar cuál es la cantidad de armónicos necesaria para reconstruir el contorno de la concha (Crampton 1995; González-Salas y Lenfant, 2007; Lord *et al.*, 2012). El PF está relacionado con la amplitud de los armónicos que se calcula como: $A^2+B^2+C^2+D^2$ (Renaud *et al.*, 1996) también conocidos como los descriptores elípticos de Fourier (EFD). Por tanto PF para la n th armónica es igual a $PF_n = (A_n^2 + B_n^2 + C_n^2 + D_n^2)^{-2}$. El valor del acumulado es $PF_c = \sum_1^n PF_n$.

Los armónicos fueron calculados y normalizados a partir del programa Shape 1.3 (Iwata y Ukai, 2002) que nos permite liberar la forma de la influencia de la orientación, el tamaño y la localización. A partir de estos EFD's se calcularon las amplitudes que fueron sometidas a una PERMANOVA univariada tipo I para comparar forma de la concha entre las poblaciones. La PERMANOVA se calculó a partir de la matriz de semejanza generada por medio de distancias euclidianas y su significancia estadística se probó con 9,999 permutaciones, utilizando factores aleatorios y con un 95% de confianza. Así mismo se llevó a cabo un análisis discriminante canónico para determinar si las variables eran lo suficientemente fuertes como para discriminar entre los sitios. Se utilizaron las distancias de Mahalanobis para clasificar las distancias entre centroides de grupo. Los análisis se llevaron a cabo con los programas PRIMER 6.1.11 (PRIMER-E, 2008) y Statistica 7.0. (StatSoft, 2004).

RESULTADOS

Morfometría geométrica

La PERMANOVA mostró que existen diferencias significativas en la forma de las conchas entre las siete poblaciones estudiadas ($F_{6, 258} = 9.79$; $p = 0.0001$) a partir de los veinte semilandmarks utilizados. El análisis discriminante canónico de los PW reveló que existen dos discriminantes significativas ($p < 0.05$) que explican el 76% de la variación encontrada en las poblaciones. Los valores de separación entre las poblaciones fueron altamente significativos (Wilks $\lambda = 0.1499$, $F_{216, 1330} = 2.32$, $p < 0.0001$). En la figura 1.2 se muestran estas dos discriminantes, se observa que los individuos tienen una tendencia a agruparse dentro de su población de procedencia. La población que presenta una separación más marcada es la de Ixtapa. Las poblaciones de Mazatlán, Isla Isabel y Bahía Banderas se agrupan, siendo Isla Isabel la de mayor sesgo. Por su parte las poblaciones de Bahía de Chamela y Cuastecomate tienden a seguir un patrón de dispersión parecido, lo mismo que la de Panamá. Basado en las distancias de Mahalanobis, el modelo solo pudo clasificar al 60.7% de los individuos en su población correspondiente (Cuadro 1.2). La población que presentó menor dispersión fue la de Ixtapa, en la que el 88% de sus individuos fueron clasificados correctamente, mientras que las poblaciones de Bahía de Chamela, Mazatlán y Panamá presentaron valores de clasificación menores al 50%. Solo el 39.39% de los 33 individuos de Bahía de Chamela fueron clasificados dentro de su población, siendo ésta la que mayor dispersión presenta. Las distancias cuadradas de Mahalanobis (D^2) indicaron que los centroides más alejados se encontraron entre las poblaciones de Isla Isabel e Ixtapa ($D^2 = 17.197$), mientras que las más cercanas fueron las de Cuastecomate y Bahía de Chamela ($D^2 = 17.197$) (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.2. Matriz de clasificación de individuos por población del análisis discriminante canónico para los PW, generado a partir de las distancias de Mahalanobis. El 60.75% de los individuos fueron clasificados correctamente dentro de su población de origen. Donde N: número de individuos por población.

| | N | %correcto de clasificación | M | II | BB | BC | C | Ix | P |
|------------------------------|-----|----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| Mazatlán (M) | 31 | 41.93 | 13 | 10 | 4 | 1 | 2 | 1 | 0 |
| Isla Isabel (II) | 58 | 75.86 | 2 | 44 | 5 | 4 | 0 | 0 | 3 |
| Bahía Banderas (BB) | 47 | 55.32 | 4 | 10 | 26 | 1 | 3 | 2 | 1 |
| Bahía de Chamela (BC) | 33 | 39.39 | 2 | 3 | 9 | 13 | 3 | 1 | 2 |
| Cuastecomate (C) | 33 | 66.67 | 0 | 1 | 3 | 4 | 22 | 1 | 2 |
| Ixtapa (Ix) | 34 | 88.23 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 30 | 3 |
| Panamá (P) | 29 | 44.83 | 3 | 2 | 5 | 1 | 4 | 1 | 13 |
| Total | 265 | 60.75 | 24 | 70 | 52 | 25 | 34 | 36 | 24 |

Cuadro 1.3 Matriz pareada de distancias cuadradas de Mahalanobis (D^2) del análisis discriminante canónico y sus valores p asociados. Los valores por encima de la diagonal corresponden a los valores de p , mientras que los que se encuentran por debajo de la diagonal son los valores D^2 .

| | M | II | BB | BC | C | Ix | P |
|------------------------------|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|
| Mazatlán (M) | - | 0.049 | 0.407 | 0.140 | 0.003 | 0.000 | 0.015 |
| Isla Isabel (II) | 3.032 | - | 0.085 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Bahía Banderas (BB) | 2.329 | 2.209 | - | 0.143 | 0.003 | 0.000 | 0.025 |
| Bahía de Chamela (BC) | 3.352 | 4.952 | 2.754 | - | 0.979 | 0.000 | 0.368 |
| Cuastecomate (C) | 4.879 | 6.432 | 4.069 | 1.421 | - | 0.000 | 0.081 |
| Ixtapa (Ix) | 12.654 | 17.197 | 11.811 | 10.451 | 9.808 | - | 0.000 |
| Panamá (P) | 4.613 | 6.669 | 3.671 | 2.892 | 3.743 | 8.471 | - |

El análisis de gradillas de deformación de cada una de las poblaciones permite observar que la mayor deformación se encuentra en el ancho de las conchas (Anexo 2). Estas diferencias se presentan dependiendo del lado de la concha donde se da la mayor deformación. Se observa que mientras las poblaciones de Mazatlán, Bahía Banderas y Panamá tienden a contraerse hacia el centro de la concha, las poblaciones de Isla Isabel Bahía de Chamela y Cuastecomate lo hacen hacia el lado izquierdo. Por su parte las conchas de Ixtapa tienden a una mayor deformación hacia la parte derecha. La gradilla de deformación total para las siete poblaciones nos permite observar los vectores de desplazamiento que muestran

claramente que la deformación se da principalmente en el centro de la concha. Las conchas tienden a tener mayor variación hacia la parte apical y media de la concha. Este cambio en la forma es independiente del tamaño (Figura 1.3).

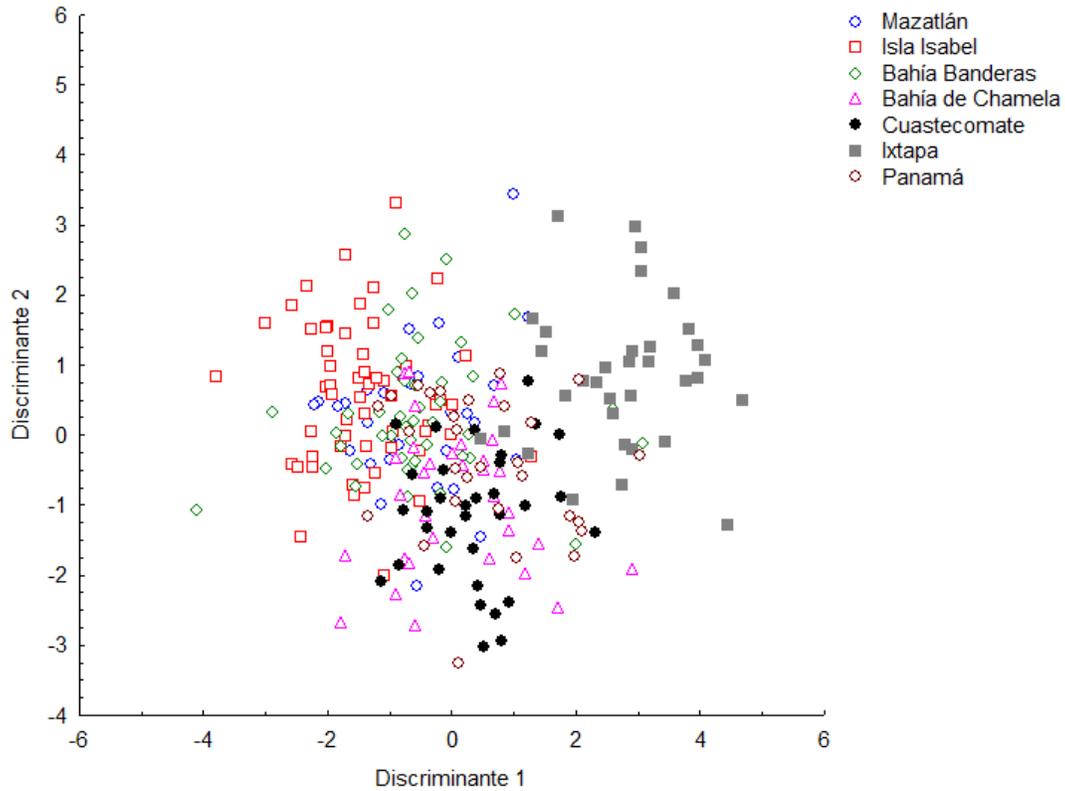


Figura 1.2. Diagrama de dispersión del análisis de funciones discriminantes de la morfometría geométrica de las siete poblaciones de *Fissurella virescens* estudiadas.

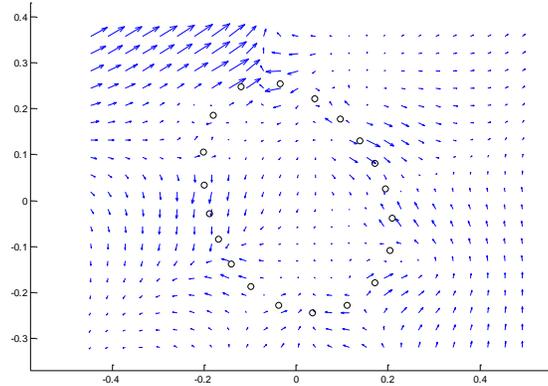


Figura 1.3. Gradilla de deformación creada con veinte landmarks que describen la forma general de *F. virescens*, generada con 255 individuos de siete poblaciones. Las flechas más grandes señalan en donde hay mayor variación.

Morfometría tradicional

Los valores máximos de las variables A (20.78 mm), L (51.23 mm) y An (41.18mm.) se presentaron en las conchas de Isla Isabel, mientras que los menores en la población de Ixtapa A (3.78 mm), L (12.90 mm) y An (8.54 mm.). El valor mayor para la media de la relación L/An fue para Ixtapa 1.49 mm. Sin embargo el coeficiente de variación (entre 0.04 y 0.07) permaneció casi constante para todas las poblaciones La relación de la variable LF/AnF tuvo un alto grado de variación sobre todo para las poblaciones de Bahía Banderas (0.20) e Isla Isabel (0.18) (Anexo 1).

La comparación entre las poblaciones estudiadas presentó diferencias significativas según la PERMANOVA ($F_{6, 254}=44.36$, $p= 0.0001$). A pesar del alto grado de significancia del análisis, solo el 66.27% de los individuos fueron correctamente clasificados (Cuadro 1.4). La población de Bahía Banderas presentó mayor dispersión, siendo solamente el 40.42% de los 47 individuos clasificados correctamente. La población de Ixtapa fue la mejor clasificada, con el 96.96% de los individuos fueron clasificados correctamente. El análisis discriminante canónico de las variables elegidas fue significativo (Wilks $\lambda = 0.0995$ $F_{42, 1138} = 17.2213$; $p < 0.0001$). Se generaron seis discriminantes, tres significativas para el análisis con valores de $p < 0.05$. Éstas explicaron el 94% de las diferencias encontradas entre los sitios. En la figura 1.4 se observa que los individuos tienden a agruparse dentro de su población de procedencia. La población que presenta mayor dispersión es Bahía de

Chamela. Asimismo, en Ixtapa e Isla Isabel se observa un fuerte agrupamiento. Las poblaciones de Mazatlán, Bahía Banderas, Cuastecomate y Panamá parecen agruparse. Según los valores de la distancia cuadrada de Mahalanobis (D^2) la menor distancia se presentó entre Cuastecomate y Bahía Banderas ($D^2= 0.823$), mientras que la mayor entre Ixtapa y Bahía de Chamela ($D^2= 23.489$) (Cuadro 1.5).

Sólo los dos primeros componentes del PCA fueron significativos, estos dos factores logran explicar el 83.3% de las diferencias presentes entre poblaciones. Las variables más representativas para cada factor se observan en la figura 1.5. Los individuos de las poblaciones de Ixtapa se separan del resto gracias a la variable de la relación largo sobre ancho (L/An) (Figura 1.5). Mientras que los de Isla Isabel se separan por las variables relacionadas con el tamaño, ya que presentaron en promedio un tamaño mayor de la concha (Anexo 1).

Cuadro 1.4. Matriz de clasificación de individuos por población del análisis discriminante canónico para los valores de la morfometría tradicional basados en las distancias de Mahalanobis. Solo el 66.27% de los individuos fueron clasificados correctamente dentro de su población de origen.

| Sitio | N | % correcto de clasificación | M | II | BB | BC | C | Ix | P |
|------------------------------|-----|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| Mazatlán (M) | 26 | 50.00 | 13 | 4 | 1 | 0 | 1 | 6 | 1 |
| Isla Isabel (II) | 58 | 77.58 | 4 | 45 | 6 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| Bahía Banderas (BB) | 47 | 40.42 | 1 | 13 | 19 | 2 | 7 | 2 | 3 |
| Bahía de Chamela (BC) | 29 | 75.86 | 0 | 3 | 4 | 22 | 0 | 0 | 0 |
| Cuastecomate (C) | 33 | 57.57 | 2 | 1 | 11 | 0 | 19 | 0 | 0 |
| Ixtapa (Ix) | 33 | 96.96 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 | 0 |
| Panamá (P) | 29 | 65.51 | 2 | 1 | 3 | 0 | 4 | 0 | 19 |
| Total | 255 | 66.27 | 23 | 67 | 44 | 24 | 32 | 40 | 25 |

Cuadro 1.5. Matriz pareada de distancias cuadradas de Mahalanobis (D^2) del análisis discriminante canónico y sus valores p asociados. Los valores por encima de la diagonal corresponden a los valores de p , mientras que los que se encuentran por debajo de la diagonal son los valores D^2 .

| | M | II | BB | BC | C | Ix | P |
|------------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|----------|
| Mazatlán (M) | - | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.007 |
| Isla Isabel (II) | 4.525 | - | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Bahía Banderas (BB) | 1.831 | 2.096 | - | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.032 |
| Bahía de Chamela (BC) | 13.941 | 12.231 | 9.653 | - | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Cuastecomate (C) | 1.395 | 4.086 | 0.823 | 13.057 | - | 0.000 | 0.000 |
| Ixtapa (Ix) | 7.785 | 15.269 | 10.392 | 23.489 | 5.883 | - | 0.000 |
| Panamá (P) | 5.883 | 8.782 | 3.539 | 17.336 | 2.960 | 12.962 | - |

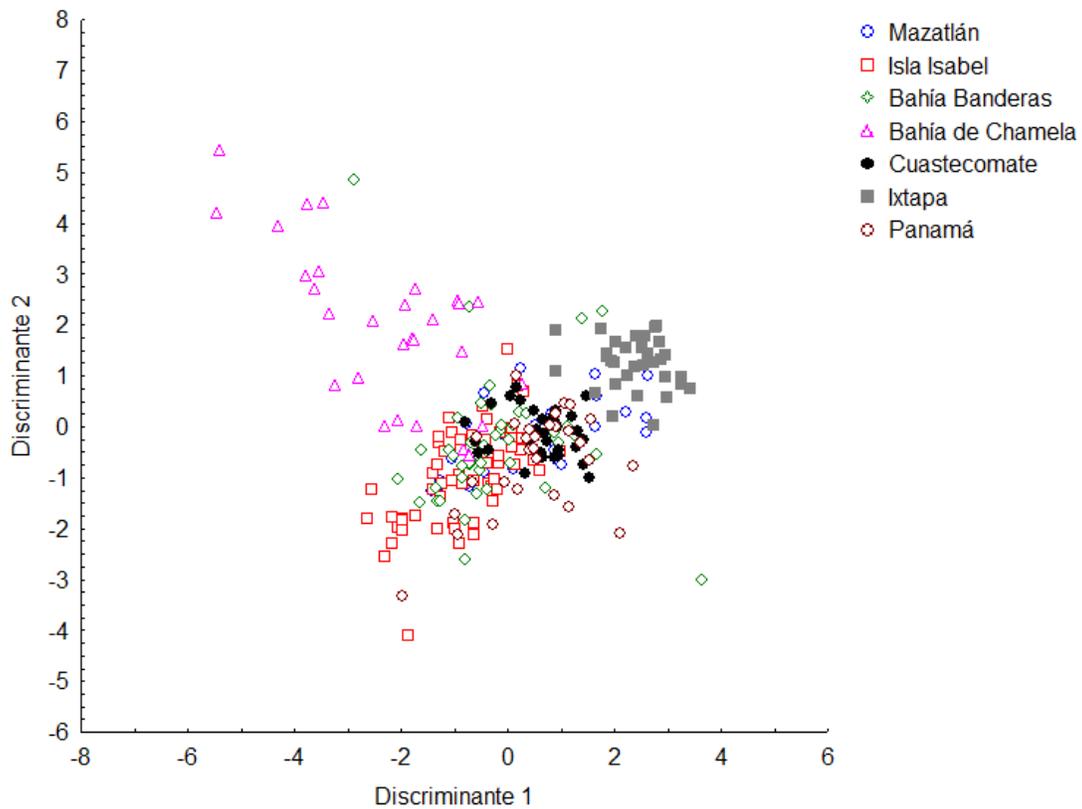
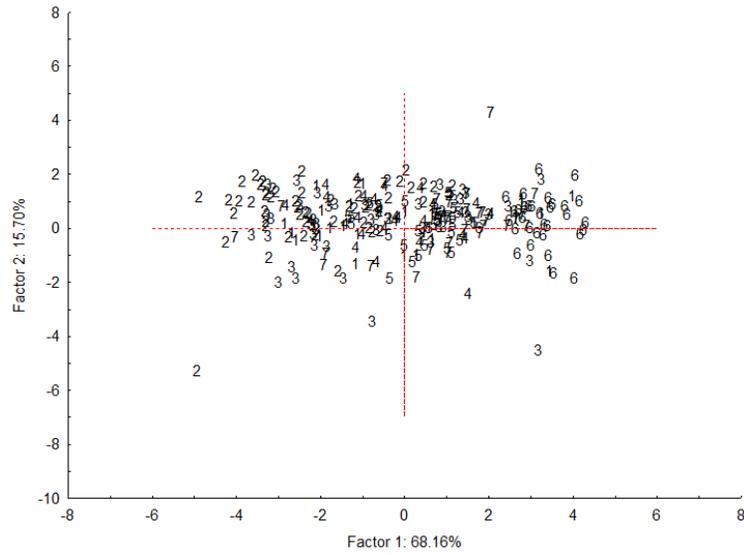


Figura 1.4. Diagrama de dispersión del análisis discriminante canónico, basado en siete variables utilizadas para describir la forma de la concha de *F. virescens* provenientes de siete poblaciones. Se muestran las dos primeras discriminantes describen el 94% de la variación.

a)



b)

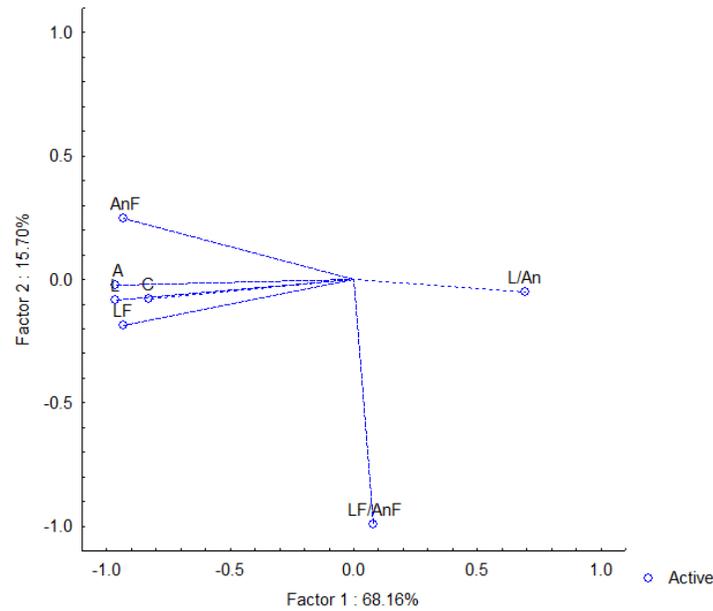


Figura 1.5. Análisis PCA de siete poblaciones de *F. virescens*. a) Separación de las poblaciones usando los dos primeros componentes principales b) Proyección de las variables altura (A), largo (L), relación largo/ancho (L/An), ancho del foramen (AnF), largo del foramen (LF) y relación largo/ancho del foramen (LF/AnF) en los dos primeros componentes principales que explican el 83.3% de las diferencias.

Nota: 1. Mazatlán, 2 Isla Isabel, 3 Bahía Banderas, 4 Bahía de Chamela, 5 Cuastecomate, 6 Ixtapa, 7 Panamá.

Elipses de Fourier

Los valores de PF indicaron que los primeros seis armónicos eran suficientes para describir el 99.99% de la forma de las conchas de *F. virescens* (Figura 1.6). Pero se utilizaron sólo los coeficientes y las amplitudes de Fourier de cinco de éstos, ya que el primer armónico corresponde a una elipse perfecta y no aporta información relevante.

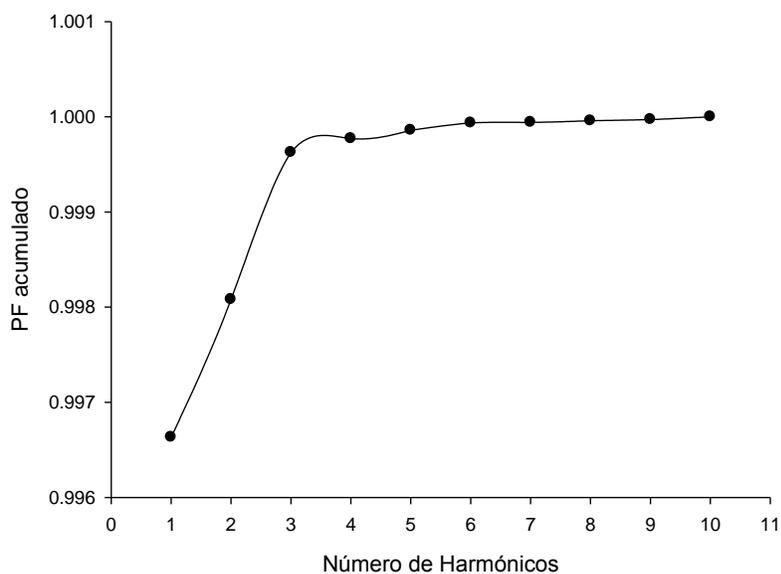


Figura 1.6. Poder de Fourier acumulado. Con los primeros 6 armónicos se describe el 99.99% de la forma.

Los valores de las amplitudes de los cinco armónicos seleccionados fueron utilizados para la PERMANOVA de una vía. La comparación entre las poblaciones indicó que existen diferencias significativas entre poblaciones ($F_{5, 234} = 5.5328$; $p = 0.0001$). Cada concha fue descrita por 20 variables (4 coeficientes por 5 armónicos), las que se utilizaron en el análisis discriminante canónico. Este generó un total de cinco discriminantes, siendo solo los tres primeros significativos ($p < 0.05$), que logran explicar el 78% de la variación entre los individuos por población (Figura 1.7). Los valores para la clasificación fueron altamente significativos (Wilks $\lambda = 0.3794$, $F_{120, 1250} = 1.9018$; $p < 0.0001$). Las poblaciones de *F. virescens* estudiadas no logran diferenciarse unas de otras (Figura 1.7). Se observa que las poblaciones de Ixtapa y Cuastecomate logran agruparse, sin separarse del resto de las

poblaciones. Las otras cinco no logran diferenciarse unas de otras sugiriendo que la variación entre las poblaciones no es muy marcada. Basado en las distancias de Mahalanobis (D^2) el modelo sólo logra clasificar correctamente al 45% de los individuos, en su población correspondiente (Cuadro 1.6). La población que presentó menor dispersión fue Isla Isabel, en la que 32 de sus 50 individuos fueron clasificados correctamente (64%), mientras que las poblaciones de Mazatlán, Bahía Banderas y Panamá obtuvieron el menor porcentaje de clasificación por debajo del 35%. Las distancias cuadradas de Mahalanobis (D^2) indicaron que los centroides más alejados son las poblaciones de Ixtapa y Panamá ($D^2= 4.007$), las más cercanas fueron las poblaciones de Mazatlán e Isla Isabel ($D^2= 1.238$) (Cuadro 1.7).

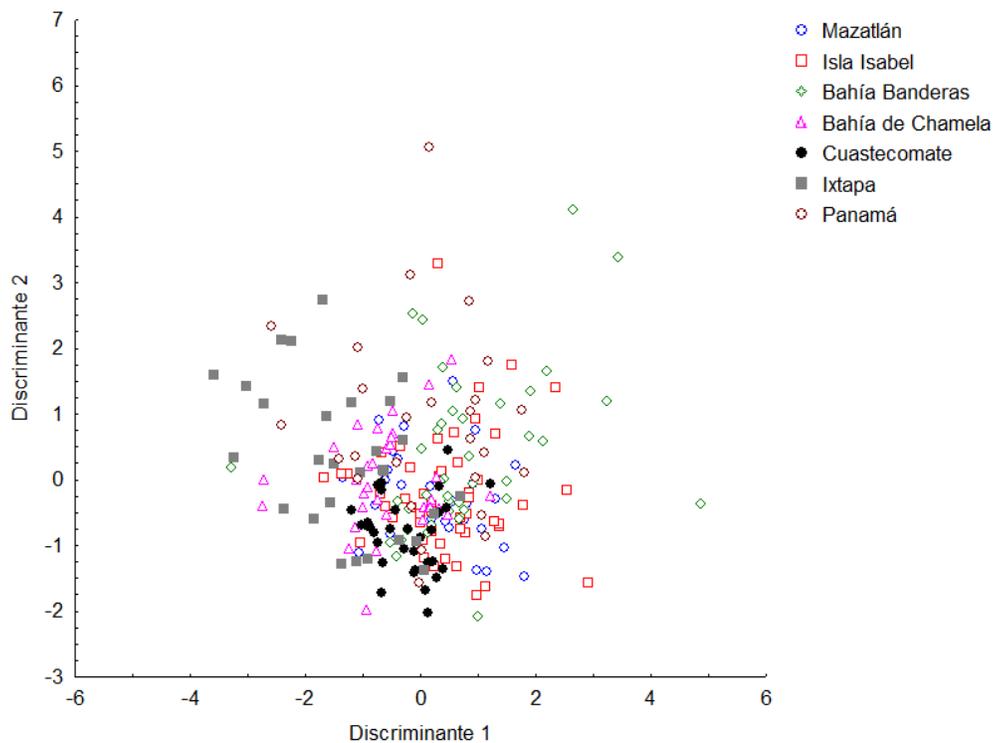


Figura 1.7. Diagrama de dispersión del análisis discriminante canónico basado en 20 coeficientes de Fourier que describen la forma de la concha de *F. virescens*. Estas dos discriminantes describen el 59% de la variación.

Cuadro 1.6. Matriz de clasificación por población del análisis discriminante canónico basado en distancias de Mahalanobis. Solo el 45.64% de los individuos fueron clasificados correctamente dentro de su población de origen.

| Sitio | N | % correcto de clasificación | M | II | BB | BC | C | Ix | P |
|-----------------------|-----|-----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| Mazatlán (M) | 29 | 31.03 | 9 | 10 | 2 | 1 | 2 | 4 | 1 |
| Isla Isabel (II) | 50 | 64.00 | 2 | 32 | 4 | 1 | 3 | 4 | 4 |
| Bahía Banderas (BB) | 42 | 33.33 | 3 | 15 | 14 | 5 | 3 | 1 | 1 |
| Bahía de Chamela (BC) | 33 | 48.48 | 2 | 5 | 2 | 16 | 3 | 2 | 3 |
| Cuastecomate (C) | 32 | 50.00 | 1 | 10 | 1 | 3 | 16 | 1 | 0 |
| Ixtapa (Ix) | 29 | 48.27 | 1 | 7 | 0 | 3 | 2 | 14 | 2 |
| Panamá (P) | 26 | 34.61 | 1 | 6 | 4 | 2 | 3 | 1 | 9 |
| Total | 241 | 45.64 | 19 | 85 | 27 | 31 | 32 | 27 | 20 |

Cuadro 1.7. Matriz pareada de distancias cuadradas de Mahalanobis (D^2) del análisis discriminante canónico y sus valores p asociados. Los valores por encima de la diagonal corresponden a los valores de p , mientras que los que se encuentran por debajo de la diagonal son los valores D^2 .

| | M | II | BB | BC | C | Ix | P |
|-----------------------|-------|--------------|--------------|-------|--------------|-------|--------------|
| Mazatlán (M) | - | 0.412 | 0.400 | 0.028 | 0.377 | 0.001 | 0.041 |
| Isla Isabel (II) | 1.238 | - | 0.168 | 0.003 | 0.059 | 0.000 | 0.012 |
| Bahía Banderas (BB) | 1.338 | 1.259 | - | 0.001 | 0.001 | 0.000 | 0.058 |
| Bahía de Chamela (BC) | 2.457 | 2.444 | 2.770 | - | 0.337 | 0.010 | 0.100 |
| Cuastecomate (C) | 1.539 | 1.760 | 2.883 | 1.492 | - | 0.000 | 0.004 |
| Ixtapa (Ix) | 3.545 | 3.838 | 4.807 | 2.765 | 3.617 | - | 0.000 |
| Panamá (P) | 2.639 | 2.439 | 2.145 | 2.176 | 3.216 | 4.007 | - |

Cuadro 1.8. Comparación de la PERMANOVA de una vía y el análisis discriminante canónico (ADC) de los tres métodos utilizados para determinar las diferencias en la forma de la concha de *F. virescens*. Gl grados de libertad.

| | gl | PERMANOVA | Valor p | ADC | Valor p | %clasificación del ADC |
|-------------------------|-----|-----------|---------|---------|---------|------------------------|
| Morfometría geométrica | 265 | F=9.79 | 0.0001* | F=2.32 | 0.0001* | 60.75 |
| Morfometría tradicional | 255 | F=44.36 | 0.0001* | F=17.22 | 0.0001* | 66.27 |
| Elipses de Fourier | 241 | F=5.53 | 0.0001* | F=1.90 | 0.0001* | 45.64 |

DISCUSIÓN

A pesar, de que las PERMANOVAS marcaron diferencias significativas entre las poblaciones de *Fissurella virescens* del Pacífico oriental tropical, se encontró que estas diferencias dependían del tipo de método morfométrico utilizado. Además, cuando se observan los cuadros comparativos de las distancias de Mahalanobis se nota que existen poblaciones con centroides muy cercanos entre sí por lo que se considera que no hay diferencias en forma entre estas poblaciones.

Los métodos utilizados tuvieron diferentes poderes de discriminación. Aunque se registraron diferencias significativas, ninguno de los métodos logró discriminar de forma efectiva entre las siete poblaciones (Cuadro 1.8). El análisis tradicional obtuvo el valor más alto y fue el único que mostró significancia en las distancias de Mahalanobis. Sin embargo, este análisis debe ser tomado con cautela ya que tiende a sesgar la información al estar sujeto al tamaño del individuo (Adams *et al.*, 2004). Se ha demostrado que las variables altura total y ancho total de la concha, así como largo y ancho máximo de la apertura apical (foramen) están fuertemente correlacionadas con la longitud total de la concha (Bretos y Chihuailaf, 1990; Olivares *et al.*, 1998). Esto parece ser congruente con las poblaciones de *Fissurella virescens*. La variación encontrada con el análisis de morfometría geométrica basada en abanicos se relaciona con cambios en el ancho de la concha. No obstante, estos cambios no son constantes y perceptibles por lo que los valores de discriminación permanecieron bajos (60.75%). Por su parte, el análisis de Elipses de Fourier presentó el menor valor de discriminación, esto contrasta con lo encontrado en bivalvos como *Mytilus chilensis* (Krapivka *et al.*, 2007), *Chamelea gallina* (Palmer *et al.*, 2004) o *Ameghinomya antiqua* (Márquez *et al.*, 2010) donde se logró clasificar con éxito entre el 80 y el 90% de los individuos con este mismo método. En *F. virescens* los valores de discriminación oscilaron entre 65% y el 45% lo que hace suponer que la forma de la concha es constante como se ha documentado en otros estudios sobre fisúrelas (Bretos y Chihuailaf, 1990; Olivares *et al.*, 1998). Al hacer las comparaciones entre poblaciones por medio de las distancias de Mahalanobis notamos que siete de las 21 comparaciones hechas con la morfometría geométrica no son significativas, por lo que se asume que las poblaciones no presentan diferencias entre ellas, lo mismo sucede con ocho de las comparaciones generadas con el análisis de Fourier. Es por esto que se cree que las poblaciones no

presentan fuertes diferencias entre si y por lo que los valores de discriminación son bajos. Al parecer los valores de significancia altos están dados por la población de Ixtapa que presenta diferencias significativas con el resto.

El análisis tradicional que se limita a medir de forma lineal las variables, ha sido usado en otras especies del género *Fissurella* como *F. pulchra* (Bretos y Chihuailaf, 1990) y *F. latimarginata* (Olivares *et al.*, 1998), sin embargo este método debe ser usado con cautela ya que tiende a subestimar las diferencias al ser afectado por el tamaño del individuo. Este método a diferencia de los otros dos utilizados en este trabajo, permite analizar variables como la altura, el número de crenulaciones, los colores u otras que influyen en las diferencias entre poblaciones. Es recomendable que cuando este método se aplique a otras especies de lapas, se utilice en conjunto con otra aproximación que elimine la influencia del tamaño en las variables. La morfometría geométrica basada en abanicos es una opción adecuada cuando los landmarks no son fácilmente identificables, tal como sucede en las lapas de los géneros *Fissurella*, *Collisella* o *Diodora*, porque permite: 1) una separación completa entre forma y tamaño, 2) permite visualizar la variación en la forma, 3) nos ayuda a generar pseudolandmarks en la ausencia de caracteres morfométricos específicos, 4) es barato y 5) utiliza software fácil de manejar. Este método ha sido poco aplicado a moluscos (Leyva-Valencia *et al.*, 2012) y no se conocen trabajos en los que se aplique esta metodología a otras lapas. El método de Elipses de Fourier analiza la forma separándola del tamaño y se puede utilizar en especímenes que no poseen landmarks obvios, como es el caso de muchas lapas y bivalvos (Rhoff y Archie, 1984; Crampton, 1995). Es probable que este método sea mejor utilizado cuando las formas son más contrastantes, o donde existen proyecciones de la concha como es el caso de algunas especies del género *Collisella*, como *C. turveri* o *C. pediculus* que presentan proyecciones en el margen de la concha, o en especies del género *Fissurella* como *F. microtrema* donde la forma de la concha es más estrecha hacia la parte anterior.

La variación en la forma de la concha de *F. virescens* puede ser explicada a partir de los factores ambientales. Es sabido que los moluscos presentan una fuerte plasticidad fenotípica, sobre todo aquellos que están en ambientes estresantes, como es el caso de lapa aquí estudiada. Factores como el oleaje, la desecación, el ataque de depredadores, la disponibilidad de alimento, la temperatura entre otros son los principales causantes de la

variación fenotípica de las conchas de los moluscos (Vermeij, 1973; Trussell y Etter, 2001; Queiroga *et al.*, 2011; Teso *et al.*, 2011).

Es factible que la variación en la altura y en el ancho de las conchas de *F. virescens* esté más relacionada con el nivel del intermareal en el que se encuentren y con la intensidad de las olas, que a la temperatura, la disponibilidad de alimento o al impacto que tenga la playa. Se sabe que las poblaciones sometidas a fuertes oleajes tienden a cambiar su forma para adaptarse a los embates del agua (Hobday, 1995, Ríos-Jara *et al.*, 2004; Khouw, 2006). En *F. virescens* los individuos de Isla Isabel fueron los más anchos y más altos, esta población proviene de una playa semiexpuesta, y los especímenes fueron recolectados en la parte alta del intermareal, mientras que los de Ixtapa presentaron conchas pequeñas y aplanadas y fueron recolectados en la parte más baja de una playa semiexpuesta. En otras especies se observó que la altura de la concha está relacionada con la posición del organismo en el intermareal, por ejemplo en *Cellana testudinaria* una lapa que habita las playas rocosas en Indonesia, se demostró que los individuos de la zona alta del intermareal tienden a ser más altos que los encontrados en la zona baja (Khouw, 2006). Por su parte Olivares y colaboradores (1998) señalan que para *Fissurella latimarginata* de Chile, el oleaje es el factor que influye en la altura de la concha. En *Siphonaria gigas* se concluyó que la altura y el grosor de la concha están directamente relacionados con la intensidad de las olas, y que las conchas eran más bajas y delgadas en las zonas expuestas a las olas en la parte media e inferior del intermareal (Giraldo-López y Gómez-Schouben, 1999). Davis (1969) mencionó que las lapas de *Patella* eran más altas en el nivel superior del intermareal y se aplanaban cuando los individuos se acercaban a la rompiente de la ola. Las conchas delgadas y aplanadas son una adaptación a la parte más baja y expuesta del intermareal (Denny y Blanchette, 2000).

Hobday (1995) sugiere que en *Lottia digitalis*, una lapa en la zona del Pacífico de California, los organismos tienden a ser más grandes en la parte alta del intermareal y más pequeños hacia las partes bajas, esto podría explicar el hecho de que las poblaciones de Ixtapa sean más pequeñas, pues fueron recolectadas en la parte más baja del intermareal. No así las de Mazatlán, Bahía Banderas e Isla Isabel que presentan en promedio a los individuos más grandes y fueron colectadas en la zona más alta.

Al variar la altura de la concha se provocan cambios en el ancho de ésta (Vermeij, 1973). Lo que podría aclarar, el porque de las diferencias encontradas con la morfometría geométrica en el ancho de las conchas de las poblaciones de *F. virescens*. Las lapas se han adaptado a la forma cónica aplanada de sus conchas para obtener una mayor apertura y mejor fijación al sustrato (Denny, 2000). Puede ser que la relación altura/ancho afecte la forma general de la concha, provocando una deformación en ésta. Las poblaciones de Mazatlán, Bahía Banderas y Bahía de Chamela parecerían estar sometidas a la misma intensidad de oleaje o sus individuos provienen de la misma zona del intermareal y por se agrupan en los análisis morfométricos. Sin embargo, la concha de la población de Ixtapa parece ser muy diferente, la relación largo/ancho es la más grande de todas. Kheow (2006) demostró que para *Cellana testudinaria* esta relación era mayor en los individuos del intermareal medio bajo, lo que hace suponer que la relación de la posición del intermareal, más el embate de las olas son los principales arquitectos de la forma de la concha en *F. virescens*. Para probar esto sería necesario hacer un estudio donde se midan individuos de diferentes exposiciones al oleaje y registrar si los cambios están correlacionados con su posición en el intermareal o con la exposición al oleaje o a ambas.

Se puede concluir que *F. virescens* presenta una plasticidad fenotípica y que las variaciones en la forma están sujetos a procesos internos dentro de las playas donde se encuentran las diferentes poblaciones. Parece que la forma de la concha es modelada por el tipo de oleaje al que se encuentran sometidas. En este sentido es necesario realizar un estudio que considere diferentes variables ambientales, como la intensidad de las olas, la desecación, la exposición a los depredadores, entre otros que puedan explicar la variación en la forma de la concha.

LITERATURA CITADA

- Adams, D. C., F. J. Rohlf y D. E. Slice. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology* 71: 5-16.
- Bagatini, Y. M., R. de Souza P., J. Higuti, E. Benedito-Cecilio, A. J. Prioli y S. M. Alves P. 2005. Morphological and molecular characterization of *Corbicula* (Mollusca, Bivalvia) at Rosana Reservoir, Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 27(4): 397-404.
- Beukema, J. J., y B. W. Meehan. 1985. Latitudinal variation in linear growth and other shell characteristics of *Macoma balthica*. *Marine Biology* 90: 27-33.
- Bookstein, F. L. 1986. Size and shape spaces for landmark data in two dimensions. *Statistical Science* 1: 181-242.
- Bookstein, F. L. 1991. *Morphometric tools for landmark data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bookstein, F. L. 1996. Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Medical Image Analysis* 1(3): 225-243.
- Bretos, M. y R. H. Chihuailaf. 1990. Biometría y otros aspectos biológicos de *Fissurella pulchra* (Mollusca: Prosonbranchia). *Revista de Biología Marina, Valparaíso* 25(1): 1-14.
- Carvajal-Rodríguez, A., P. Conde-Padín y E. Rolán-Alvarez. 2005. Decomposing shell form into size and shape by geometric morphometric methods in two sympatric ecotypes of *Littorina saxatilis*. *Journal of Molluscan Studies* 71: 313-318.
- Conde-Padín, P., J.W. Grahame y E. Rolán-Alvarez. 2007. Detecting shape differences in species of the *Littorina saxatilis* complex by morphometric analysis. *Journal of Molluscan Studies* 73: 147-154.
- Crampton J. S. 1995. Elliptic Fourier shape analysis of fossil bivalves: some practical considerations. *Lethaia* 28: 179-186.

- Davies, P. S. 1969. Physiological ecology of *Patella*.III. Desiccation effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 49: 291-304.
- Deng, Y., X. Du, R. Huang, Q. Wang. 2008. Morphological and karyotypic variation in three wild populations of *Meretrix meretrix*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* 26(1): 76-80.
- Denny, M. W. 2000. Limits to optimization: Fluid dynamics, adhesive strength and the evolution of shape in limpet shells. *Journal of Experimental Biology* 203: 2603-2622.
- Denny, M. W. y C. A. Blanchette. 2000. Hydrodynamics, shell shape, behavior and survivorship in the owl limpet *Lottia gigantean*. *Journal of Experimental Biology* 203: 2623-2639.
- Giraldo-López, A. y C. Gómez-Schouben. 1999. Variación en la concha de *Siphonaria gigas* (Sowerby, 1825) como respuesta al efecto de la intensidad de las olas. *Ciencias Marinas* 25(2): 213–224.
- González-Salas, C., P. Lenfant. 2007. Inter-annual variability and intra-annual stability of the otolith shape in European anchovy *Engraulis encrasicolus* (Linneus, 1758) in the Bay of Biscay. *Journal of Fish Biology* 70: 35-49.
- Hobday, A. 1995. Body-size variation exhibited by an intertidal limpet: Influence of wave exposure, tidal height and migratory behavior. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 189: 29-45.
- Iwata, H., Y. Ukai. 2002. Shape: a computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *Journal of Heredity* 93: 384-385.
- Johannesson, K., B. Johannesson y E. Rolán-Álvarez. 1993. Morphological differentiation and genetic cohesiveness over a microenvironmental gradient in the marine snail *Littorina saxatilis*. *Evolution* 47: 1770-1787.

- Johnston, M. R., R. E. Tobachnick, y F. L. Bookstein. 1991. Landmark-based morphometrics of spiral accretionary growth. *Paleobiology* 17: 19-36.
- Keen, A. M. 1971. Seashells of Tropical West America. Marine mollusks from Baja California to Peru. Stanford Univ. Press, Stanford. 1065p.
- Khouw, A. S. 2006. Shell shape variation of tropical limpet *Cellana testudinaria* (Class: Gastropoda, Family: Patellidae) Living on the Rocky Shore in Relation to Their Zonal Distribution. *ILMU KELAUTAN* 11(3): 171-180.
- Krapivka, S., J. E. Toro, A. C. Alcapán, M. Astorga, P. Presa, M. Pérez y R. Guíñez. 2007. Shell-shape variation along the latitudinal range of the Chilean blue mussel *Mytilus chilensis* (Hupe 1854). *Aquaculture Research* 38: 1770-1777.
- Kuhl, F. P. y C. R. Giardina. 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer Graphics and Image Processing* 18: 236-258.
- Lacerda, L. E. M., I. C. Miyahira y S. B. Santos. 2011. Shell morphology of the freshwater snail *Gundlachia ticaga* (Gastropoda: Ancyliidae) from four sites in Ilha Grande, southeastern Brazil. *Zoologia* 28(3): 334-342.
- Latiolais, J. M., M. S. Taylor, K. Roy y M. E. Hellberg. 2006. A molecular phylogenetic analysis of strombid gastropod morphological diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 436-444.
- Leyva-Valencia, I., S. T. Álvarez-Castañeda, D. B. Lluch-Cota, S. González-Peláez, S. Pérez-Valencia, B. Vadopalas, s. Ramírez-Pérez y P. Cruz-Hernández. 2012 Shell shape differences between two *Panopea* species and phenotypic variation among *P. globosa* at different sites using two geometric morphometrics approaches. *Malacologia* 55 (1): 1-13.
- Lord, C., F. Morat, R. Lecomte y P. Keith. 2012 Otolith shape analysis for three *Sicyopterus* (Teleostei: Gobioidi: Sicydiinae) species from New Caledonia and Vanuatu. *Environmental Biology of Fishes* 93(2): 209-222.

- Márquez, F., R. González-José y G. Bigatti 2011. Combined methods to detect pollution effects on shell shape and structure in Neogastropods. *Ecological Indicators* 11: 248-254.
- Márquez, F., J. Robledo, G. Escati P., y S. Van der Molen. 2010. Use of different geometric morphometrics tools for the discrimination of phenotypic stocks of the striped clam *Ameghinomya antiqua* (Veneridae) in north Patagonia, Argentina. *Fisheries Research* 101: 127-131.
- Márquez F. y S. Van Der Molen. 2011. Intraespecific shell-shape variation in the razor clam *Ensis macha* along the Patagonian coast. *Journal of Molluscan Studies* 0: 1-6.
- McLean, J. H. 1984. Systematics of *Fissurella* in the Peruvian and Magellanic faunal provinces (Gastropoda: Prosobranchia). *Natural History Museum of Los Angeles County, Contributions in Science*, 354: 1-70.
- Olivares-Paz, A., M. Bretos, R. Chihuailaf y A. Zenis. 1998. Biometría hábitat y epobiontes en *Fissurella latimarginata* (Mollusca: Prosobranchia) from northern Chile. *Estudios Oceanológicos* 17: 95-103.
- Palmer M., G. X. Pons, y M. Linde. 2004. Discriminating between geographical groups of a Mediterranean comercial clam (*Chamelea gallina* (L): Veneridae) by shape analysis. *Fish Research* 67: 93-98.
- Parsons, K. J., B. W. Robinson y T. Hrbek. 2003. Getting into shape: An empirical comparison of traditional truss-based morphometric methods with a newer geometric method applied to New World cichlids. *Environmental Biology of Fishes* 67: 417-431.
- Sheets, D., M. Zelditch y D. Swiswesi. 2006. IMP (Integrated Morphometrics Package): <http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft>. Html.
- Stone, J. R. 1998. Landmark-based thin-plate spline relative warp analysis of gastropod shells. *Systematic Biology* 47(2): 254-263.

- Queiroga, H., R. Costa, N. Leonardo, D. Soares y D. F. R. Cleary. 2011. Morphometric variation in two intertidal littorinid gastropods. *Contributions to Zoology* 80 (3): 201-211.
- Renaud, S., J. Michaux, J. J. Jeager, J. C. Auffray. 1996. Fourier analysis applied to *Stephanomys* (Rodentia: Muridae) molars: nonprogressive evolutionary pattern in a gradual lineage. *Paleobiology* 22: 255–265.
- Reyment, R. A. 1991. *Multidimensional paleobiology*. Pergamon Press, New York. En Adams, D. C., F. J. Rohlf y D. E. Slice. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal of Zoology* 71: 5-16.
- Ríos-Jara, E., C. C. H. Cedillo, E. J. Carrillo e I. E. Padilla. 2004 Variations in density, shell-size and growth with shore height and wave exposure of the rocky intertidal snail, *Calyptraea spirata* (Forbes, 1852), in the tropical Mexican Pacific *Journal of Shellfish Reserch* 23 (2): 545-552.
- Rohlf, F. J., y J. W. Archie. 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitos (Diptera: Culicidae). *Systematic Zoology* 33: 302-317.
- Rohlf, F. J. y D. Slice. 1990. Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39(1): 40-59.
- Rohlf, F. J. 2008. tps Dig2. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>
- Teso, V., J. H. Signorelli y G. Pastorino. 2011. Shell phenotypic variation in the southwestern Atlantic gastropod *Ollivancillaria carcellesi* (Mollusca: Olividae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 91(5): 1089-1094.
- Trussell, G. C. y R. J. Etter. 2001. Integrating genetic and environmental forces that shape the evolution of geographic variation in a marine snail. *Genetica* 112-113: 321-337.
- Vermeij, G. J. 1973. Morphological patterns in high intertidal gastropods: adaptative strategies and their limitations. *Marine Biology* 30: 319-346.

Zelditch, M. L., D. L. Swiderski, H. D. Sheets y W. L. Fink. 2004. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Amsterdam: Elsevier/Academic Press.

CAPÍTULO 2. DIVERSIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA DE *Fissurella virescens* EN EL PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL

INTRODUCCIÓN

La dispersión larval, juega un papel muy importante para facilitar el flujo génico y determinar la estructura de las poblaciones, principalmente en especies de invertebrados marinos (Caley *et al.*, 1996; Palumbi, 2003; Cowen y Spounagle, 2009). La teoría genética de poblaciones sugiere que las especies marinas que presentan largos estadios larvales, alta fecundidad y amplia tolerancia ambiental poseen niveles bajos de diferenciación genética (Hedgecock *et al.*, 2007). Esto se ha demostrado para algunas especies de invertebrados con rangos geográficos amplios y larvas pelágicas de larga duración, como en los gasterópodos *Littorina keenae* de las costa oeste de Estados Unidos de América (Lee y Boulding, 2007) *Rappana venosa* del Mar Amarillo (Yang *et al.*, 2008) y la lapa *Patellea caerulea* del Mar Adriático (Fauvelot *et al.*, 2009). Aunque hay evidencia de que las poblaciones marinas no necesariamente tienen altos niveles de intercambio de individuos (Palumbi, 2003). El ejemplo más extremo se conoce para el estomatópodo *Haptosquilla pulchella* (Barber *et al.*, 2002), que a pesar de tener una larva de larga duración y estar ampliamente distribuida en Indonesia posee altos niveles de diferenciación genética ($\Phi_{st} = 0.87$) entre sus poblaciones. Esto sugiere que la conectividad entre estas poblaciones es determinada por otras causas. De tal forma que la teoría actual sustenta que el flujo génico en las poblaciones marinas, se encuentra influenciado por varios factores tanto físicos como biológicos.

Gawarkiewicz y colaboradores (2007) hacen un recuento de los procesos físicos a los que se ven sometidas las larvas cerca de la costa. Estos incluyen, el intercambio de temperaturas, la retención de las larvas por las mareas internas y por las corrientes circulares o giros (mejor conocidas como Eddys), características del hábitat, como los niveles de salinidad, y el tipo de sustrato, entre otros. Kelly y Palumbi (2010) mencionan que, especies de invertebrados marinos que se distribuyen en las zonas intermareales, como percebes, lapas y cangrejos de playa, tienden a tener valores altos de estructura génica, esto lo atribuyen a las condiciones estresantes del hábitat y a la retención de las larvas. Estos factores actúan como barreras geográficas para la dispersión. Entre los factores biológicos que limitan el movimiento larval, se encuentran la historia de vida de los organismos, la

depredación, las temporadas de desove y principalmente el comportamiento de las larvas (Hohenlohe, 2004; Levin, 2006; Cowen *et al.*, 2007; Pineda *et al.*, 2007). Por ejemplo se ha demostrado que las larvas pueden nadar vertical u horizontalmente, buscando alimento o luz. En el estomatópodo *Hapstotipaquilla pulchella* (Barber *et al.*, 2002) y el bivalvo *Arctica islandica* (Mann y Wolf, 1983) se ha demostrado la presencia de larvas libre nadadoras. Asimismo la historia biogeográfica de las poblaciones también debe considerarse como un elemento relevante. Marko y Hart (2011) proponen que las glaciaciones del Pleistoceno explican los valores altos en estructura ($\Phi_{st}= 0.5$) que presenta las poblaciones de la estrella murciélago (*Patiria miniata*) en el Pacífico noreste.

La lapa *Fissurella virescens* es un molusco marino nativo del Pacífico oriental tropical. Se distribuye desde la Bahía de Mazatlán en México hasta las Islas Galápagos en Ecuador (Keen, 1971). Es un organismo sedentario con un rango muy limitado de movimiento, que habita en la zona rocosa intermareal, formando poblaciones abundantes como ha sido observado en playas de Jalisco y Colima (Ríos-Jara *et al.*, 2001). Normalmente se halla en la zona media o alta del intermareal, donde está más expuesta a la desecación, las temperaturas altas, la depredación y la fuerza del oleaje. *F. virescens* posee una larva pelágica, de la que se desconoce su duración. No obstante la larva de otras especies del género, como la de *F. nigra* (Pérez *et al.*, 2007) duran alrededor de una semana en la columna de agua. Este tiempo es corto, comparado con el de otras especies de invertebrados que pueden tener estadios larvales de más de un mes de duración.

Varias especies de *Fissurella* son extraídas de su hábitat y comercializadas a gran escala para su consumo. En Chile son utilizadas con este fin seis especies, *F. latimarginata*, *F. pulchra*, *F. nigra*, *F. picta*, *F. máxima* y *F. limbata* (Olivares-Paz, 2007). A diferencia de éstas *F. virescens* no es comercializada pero se tiene registro de que se extrae y consume de forma local en las playas de Jalisco, México (Ríos-Jara *et al.*, 2001). No se tiene referencia de que ésta sea colectada con fines de consumo en otras áreas de su zona de distribución. Esta especie es poco conocida por lo que resulta interesante evaluar la diversidad genética que albergan sus poblaciones y como está estructurada.

Los marcadores moleculares de regiones de secuencias simples repetidas (ISSR's por sus siglas en inglés) son útiles para la caracterización molecular y las inferencias genéticas.

Estos amplifican regiones neutrales ubicadas entre microsatelites. Son bastante utilizados por su naturaleza multilocus, alto polimorfismo, sensibilidad y reproducibilidad (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Los ISSR's han sido utilizados con éxito para detectar la diversidad genética de poblaciones de moluscos por ejemplo la almeja *Gemma gemma* (Casu *et al.*, 2005), la lapa *Patella ferruginea* (Casu *et al.*, 2006) la almeja gigante *Tridacna gigas* (Evans y Gerry, 2006), el mejillón *Hyriopsis cumingii* (Li *et al.*, 2009) y la almeja blanca *Paphia undulata* (Donrung *et al.*, 2011) entre otras. El objetivo de este estudio es estimar la diversidad y la diferenciación genética en las poblaciones de *Fissurella virescens* del Pacífico oriental tropical por medio de marcadores moleculares ISSR's.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material estudiado

Un total de 210 individuos vivos de *Fissurella virescens* fueron recolectados en siete poblaciones que habitan playas rocosas en el Pacífico oriental tropical. Estas poblaciones son una de Panamá y seis de México (Cuadro 2.1). La recolecta se hizo al azar, cuando fue posible se eligieron individuos de distintos tamaños, como en Bahía Banderas, Bahía de Chamela y Panamá (Figura A). Las otras poblaciones presentaron tamaños homogéneos, sobre todo Ixtapa. Cada organismo se lavó con agua corriente y se colocó en alcohol al 95% para ser transportado al laboratorio donde se separó el tejido blando y se almacenó en el ultracongelador a -40°C. Para el análisis molecular se eligieron sólo 158 individuos que tuvieron mejor calidad en la extracción de ADN (Cuadro 2.1).

Generación de marcadores moleculares ISSR

Para la extracción de ADN se tomaron entre 0.04g y 0.06g de tejido del pie de cada individuo. El tejido fue molido con nitrógeno líquido en un mortero. El ADN total se extrajo de acuerdo al protocolo de CTAB modificado para moluscos por McCarthur (2008) (Anexo 3). El ADN se cuantificó por medio de espectrofotometría (Sambrook *et al.*, 2001). Para generar los fragmentos ISSR's se evaluaron cinco cebadores y se seleccionaron los tres con la mejor calidad y consistencia de amplificación. Para ello los cebadores se optimizaron utilizando un termociclador de gradientes (ESCO Healthcare, Swift Maxpro)

para seleccionar las condiciones de temperatura y magnesio óptimas para su amplificación (Anexo 3). Los fragmentos de ADN fueron amplificados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La mezcla de reacción se ajustó a cada población a un volumen final de 22µl. En general cada mezcla contenía 80ng de ADN, 9mM de buffer de amplificación, 0.2µM de cebador, 0.45mM de DNTp's, 2.27mM de MgCl₂, 1U a 1.3U de taq Polimerasa (Invitrogen) y agua grado HPLC. La PCR se hizo bajo las siguientes condiciones, 3 minutos a 95°C por un ciclo, seguido de 40 ciclos de 45segundos a 95°C, 45 segundos a la temperatura de alineación específica para cada cebador (47.6, 57.6) (Cuadro 2.2), un minuto y 30 segundos a 72°C y finalmente 10 minutos a 72°C.

Para evaluar la amplificación de los cebadores se prepararon geles de agarosa al 1.5%, se utilizaron 5µl del producto de PCR y 2ul de buffer de carga. La electroforesis se realizó a 95 V por 27 minutos. Se usó bromuro de etidio para teñir los fragmentos y un transiluminador de UV para su visualización. Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis vertical en geles de acrilamida al 6% con Urea 7M y Buffer TBE 1X; la electroforesis se hizo en cámaras dual (CBS Scientific) a 200 volts durante 5 horas. Se agregaron 8 µl del buffer de carga al producto de PCR, de esta mezcla se tomaron un total de 10 µl para la electroforesis. A cada gel se le agregó un marcador molecular de 100 pb para estimar los tamaños de los fragmentos generados. Los geles se revelaron por medio de tinción con nitrato de plata (Sanguinetti *et al.*, 1994). Para su análisis posterior se digitalizaron con un sistema de fotodocumentación digital (Gel Logic 100, Kodak).

Cuadro 2.1. Número de individuos por población utilizados para el análisis de diversidad y diferenciación genética.

| Población | N |
|-----------------------------------|------------|
| Mazatlán ^{1 Sin} | 24 |
| Isla Isabel ^{1 Nay} | 23 |
| Bahía Banderas ^{1 Jal} | 18 |
| Bahía de Chamela ^{1 Jal} | 18 |
| Cuastecomate ^{1 Jal} | 24 |
| Ixtapa ^{1 Gro} | 26 |
| Panamá ² | 25 |
| Total | 158 |

Cuadro 2.2. Cebadores utilizados para la evaluación de diversidad genética de las poblaciones de *Fissurella virescens*.

| Primer | Secuencia | Temperatura de alineación | Bandas polimórficas |
|---------|----------------------|---------------------------|---------------------|
| ISSR7 | (CT) ₈ RG | 47.6°C | 27 |
| ISSR22 | (GA) ₈ YG | 57.0°C | 26 |
| ISSR843 | (CT) ₈ RA | 47.6°C | 23 |

Análisis de datos

Para el registro y evaluación de los fragmentos ISSR se utilizó el programa Phoretix 1D (Total lab) y se cotejaron de manera manual. Dado que los marcadores ISSR son interpretados como dominantes, los datos se registraron en matrices de presencia (1), ausencia (0). Las bandas que alcanzaron el mismo grado de migración o peso molecular se consideraron homólogas.

Diversidad genética

La diversidad genética para cada población de *F. virescens* se calculó con 3 estimadores: 1) la proporción de loci polimórficos (L_p) por medio de la fórmula $P=x/m$, donde x es la cantidad de loci polimórfico y m es el número total de loci. 2) La heterocigocidad esperada (H_e) según Nei (1978), con la corrección de Lynch y Milligan (1994), para ello las frecuencias alélicas son estimadas a partir de las bandas ausentes y asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg. 3) Heterocigocidad bayesiana (H_B) es un estimador de la diversidad genética a partir del análisis Bayesiano y comparable al valor de H de Nei (1972), se calculó con el programa Hickory 1.1 (Holsinger y Lewis, 2007). Tanto H_e como L_p se estimaron con el programa TFPGA versión 1.3 (Miller, 2000).

Diferenciación genética

Para el análisis de diferenciación genética se calcularon tres índices: 1) el estimador de θ de Weir y Cockerman (1984), que es equivalente al índice de Wright (1951) (F_{st}). Se asumió equilibrio Hardy-Weinberg ($F_{IS} = 0$) y se utilizaron 10 000 iteraciones para generar el intervalo del 95% de confianza. 2) El índice de distancia genética de Nei (D) (Nei, 1978) entre las poblaciones. La matriz de distancias genéticas pareadas se utilizó para hacer un

análisis de conglomerados con el método de agrupamiento con media aritmética no ponderada (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA, por sus siglas en inglés). Ambos análisis se corrieron con el programa TFPGA. 3) La θ_B del análisis bayesiano, que es equivalente al F_{st} de Wright o a la de θ Weir y Cockerman (1984) (Holsinger, 2002). Este análisis se hizo con el programa Hickory 1.1 (Holsinger y Lewis, 2007), siguiendo las especificaciones predeterminadas, usando el modelo de f libre. Este modelo escoge al azar los valores de f . Para generar las variables a analizar, el programa utiliza el Método de Montecarlo basado en Cadenas de Markov (MCMC). El método necesita que las cadenas sean convergentes y que los datos sean independientes entre sí para poder generar valores de confianza del 95% (Holsinger, 2002). Para esto las primeras 50,000 iteraciones (burn in) fueron descartadas, de manera que se lograra la convergencia, después los datos se tomaron cada 50 iteraciones para alcanzar la independencia de los datos. En total se efectuaron 250,000 iteraciones, con lo que se obtuvieron 5,000 variables. En adición para determinar si existían diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre pares de poblaciones (valores de $p < 0.5$) se aplicó la prueba de exactitud de Fisher (Raymond y Rousset, 1995). La cual emplea simulaciones Monte Carlo con cadenas de Markov, donde se usaron 10,000 permutaciones. El análisis se hizo con el programa TFPGA 1.3 (Miller, 2000). Además, para determinar la estructura genética de las poblaciones se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), que calcula la Φ_{st} que es equivalente al F_{st} . Los componentes de la varianza fueron probados estadísticamente por medio de iteraciones no paramétricas usando 10, 000 permutaciones. Para las pruebas del 95% de confianza se utilizó un análisis de bootstrap con 10,000 iteraciones.

Por ultimo para evaluar si existe algún tipo de correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de las poblaciones se llevó a cabo un análisis de aislamiento por distancia de Mantel. Este procedimiento prueba por medio de permutaciones la relación entre dos o más matrices (Pires de Campos-Telles y Diniz-Filho, 2005), aplicando la fórmula $Z = \sum A_{ij}B_{ij}$, donde A corresponde a la matriz geográfica y B a la matriz de distancias genéticas de Nei. La matriz de distancia geográfica se obtuvo calculando la distancia lineal entre pares de poblaciones con el programa Google Earth 6.2.2 (Google, 2012). El AMOVA y el análisis de Mantel se hicieron con el programa Arlequín 3.11. (Excoffier y Schneider, 2005).

RESULTADOS

Con los tres cebadores ISSR utilizados se logró la amplificación de un total de 76 fragmentos (Cuadro 2.3), éstos tienen un tamaño de entre 300 pb y 1500 pb. Todos los fragmentos generados por encima o por debajo de estos pesos fueron descartados para el análisis, para tener una mayor certeza y confiabilidad de la amplificación. La técnica molecular de ISSR's fue útil para evaluar la diversidad genética de la especie de estudio.

Diversidad genética

El porcentaje de loci polimórficos para las siete poblaciones analizadas fue del 100%. Este valor osciló entre $Lp= 50$ y 78% en las poblaciones. El valor de la heterocigocidad esperada (Nei 1978) para la especie fue de $He= 0.3176$ y revela una diversidad genética alta. Los valores de la heterocigocidad esperada en las poblaciones variaron desde $He= 0.2000$ hasta $He= 0.3230$, siendo el de la Bahía de Chamela el más bajo y el de Ixtapa el más alto (Cuadro 2.3). El estimador de diversidad bayesiana H_B siguió la misma tendencia que los valores de He aunque fueron ligeramente menores ($H_B= 0.1560 - H_B= 0.2650$). La población de Bahía de Chamela tuvo el valor más bajo ($H_B= 0.1564$), mientras que el valor más alto se presentó en Bahía Banderas ($H_B=0.2657$) (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.3. Índices de diversidad genética para siete poblaciones de *Fissurella virescens* del Pacífico oriental tropical. He = heterocigocidad esperada, Lp = porcentaje de loci polimórficos, H_B = índice de heterocigocidad bayesiano.

| Población | N | % Lp | He | H_B | IC 95% |
|-----------------------------------|-----|--------|--------------|--------|------------------|
| Mazatlán ^{1 Sin} | 24 | 72.37 | 0.2812 | 0.1982 | (0.1759, 0.2225) |
| Isla Isabel ^{1 Nay} | 23 | 67.11 | 0.2788 | 0.2006 | (0.1771, 0.2250) |
| Bahía Banderas ^{1 Jal} | 18 | 78.95 | 0.3229 | 0.2657 | (0.2387, 0.2911) |
| Bahía de Chamela ^{1 Jal} | 18 | 50.00 | 0.2001 | 0.1564 | (0.1380, 0.1759) |
| Cuastecomate ^{1 Jal} | 24 | 57.89 | 0.2305 | 0.1752 | (0.1562, 0.1964) |
| Ixtapa ^{1 Gro} | 26 | 73.68 | 0.3235 | 0.2294 | (0.1974, 0.2621) |
| Panamá ² | 25 | 75.00 | 0.3189 | 0.2370 | (0.2086, 0.2653) |
| Total | 158 | 100.00 | $He= 0.3180$ | | |

Notas: 1= México, 2= Panamá.

Diferenciación genética

La diferenciación genética encontrada en las siete poblaciones de *Fissurella virescens* estudiadas fue alta. El valor de diferenciación fue similar con los estimadores de Weir y Cockerman ($\theta_{st} = 0.2934$), el índice de diferenciación de Wright ($F_{st} = 0.2934$) y la Φ_{st} del AMOVA ($\Phi_{st} = 0.2935$) lo que revela una alta estructura genética entre las poblaciones de esta especie. Esta diferenciación fue confirmada también por el estimador bayesiano, que arrojó un valor un poco menor $\theta_B = 0.2692$ (Cuadro 2.4).

Las distancias genéticas calculadas para las siete poblaciones analizadas (D de Nei 1978), son bajas. La menor distancia se encuentra entre las poblaciones de Cuastecomate y Bahía de Chamela ($D = 0.0743$), mientras que las poblaciones más alejadas entre sí fueron Bahía Banderas e Ixtapa ($D = 0.1452$). El valor de la correlación del análisis de Mantel ($R^2 = 0.1288$) indica que la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica es significativa ($p = 0.0001$) (Cuadro 2.5).

El dendrograma generado a partir del método UPGMA y utilizando la matriz de distancias genéticas de Nei (1978) indica la formación de cuatro grupos a una distancia de 0.135. La población de Bahía Banderas se comporta como el grupo más alejado del resto, aunque se encuentra geográficamente muy cercana a las poblaciones de Isla Isabel y Bahía de Chamela. La población de Ixtapa se comporta también como un grupo independiente con una distancia de corte de $D = 0.12$. El tercer grupo se integra por las poblaciones de Mazatlán y Panamá ubicadas en el extremo más al norte y más al sur de la distribución demográfica de *F. virescens*, respectivamente. El cuarto grupo incluye a las poblaciones de Bahía de Chamela, Cuastecomate e Isla Isabel. Las dos primeras son geográficamente las más cercanas entre sí e Isla Isabel se encuentra a más o menos 300 km de ellas (Figura 2.1).

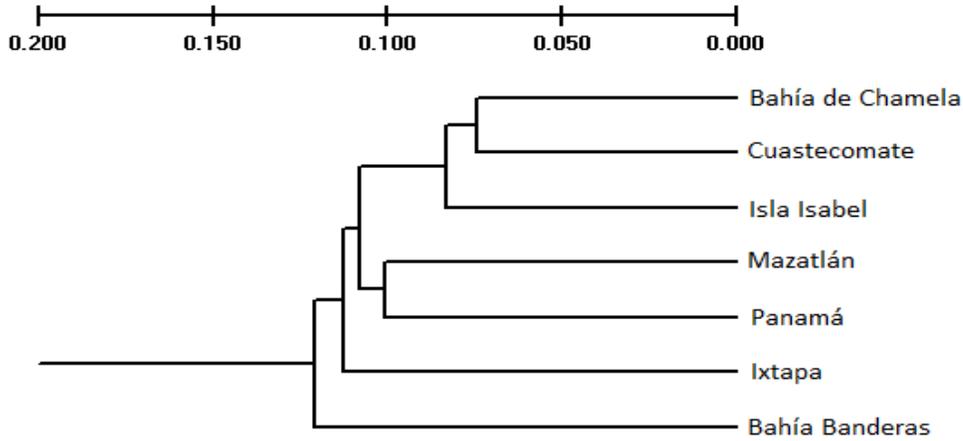


Figura 2.1. Dendrograma generado por medio de UPGMA y distancias genéticas de Nei (1978).

El AMOVA determinó que la mayor diferenciación se encuentra dentro de las poblaciones con un 70.65% de variación. Los valores de diferenciación entre poblaciones también son altos (29.34%). La variación entre las poblaciones y dentro es altamente significativa, con valores de $p < 0.0001$ (Cuadro 2.4). Además, la prueba de exactitud de Fisher (Raymond y Rousset, 1995) mostró diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre pares de poblaciones (Cuadro 2.5) confirmando los resultados obtenidos por el AMOVA. Los valores de F_{st} pareados calculados a partir de la AMOVA, entre poblaciones son altos y presentan diferencias significativas (Cuadro 2.6).

Cuadro 2.4. Valores de diferenciación genética con diferentes estimadores dentro y entre poblaciones de *Fissurella virescens* en el Pacífico oriental tropical. El valor de la AMOVA es altamente significativo con una $p < 0.0001^{**}$.

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | Componentes de varianza | % de variación | Φ_{st} | F_{st} | θ_{st} | θ_B |
|---------------------------|-------------------|-------------------------|----------------|-------------|----------|---------------|------------|
| Entre poblaciones | 554.845 | 3.7120 | 29.344** | 0.2934 | 0.2935 | 0.2935 | 0.2692 |
| Dentro de las poblaciones | 1349.61 | 8.9378 | 70.656** | | | | |
| Total | 1904.456 | 12.6498 | | | | | |

Nota: Φ_{st} =índice de diferenciación genética del AMOVA (Excoffier y Schneider, 2005), F_{st} = índice de diferenciación genética (Wright, 1951), θ_{st} índice de diferenciación de Weir y Cockerman (1984), θ_B = índice de diferenciación bayesiano (Holsinger y Lewis, 2007).

Cuadro 2.5. Matriz de distancia genética de Nei (1978) (debajo) en siete poblaciones de *Fissurella virescens* y matriz de valores de p (arriba) de la prueba de exactitud de Fisher (Raymond y Rousset, 1995).

| | M | II | BB | BC | C | Ix | P |
|------------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Mazatlán (M) | - | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| Isla Isabel (II) | 0.1116 | - | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| Bahía Banderas (BB) | 0.1345 | 0.1137 | - | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| Bahía de Chamela (BC) | 0.1209 | 0.0881 | 0.0987 | - | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| Cuastecomate (C) | 0.0929 | 0.0779 | 0.1127 | 0.0743 | - | <0.0001 | <0.0001 |
| Ixtapa (Ix) | 0.1144 | 0.1051 | 0.1452 | 0.1209 | 0.1103 | - | <0.0001 |
| Panamá (P) | 0.1006 | 0.103 | 0.1211 | 0.1296 | 0.1025 | 0.1132 | - |

Cuadro 2.6. Matriz de los valores de F_{st} pareados (abajo) y la matriz de valores de p correspondientes (arriba), calculados a partir de la AMOVA (Excoffier y Schneider, 2005) para siete poblaciones de *Fissurella virescens* en el Pacífico oriental tropical.

| | M | II | BB | BC | C | Ix | P |
|------------------------------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Mazatlán (M) | | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| Isla Isabel (II) | 0.3147 | | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| Bahía Banderas (BB) | 0.3248 | 0.2807 | | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| Bahía de Chamela (BC) | 0.3319 | 0.2830 | 0.2702 | | <0.0001 | <0.0001 | <0.0001 |
| Cuastecomate (C) | 0.2935 | 0.2509 | 0.3003 | 0.2710 | | <0.0001 | <0.0001 |
| Ixtapa (Ix) | 0.2984 | 0.2753 | 0.3179 | 0.3270 | 0.3044 | | <0.0001 |
| Panamá (P) | 0.2687 | 0.2698 | 0.2742 | 0.3430 | 0.2871 | 0.2740 | |

DISCUSIÓN

En general se asumía a las poblaciones de especies marinas que presentan larvas pelágicas como sistemas abiertos pobremente diferenciados entre sí. Esto debido a la capacidad y facilidad de las larvas para moverse en amplios rangos geográficos, con virtualmente pocas barreras geográficas (Caley *et al.*, 1996; Hellberg *et al.*, 2002; Swearer *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha demostrado que la dispersión larval no necesariamente resulta en especies con poblaciones panmícticas, que el rango de dispersión de las especies puede ser más pequeño de lo que se pensaba y que las dispersiones a larga distancia son eventos más bien raros (Palumbi, 2003, Pineda *et al.*, 2007). Estudios recientes en peces, en organismos demersales y en algunos invertebrados han demostrado que la retención de las larvas y el auto reclutamiento juegan un papel importante en la estructura de las poblaciones (Swearer *et al.*, 2002; Hellberg *et al.*, 2002; Palumbi, 2003). Por ejemplo, en el percebe de las costas del Pacífico noreste, *Balanus glandula* que posee una larva planctónica de larga duración, se encontró que existen diferencias genéticas significativas y estructura genética entre sus poblaciones a lo largo de su distribución (Sotka *et al.*, 2004). Un caso extremo se presenta en el estomatópodo *Haptosquilla pulchella* (Barber *et al.*, 2002) que habita en el este del Indo Pacífico, el cual a pesar de tener una larva de larga duración (entre cuatro y seis semanas) presenta niveles altos de diferenciación genética ($\Phi_{st}= 0.87$). La lapa *Nacella concinna* del Antártico tiene una larva que puede vivir entre uno y dos meses en la columna de agua. Este molusco presenta niveles bajos de diferenciación ($F_{st}= 0.0384$) pese a que existe evidencia de que hay barreras geográficas que evitan el flujo génico con las poblaciones más al sur de su distribución (Hoffman *et al.*, 2010). Estos ejemplos sostienen que la migración es muy poca y no permite mantener un flujo génico constante entre las poblaciones evitando que estas sean homogéneas.

Diversidad genética

Los cebadores ISSR's usados fueron muy útiles para el estudio de la diversidad y diferenciación genética de las poblaciones de *Fissurella virescens* recolectadas en el Pacífico oriental tropical. Como se ha explicado anteriormente estos cebadores son altamente polimórficos, sensibles y reproducibles. Fueron lo suficientemente finos para detectar la diversidad dentro y entre las poblaciones, así como una alta estructura genética.

Por medio de la visualización con poliacrilamida se logró mejor resolución, ya que se observaron 75 bandas polimórficas con tres iniciadores. mientras que en trabajos como el de Casu y colaboradores (2005) en el molusco *Gemma gemma* donde se utiliza agarosa para resolver se obtuvieron menor cantidad de bandas utilizando más iniciadores (67 bandas con cinco iniciadores), al igual que en el trabajo de Evans y Jerry (2006) con el bivalvo *Tridacna gigas* donde obtuvieron 21 bandas con 34 iniciadores.

Los valores de heterocigocidad en *Fissurella virescens* ($He= 0.2001-0.3235$) en general son más altos que lo esperado para los invertebrados marinos (entre $He= 0.122$ y 0.230 según Ward *et al.*, 1992; Hermosilla, 2004; Toro y González 2009). Según Tello-Cetina y colaboradores (2005) los moluscos en general sufren de un déficit alto de heterocigotos. Estos autores, utilizando isoenzimas encontraron un valor bajo de $He= 0.0366$ para las poblaciones de *Strombus gigas* de la Península de Yucatán. Casu y colaboradores (2005) con cebadores ISSR's refieren valores de diversidad moderada ($He = 0.143$ y 0.170) en el bivalvo *Gemma gemma* que se distribuye ampliamente en la costa este de Norteamérica. En estos trabajos se señala que las poblaciones están sometidas a altos flujos génicos y que se encuentran bien mezcladas. Por el contrario los valores observados en *F. virescens* concuerdan con lo descubierto para poblaciones que tienen bajos niveles de flujo génico, donde las larvas viven pocos días como libre nadadoras y tienen altos niveles de retención larval. Por ejemplo Toro y González (2009) mencionan en *Ostrea chilensis*, un bivalvo del sur de Chile, una alta heterocigocidad ($He=0.2846$), al parecer influenciado por la poca dispersión pues la larva solo vive unos minutos o unas horas como libre nadadora, restringiendo así el flujo génico entre las poblaciones. Casu y colaboradores (2006) notaron que la heterocigocidad en la lapa gigante del mediterráneo *Patella ferruginea* es moderada a alta y varía entre $He= 0.162$ y 0.233 y sugieren que existe poca conectividad entre las poblaciones y poca capacidad de dispersión.

Esta falta de flujo génico entre las poblaciones de *F. virescens* puede provocar que exista una acumulación de los cambios génicos que ocurren de forma natural en las poblaciones, aumentando así la diversidad genética. También pueden deberse a adaptaciones de los individuos a diferentes microambientes dentro de las playas. Las playas rocosas como en las que se distribuye *F. virescens*, son de las zonas más estresantes para los organismos, ya

que los expone a la desecación, el embate de las olas y a la depredación. Esto lleva a cambios morfológicos en las especies (Capítulo 1) incluso entre individuos de las mismas poblaciones (Ríos-Jara *et al.*, 2004) y, puede influenciar a que los individuos se adapten a ciertas partes de la playa, aumentando así la acumulación de mutaciones. Es factible además que estos individuos estén sometidos a variaciones espaciales o temporales que aumenten la cantidad de heterocigotos en las poblaciones. Esto se encontró en el bivalvo *Ruditapes decussatus* (Borsa *et al.*, 1991) donde los individuos de una población pertenecían a diferentes cohortes que presentaban distintas frecuencias alélicas entre ellas.

Las poblaciones analizadas son altamente polimórficas, los valores oscilaron entre 50 y 78%. El porcentaje de loci polimórficos fue del 100% lo que implica que ningún genotipo se repite entre los individuos muestreados. Estos valores están por encima de lo calculado para otras especies de moluscos por ejemplo en *Nacella concinna* el valor fue del 85.4% (Aranzamendi *et al.*, 2008), mientras que en el mejillón de agua dulce *Hyriopsis cumingii* el valor de loci polimórficos fue tan solo del 14% (Li *et al.*, 2009). La población con más loci polimórficos fue Bahía Banderas (78%), mientras que el menor fue la población de Bahía de Chamela (50%). El porcentaje alto de polimorfismo se encontró en otras especies con bajo flujo génico como en el bivalvo *Gemma gemma* que presenta valores del 100% (Casu *et al.*, 2005).

Los valores de heterocigosis esperada más altos fueron para Bahía de Banderas ($He=0.3229$) e Ixtapa ($He=0.3235$), calculados con el estimador de heterocigocidad de Nei (Nei, 1978). Es interesante notar que ambas poblaciones se encuentran en zonas turísticas. Los individuos de Ixtapa, Guerrero se localizaban en una playa con alto grado de turismo, eran poco abundantes, más pequeñas en tamaño que el resto y se estaban aisladas en una pequeña extensión de la zona rocosa, sometidas a un oleaje moderado. Cerca de la zona donde fueron colectados hay un estero pequeño. Cuando se hizo la búsqueda de otros individuos de la especie en otras zonas cercanas no se hallaron. Mientras que los individuos de Bahía de Banderas, Jalisco aunque alejada de las playas de la Ciudad de Puerto Vallarta, se encuentra en un lugar turístico y en la playa de Yelapa (donde fueron colectados) existe una desembocadura de un estero, que arrastra sedimento desde la tierra. Los individuos eran mucho más abundantes, comparados con los de la zona de Ixtapa y además estaban en

una zona más amplia de la playa. Sin embargo, el impacto turístico o del estero no parece tener un efecto en la diversidad genética de estas poblaciones.

La población de Isla Isabel presentó valores medios de diversidad. Esta población está dentro de un área marina protegida, donde existe poco impacto humano, no es extraída para consumo local y no existe ningún tipo de descarga de agua de tierra firme. Estos individuos obtuvieron el tamaño promedio más alto y las mayores abundancias. No obstante, la diversidad no es tan alta como se hubiera esperado. Por otro lado, los valores más bajos se encontraron en las poblaciones de Cuastecomate y de Bahía de Chamela. Ambas poblaciones están muy cercanas entre sí; pero los tipos de impacto son diferentes. Mientras que Chamela se ubica en una zona de bajo nivel turístico, las poblaciones de Cuastecomate se localizan en una zona moderada. El sitio de Chamela tiene un estero cercano y la población era tan abundante como la de Bahía de Banderas, por su lado Cuastecomate se halló en una playa rocosa de rocas sueltas y donde el oleaje es de bajo impacto. Es posible que las poblaciones estén sometidas a diferentes tipos de ambientes que moldean la diversidad genética dentro de las poblaciones.

Diferenciación genética

Los valores de diferenciación calculados para las poblaciones de *Fissurella virescens* a partir de cuatro estimadores, F_{st} , Φ_{st} , θ_{st} , y θ_B (Cuadro 2.4), concuerdan con los encontrados en otros invertebrados de zonas intermareales que poseen larvas pelágicas de corta duración (Kelly y Palumbi, 2010). Por ejemplo, en el bivalvo *Macraa veneriformis*, Hou y colaboradores (2006) mostraron que las poblaciones del mar amarillo tienen una estructura alta ($F_{st}= 0.202$), y consideran que los valores se deben a su corto estadio larval. De manera similar para el molusco *Gemma gemma* un bivalvo ovovivíparo que habita las costas del Atlántico americano, se obtuvieron altos valores de diferenciación $\Phi_{st}= 0.390$ (Casu *et al.*, 2005). En contraste en especies de moluscos marinos que presentan largos estadios larvales se encontró que existe una alta conexión entre ellas, y por tanto presentan valores muy bajos de diferenciación aun cuando se utilizan distintos marcadores para hacer la evaluación, por ejemplo en *Strombus gigas* $F_{st}= 0.1039$ (Tello-Cetina *et al.*, 2005), *Littorina keenae* $\Phi_{st} = 0.003$ (Lee y Boulding, 2007), *Rappa venossa* $\theta_{st}= 0.016$ (Yang *et al.*, 2008) y *Lottia gigantea* $F_{st}= 0.012$ (Fenberg *et al.*, 2010). Una duración menor de la

larva en la columna de agua, limita la capacidad de dispersión de los individuos, lo que genera poca conectividad entre las poblaciones, limitando así el flujo génico.

Los valores de F_{st} entre pares de poblaciones, calculados con Arlequin (Excoffier y Schneider, 2005) (Cuadro 2.6) son altamente significativos, lo que confirma que existe una considerable diferencia entre las poblaciones. Una explicación de este fenómeno puede ser la corta duración que la larva planctónica de *F. virescens* tiene como libre nadadora, aunque no se conoce con certeza su duración, para otras especies del género *Fissurella* se ha calculado que las larvas están aproximadamente una semana en la columna de agua (Pérez *et al.*, 2007). El comportamiento de las larvas puede incidir en la diferenciación, de acuerdo con Pineda (2007) éstas son organismos complejos que pueden moverse libremente y no son sólo partículas arrastradas por la corriente. Un ejemplo de esto se da en poblaciones del camarón mantis (*Haptosquilla pulchella*) donde se observó una fuerte estructura genética ($\Phi_{st}=0.87$) a pesar de tener una larva de larga duración; la estructura fue atribuida a diferencias en el comportamiento de las larvas (Barber *et al.*, 2002). Además, otros factores pueden actuar como barreras geográficas, estos incluyen corrientes marinas, corrientes internas en las bahías, cambios en la salinidad y temperatura del agua e incluso la depredación y pueden ser las causantes de la falta de flujo génico (Gawarkiewicz *et al.*, 2007; Pineda, 2007; Cowen y Sponaugle, 2009).

El grado de correlación entre los valores de la distancia genética de Nei y la distancia geográfica, arrojados por el análisis de Mantel, sugiere que hay aislamiento por distancia. Esto refuerza la idea de que las poblaciones de *F. virescens* estudiadas tienen bajos niveles de intercambio de individuos entre sí y que existe algún tipo de barrera que impide la dispersión de las larvas. Sánchez y colaboradores (2011) notaron algo similar para las poblaciones del molusco *Acanthina monodon* del Pacífico sureste. Ellos atribuyen la alta estructura genética y el aislamiento por distancia al bajo potencial de dispersión y a las barreras geográficas, en este caso representadas por las corrientes marinas y el cambio ambiental que se da en la zona por los efectos de las surgencias.

Las relaciones genéticas entre las siete poblaciones analizadas de *Fissurella virescens* en este trabajo, no parecen seguir un patrón geográfico establecido, o tener una correlación con las grandes corrientes marinas. En los grupos que se forman, se entremezclan dos

distintas provincias biogeográficas, la provincia de Cortés y la provincia Panámica. Esto podría indicar que la alta diferenciación no está explicada sólo por el bajo flujo génico o la poca conectividad entre las poblaciones, si no que ésta se puede deber a otras fuerzas evolutivas como el efecto fundador, la deriva génica o incluso la historia natural de la especie (Hedgecock *et al.*, 2007; Marko y Hart, 2011). Un ejemplo de ello son las poblaciones de Panamá y Bahía de Mazatlán que se agrupan en el UPGMA (Figura 2.1) a pesar de que se encuentran muy alejadas geográficamente entre sí (aproximadamente 2000 km) y la probabilidad de que exista un flujo entre ellas es baja. Según Palumbi (2003) la estimación de la dispersión de una larva pelágica está entre 25 y 150 km. Es probable que el tamaño de las poblaciones o incluso el tiempo evolutivo no hayan sido suficientes para poder diferenciar por completo entre éstas y se asocian debido al acervo genético ancestral de la especie. Sin embargo, no hay que perder de vista que las diferencias entre éstas son altamente significativos, indicando la acción de diferentes fuerzas evolutivas y procesos que han logrado moldear a las poblaciones.

Por otra parte, las distancias genéticas calculadas a partir de Nei (1978) agrupan a las poblaciones de Isla Isabel, Bahía de Chamela y Cuastecomate. Esta relación podría ser explicada por cierto flujo génico entre estas poblaciones, a partir del transporte de larvas favorecido por el movimiento de las masas de agua proveniente del Sur, movida por la Corriente de Costa Rica. La falta o disminución del flujo génico con Bahía Banderas puede deberse a las mareas internas de la bahía descritas por Plata y Filonov (2007) que impiden el movimiento de las larvas hacia adentro o fuera de ésta, se ha demostrado que las corrientes dentro de las bahías (eg. Bahía de Monterrey en California) pueden retener hasta al 80% de las partículas (Lippard *et al.*, 2006).

Por otro lado, la población de Ixtapa, al igual que Bahía Banderas, se diferencia genéticamente del resto de las poblaciones. En general, esto puede deberse a una fuerte retención de las larvas dentro de la bahía, a la distancia geográfica de ésta con las otras poblaciones estudiadas y a la poca duración del estadio larval. Es conveniente recordar que las larvas se ven sometidas a las fuerzas físicas de las corrientes, así como a los distintos estratos de la columna de agua, las temperaturas cambiantes, las fuerzas de fricción contra la costa, la fuerza de las mareas, el viento y la flotabilidad, entre otras (Gawarkiewiks *et al.*,

2007; Cowen y Spounagle, 2009) que pueden actuar como barreras para la dispersión, limitando así el flujo génico entre las poblaciones. Quizá, esta población no se encuentra en las condiciones ambientales óptimas para su establecimiento, ya que se encontró en un lugar muy específico de la bahía, contaba con pocos individuos y muchos eran de tamaños más pequeños que el promedio encontrado en otras poblaciones, lo que nos puede indicar que no está bien desarrollada o que es una población relictual.

Según Hedgecock y colaboradores (2007), el valor de F_{st} debe tomarse con cautela al analizar la diferenciación de las poblaciones, sobre todo si se explica solo a partir del flujo génico histórico con métodos indirectos. No se puede estar realmente seguro de que las poblaciones hayan alcanzado el equilibrio, o de que las divergencias sean tan recientes que no han tenido aún un efecto sobre éstas.

Es recomendable hacer un estudio que permita medir el intercambio genético reciente en términos de flujo génico, tiempo de divergencia y distancia geográfica en *F. virescens* lo que permitiría explicar con mayor claridad la diferenciación. Por ejemplo los métodos de asignación, como el bayesiano son muy utilizados en poblaciones con diferenciación alta para explicar con mayor confianza la estructura genética de las poblaciones (Manel *et al.*, 2005; Hedgecock *et al.*, 2007; Marko y Hart, 2011). El método de asignación bayesiana permite medir el flujo génico reciente y detectar patrones en las poblaciones cuando se utilizan con marcadores polimórficos (Manel *et al.*, 2005), este método no asume que las poblaciones se encuentran en equilibrio y hace una predicción de la procedencia de los ancestros (Pritchard *et al.*, 2000). Hay que recordar que las diferencias en las poblaciones no pueden ser sólo explicadas en base al flujo génico, sino que deben de tomarse en cuenta las fuerzas evolutivas como la deriva génica, la mutación y su interacción en el tiempo (Marko y Hart, 2011).

En conclusión, las poblaciones de *Fissurella virescens* presentan alta diversidad y diferenciación genética. La explicación parece ser la poca duración de la larva, la distancia geográfica y las barreras generadas por las corrientes de la zona. Es probable que esta especie este siendo sometida a un evento de deriva génica que eventualmente separará más a las poblaciones.

LITERATURA CITADA

- Barber, P. H., S. R. Palumbi, M. V. Erdmann y M. K. Moosa. 2002. Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopoda) indicate limits to larval transport: patterns, causes, and consequences. *Molecular Ecology* 11: 659-674.
- Beumont, A., M. Truebano-García, S. Höng y P. Low. 2006. Genetics of Scottish populations of the native oyster, *Ostrea edulis*: gene flow, human intervention and conservation. *Aquatic Living Resources* 19: 389-402.
- Borsa, P., M. Zainuri y B. Dalay. 1991. Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. *Heredity* 66: 1-8.
- Caley, M. J., M. H. Carr, M. A. Hixon, T. P. Hughes, G. P. Jones, B. A. Menge. 1996. Recruitment and the local dynamics of open marine populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 27: 477-500.
- Casu, M., D. Casu, T. Lai, P. Cossu y M. Curini-Galletti. 2006. Inter-simple sequence repeat markers reveal strong genetic differentiation among populations of the endangered mollusc *Patella ferruginea* (Gastropoda: Patellidae) from two Sardinian marine protected areas. *Marine Biology* 149: 1163-1174.
- Casu, M., F. Maltagliati, P. Cossu, T. Lai, M. Curini-Galletti, A. Castelli y J. A. Commito. 2005. Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from Maine and Virginia (USA), as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 325: 46-54.
- Cowen, R. K., G. Gawarkiewicz, J. Pineda, S. R. Thorrold y F. E. Werner. 2007. Population connectivity in marine systems. *Oceanography* 20: 14-21.
- Cowen, R. K. y S. Sponaugle. 2009. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science* 1: 443-466.
- Donrung, P., S. Tunkijjanukij, P. Jarayabhand, y S. Poompuang. 2011. Spatial genetic structure of the surf clam *Paphia undulata* in Thailand waters. *Zoological Studies* 50(2): 211-219.

- Evans, B. S. y D. R. Jerry. 2006. Population genetic structure of giant clams, *Tridacna gigas* (Family Tridacnidae), on the Great Barrier Reef. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 1(3): 235-243.
- Excoffier, L., G. Laval, y S. Schneider. 2005. Arlequin V. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Fauvelot, C., F. Bertozzi, F. Constantini, L. Airoidi y M. Abbiati. 2009. Lower genetic diversity in the limpet *Patella caerulea* on urban coastal structures compared to natural rocky habitats. *Marine Biology* 156: 2313-2323.
- Fenberg, P. B., M. E. Hellberg, L. Mullen y K. Roy. 2010. Genetic diversity and population structure of the size selectively harvested owl limpet, *Lottia gigantea*. *Marine Ecology* 31: 574-583.
- Gawarkiewicz, G., S. Monismith, J. Largier. 2007. Observing larval transport processes affecting population connectivity: Progress and challenges. *Oceanography* 20: 40-53.
- Google. 2012. Google Earth 7.0. Google Inc.
- Hedgecock, D., P. H. Barber y S. Edmands. 2007. Genetic approaches to measuring connectivity. *Oceanography*, 20 (3): 70-79.
- Hellberg, M. E., R. S. Burton, J. E. Neigel y S. R. Palumbi. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of marine science* 70(1) suppl: 273-290.
- Hermosilla, C. A. Variación morfológica y genética entre poblaciones del pulpo de Chiloé *Enteroctopus megalocyatus* (Cephalopoda, Octopoda) en el sur de Chile y Argentina. Tesis de Biología Marina, Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile, Valdivia 96 pp.
- Hoffman, J. I., L. S. Peck, G. Hillyard, A. Zieritz, M. S. Clark. 2010. No evidence for genetic differentiation between Antarctic limpet *Nacella concinna* morphotypes. *Marine Biology* 157: 765-778.

- Hohenlohe, P. A. 2004. Limits to gene flow in marine animals with planktonic larvae: models of *Littorina* species around Point Conception, California. *Biological Journal of the Linnean Society* 82: 169-187.
- Holsinger, K. E., P. O. Lewis y D. K. Dey. 2002. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Molecular Ecology* 11: 1157-1164.
- Holsinger, K. E. y P. Lewis. 2007. HICKORY: a package for analysis of population genetic data V1.1 Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs, Connecticut, USA.
- Hou, L., H. Lu, X. Zou, X. Bi, D. Yan y C. He. 2006. Genetic characterizations of *Macra veneriformis* (Bivalve) along the Chinese coast using ISSR-PCR markers. *Aquaculture* 261: 865-871.
- Keen, A. M. 1971. Seashells of Tropical West America. Marine mollusks from Baja California to Peru. Stanford Univ. Press, Stanford. 1065p.
- Kelly, R. P. y S. R. Palumbi. 2010. Genetic structure among 50 species of the Northeastern Pacific rocky intertidal community. *PLoS ONE* 5(1): e8594.
- Lee, H. J. y E. G. Boulding. 2007. Mitochondrial DNA variation in space and time in the northeastern Pacific gastropod, *Littorina keenae*. *Molecular Ecology* 16: 3084-3103.
- Levin L. A. 2011. Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and digressions. *Integrative comparative biology*. 46 (3):282-297.
- Li, J. L., G. L. Wang y Z. Y. Bai. 2009. Genetic diversity of freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) in populations from the five largest lakes in China revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR). *Aquaculture International* 17: 323-330.
- Lipphardt, B., D. Small, A. Kirwan, S. Wiggins, K. Ide, C. Grosch y J. Paduan. 2006. Synoptic Lagrangian maps: Applications to surface transport in Monterey Bay. *Journal of Marine Research* 64: 221-247.

- Lynch, M. y B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Manel, S., O. E. Gaggioti y R. S. Waples. 2005. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 136-142.
- Mann, R. y C. Wolf. 1983. Swimming behaviour of larvae of the ocean quahog *Arctica islandica* in response to pressure and temperature. *Marine Ecology Progress Series* 13: 211-218.
- Marko, P. B. y M. W. Hart. 2011. The complex analytical landscape of gene flow inference. *Trends in Ecology and Evolution* 26(9): 448-456.
- McArthur, G. A. 2008. Mollusk DNA extraction CTAB. Consultado en noviembre del 2010. <http://mcarthurlab.blogspot.mx/2008/03/mollusc-dna-extraction-ctab.html>.
- Miller, M. P. 2000. Tools for population genetic analysis (TFPGA). V 1.3. Northern Arizona University, Arizona, USA.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 238-292.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Olivares-Paz, A. N. 2007. Sistemática molecular del género *Fissurella* en el Pacífico sudoriental. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, España.
- Palumbi, S. R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, 13(1): 146-158.
- Pérez, M. C., M. L. González y D. A. López. 2007. Breeding cycle and early development of the keyhole limpet *Fissurella nigra* Lesson, 1831. *Journal of Shellfish Research* 26 (2): 315-318.
- Pineda J., H. A. Hare, y S. Spounagle. 2007. Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography* 20: 22-39.

- Pires de Campos Telles M. y J. A. F. Diniz-Filho. 2005. Multiple Mantel tests and isolation-by-distance, taking into account long-term historical divergence. *Genetics and Molecular Research* 4: 742-748.
- Pritchard, J.K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of populations structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Raymond, M. L., y F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Ríos-Jara, E., C. C. H. Cedillo, E. J. Carrillo e I. Enciso-Padilla. 2004 Variations in density, shell-size and growth with shore height and wave exposure of the rocky intertidal snail, *Calyptrea spirata* (Forbes, 1852), in the tropical Mexican Pacific *Journal of Shellfish Reserch* 23 (2): 545-552.
- Ríos-Jara, E., M. Pérez-Peña, E. Juárez-Carrillo, E. López-Uriarte, L. Enciso-Padilla y E. G. Robles-Jarero. 2002. Moluscos macrobénticos del intermareal y plataforma continental de Jalisco y Colima. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No.S110. México, D.F.
- Saavedra, C., C. Zapata, A. Guerra y G. Álvarez. 1993. Allozyme variation in european populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology* 115: 85-95.
- Sambrook, J., D. Russelly W. David. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez, R., R. D. Sepúlveda, A. Brante y L. Cárdenas. 2011. Spatial pattern of genetic and morphological diversity in the direct developer *Acanthina monodon* (Gastropoda: Mollusca). *Marine Ecology Progress Series* 434: 121-131.
- Sanguineti , C, F. Diaz-Neto y A. J. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on acylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-918.

- Tello-Cetina, J. A., L. A. Rodríguez-Gil y F. Rodríguez-Romero. 2005. Genética poblacional del caracol rosado *Strombus gigas* en la Península de Yucatán: Implicaciones para su manejo y pesquería. *Ciencias Marinas* 31(2): 379-386.
- Toro, J. E. y C. P. González. 2009. La estructura genética de la ostra chilena (*Ostrea chilensis* Philippi, 1845) en poblaciones naturales del sur de Chile, basada en análisis con marcadores RAPDs. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44(2): 467-476.
- Trussell, G. C. y R. J. Etter. 2001. Integrating genetic and environmental forces that shape the evolution of geographic variation in a marine snail. *Genetica* 112-113: 321-337.
- Ward, R. D., D. O. F. Skibinski y M. Woodwork. 1992. Protein heterozygosity. Protein structure and taxonomic differentiation. *Evolutionary Biology* 26: 73-159.
- Weir, S. y C. Cockerman. 1984. Estimating F- Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Yang, J., Q. Li, L. Kong, X. Zheng, R. Wang. 2008. Genetic structure of the veined rapa whelk (*Rapana venosa*) populations along the coast of China. *Biochemical Genetics* 46: 539-548.
- Yeh, F., R. C. Yang y J. T. Boyle. 1999. Popgene V1.31. Microsoft Windows- based freeware for population genetics analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Edmonton, Canada.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalsky y D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by inter-simple sequence repeat (ISSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

CAPÍTULO 3. ESTRUCTURA GÉNÉTICA DE POBLACIONES DE *Fissurella virescens* EN EL PACÍFICO ORIENTAL TROPICAL

INTRODUCCIÓN

La lapa *Fissurella virescens* es un gasterópodo que habita en las playas rocosas del Pacífico oriental tropical. Se distribuye desde Mazatlán en México hasta las Islas Galápagos en Ecuador (Keen, 1971). Es un molusco herbívoro que tiene un rango de movimiento muy limitado dentro de su hábitat y no se dispersa como adulto. Posee una larva libre nadadora, de la que no se conoce su duración. Se ha calculado que para *F. nigra* la larva dura alrededor de una semana en la columna de agua (Pérez *et al.*, 2007), este tiempo es muy limitado en comparación con otros invertebrados que pueden tener estadios larvales de hasta un mes de duración.

Los estudios de diversidad genética nos permiten conocer la variación presente en una población y como se encuentra distribuida. Esta información ayuda a dilucidar cuales son los mecanismos que actúan en el flujo génico de las poblaciones, lo que nos permitirá entender los procesos evolutivos a los que están sometidas las especies y evaluar los patrones en términos de diversidad (Kelly y Palumbi, 2010). En organismos marinos se ha supuesto que la diversidad genética está sujeta a la capacidad del organismo para desplazarse, al tiempo de desarrollo larval y a las barreras biogeográficas (Palumbi, 2003; Cowen y Spoungle, 2009; Kelly y Palumbi, 2010). Estas características afectan la permanencia de los individuos dentro de las poblaciones y el intercambio de genes, lo que influye en los procesos evolutivos de las poblaciones. Estudios sobre diversidad genética han sido desarrollado para moluscos como los bivalvos *Paphia undulata* (Donrung *et al.*, 2011), *Ostrea chilensis* (Toro y González, 2009), *Ostrea edulis* (Beumont *et al.*, 2006) entre otras, la mayoría de importancia comercial. En estos trabajos se han encontrado distintos niveles de diversidad, desde altos, como en el caso de la lapa gigante del mediterráneo *Patella ferruginea* que presenta valores de heterocigocidad que varían entre $He = 0.162$ y 0.233 (Casu *et al.*, 2006) o valores bajos, como los que se presentan en las poblaciones de *Rappana venosa* del Mar Amarillo que varían entre $He = 0.86$ - 0.149 (Yang *et al.*, 2008), o los que se presentan en las poblaciones de *Strombus gigas* (actualmente *Lobatus gigas*) de la Península de Yucatán ($He = 0.0366$) (Tello-Cetina *et al.*, 2005). En el

caso de *F. virescens* es relevante generar este tipo de estudios para entender estos procesos sobre todo en una especie que no está explotada comercialmente lo que sugiere que sus poblaciones aún se encuentran en estado natural, en el estado de Jalisco en México está especie es recolectada con fines de consumo local y no representan una pesquería en la zona (Ríos-Jara *et al.*, 2002), no se sabe si es consumida o aprovechada en otras zonas de su distribución.

En el capítulo anterior (Capítulo 2) se evidenció por medio de iniciadores ISSR, que la lapa *F. virescens* presentó un valor de diferenciación de $F_{st}= 0.2935$ para las siete poblaciones estudiadas en el Pacífico oriental tropical. Estos valores fueron calculados con diferentes estimadores, como la F_{st} de Wright (1951), la θ_{st} de Weir y Cokerman (1984), la Φ_{st} calculado a partir de la AMOVA (Excofier y Schneider, 2005), y la θ_B del análisis Bayesiano. Los valores presentados fueron muy estables, con excepción de la θ_B que tuvo un valor ligeramente más bajo ($\theta_B = 0.2692$). El valor de diferenciación concuerda con lo encontrado en invertebrados marinos que se dispersan por medio de larvas de poca duración, como *Mactra verenriiformis* que tiene un $F_{st}= 0.202$ (Hou *et al.*, 2006) o el bivalvo *Gemma gemma* que tiene un valor de diferenciación de $\Phi_{st}= 0.390$ (Casu *et al.*, 2005). Estas especies muestran una estructura alta, por lo que se estima que la conectividad es limitada por su capacidad de dispersión.

Para *F. virescens* existe una correlación entre la distancia genética de Nei (1978) y la distancia geográfica calculada a partir de la prueba de Mantel. Sin embargo, cuando las poblaciones se agrupan por medio del UPGMA, no se reconoce un patrón, ya que los grupos se encuentran formados por poblaciones de diferentes provincias biogeográficas, que no concuerdan con la distancia geográfica, lo que no permite establecer con claridad los límites de las barreras geográficas y de la conectividad. No se reconoce si estas agrupaciones son causadas por un flujo génico reciente o por algún evento pasado. Por ejemplo Marko y Hart (2011) proponen que son las glaciaciones del Pleistoceno las causantes de que la estrella marina *Patiria miniata* del Pacífico noreste, presente una alta estructura ($\Phi_{st}= 0.5$) y no la falta de flujo génico reciente.

El conocer la estructura de las poblaciones puede ser útil cuando se intenta contestar preguntas relacionadas con la detección de barreras genéticas, clasificación de subespecies,

estudios evolutivos y conectividad de las poblaciones. (Liu y Zhao, 2006). Una forma de estudiar esto, es determinando cuantas poblaciones genéticas reales existen (Coulon *et al.*, 2006).

Los métodos bayesianos han sido utilizados con éxito para contestar estas preguntas (Evanno *et al.*, 2005). Para ello existen distintas estrategias para inferir la estructura genética de las poblaciones, el método más utilizado es el de Pritchard y colaboradores (2000) que nos permite identificar la presencia de diferentes subpoblaciones, si es que existen, y además estima la procedencia de los ancestros (Falush *et al.*, 2003). Este método estima las frecuencias alélicas en cada población y asigna probabilísticamente a los individuos en las diferentes poblaciones utilizando datos genotípicos (Pritchard *et al.*, 2000; Hubisz *et al.*, 2009). Para esto se consideran tres tipos de Modelos de ancestría, 1) Modelo de ancestría sin flujo génico (No-admixture-model) que asume que los individuos provienen de una sola población, 2) Modelo de ancestría con flujo génico (Admixture-model) que asume que el genoma de un individuo puede provenir de diferentes subpoblaciones (Pritchard *et al.*, 2000) y 3) Modelo de conexión (Linkage model) el cual es una extensión del modelo de ancestría con flujo génico, pero a diferencia del anterior asume que existe una correlación entre los marcadores utilizados (Falush *et al.*, 2003).

El análisis consiste en estimar el número de subpoblaciones o clusters (k), utilizando simulaciones de Monte Carlo con Cadenas de Markov (MCMC). El modelo prevé que las poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg y en equilibrio ligado por lo que asume que las frecuencias alélicas pueden estar o no correlacionadas (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003). Sin embargo Evanno y colaboradores (2005) mencionan que el valor calculado de k a veces no es el adecuado, por lo que sugieren el uso del valor Δk que puede ser mejor para detectar la k verdadera. El valor Δk es calculado a partir de la magnitud del cambio de las probabilidades en k sucesivas generadas a partir de los valores del programa Structure (Pritchard *et al.*, 2000).

Los métodos bayesianos permiten detectar patrones de poblaciones cuando la conectividad es baja, lo que sugiere que las poblaciones están altamente diferenciadas. Estos son más potentes cuando se utilizan con marcadores altamente polimórficos, como los ISSR's

(Manel *et al.*, 2005 y Hedgecock *et al.*, 2007) y cuando los valores de F_{st} son mayores a 0.1 (Cornuet *et al.*, 1999; Hedgecock *et al.*, 2007).

El objetivo de este trabajo, es detectar de forma más fina la estructura de siete poblaciones de *F. virescens* del Pacífico oriental tropical y los subgrupos que puedan existir dentro de éstas, utilizando métodos de asignación Bayesianos. Esto nos permitirá reconocer poblaciones prioritarias para la conservación y el aprovechamiento de esta especie. Para esto se utilizaron los modelos de estructura de Pritchard y colaboradores (2000) y Evanno y colaboradores (2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de muestras

Se recolectaron 210 individuos de *F. virescens* de siete poblaciones en el Pacífico oriental tropical. Se eligieron seis playas rocosas de México y una de Panamá (Figura A). Estas colectas se hicieron al azar y sólo en tres de las poblaciones se eligieron organismos de diferentes tamaños por su disponibilidad (Bahía Banderas, Bahía de Chamela y Panamá), el resto de las poblaciones presentaban individuos con tamaños homogéneos. Cada organismo colectado se lavó con agua corriente y se colocó en alcohol al 95% para ser transportados al laboratorio y procesados. De estos 210 individuos se eligieron aquellos que tuvieron mejor calidad en la extracción de ADN (Cuadro 3.1)

Extracción y cuantificación de ADN

Se tomaron entre 0.04 y 0.06 g de tejido del pie de cada individuo para llevar a cabo la extracción de ADN. El tejido fue molido con nitrógeno líquido en un mortero. El ADN total se extrajo utilizando el protocolo de CTAB modificado para moluscos por McCarthur (2008) (Anexo 3). El ADN se cuantificó por medio de espectrofotometría (Sambrook *et al.*, 2001).

Generación de marcadores moleculares ISSR

La generación de fragmentos ISSR's se llevó a cabo con tres iniciadores primer I ((CT)₈RG), primer II ((GA)₈YG) y primer III ((CT)₈RA). Los fragmentos de ADN se

amplificados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La mezcla de reacción se ajustó a cada población para lograr una adecuada amplificación y a un volumen final de 22µl. En general cada mezcla contenía 80ng de ADN, 9mM de buffer de amplificación, 0.2µM de cebador, 0.45mM de DNTp's, 2.27mM de MgCl₂, 1U a 1.3U de taq Polimerasa (Invitrogen) y agua grado HPLC. La PCR se hizo bajo las siguientes condiciones, 3 minutos a 95°C por un ciclo, seguido de 40 ciclos de 45segundos a 95°C, 45segundos a la temperatura de alineación específica para cada cebador (47.6, 57.6), un minuto y 30 segundos a 72°C y finalmente 10 minutos a 72°C.

La evaluación de la amplificación de los cebadores se efectuó por medio de geles de agarosa al 1.5% y se utilizaron 5µl del producto de la PCR y 2µl de buffer de carga. La electroforesis se realizó a 95 V por 27 minutos, se usó bromuro de etidio para teñir los fragmentos y un transiluminador de UV para su visualización. Después los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis vertical en geles de acrilamida al 6% con Urea 7M y Buffer TBE 1X; la electroforesis se hizo en cámaras dual (CBS Científica) a 200 volts durante 5 horas. Se agregaron 8 µl del buffer de carga al producto de PCR, de esta mezcla se tomaron un total de 10 µl para la electroforesis. A cada gel se le agregó un marcador molecular de 100 pb para estimar los tamaños de los fragmentos generados. Los geles se revelaron por medio de tinción con nitrato de plata (Sanguinetti *et al.*, 1994). Para su análisis posterior se digitalizaron con un sistema de fotodocumentación digital (Gel Logic 100, Kodak).

Cuadro 3.1. Cebadores utilizados para la evaluación de diversidad genética de las poblaciones de *Fissurella virescens*.

| Primer | Secuencia | Temperatura de alineación | Bandas polimórficas |
|---------|----------------------|---------------------------|---------------------|
| ISSR7 | (CT) ₈ RG | 47.6°C | 27 |
| ISSR22 | (GA) ₈ YG | 57.0°C | 26 |
| ISSR843 | (CT) ₈ RA | 47.6°C | 23 |

Análisis de datos

Se realizó el análisis de agrupamiento Bayesiano que se apoya en el MCMC. Este análisis se hizo con el programa Structure 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000), se usó el modelo de ancestría

sin flujo para determinar el número de poblaciones reales o grupos de poblaciones (k), el valor se calculó desde una $k=1$ hasta una $k=7$, utilizando un “burn in” de 5×10^4 y un número de iteraciones de 2.5×10^5 . El análisis se repitió diez veces para cada valor de k . El programa Structure genera un gráfico que representa a las poblaciones, donde cada columna es un individuo, las columnas aparecen fragmentadas cuando el individuo comparte ancestría con otras poblaciones. Posteriormente se calculó el valor de Δk a partir de la media de los datos y de los valores de la desviación standard de las probabilidades calculadas (Evanno *et al.*, 2005) utilizando el programa Structure Harvester (Earl y vonHoldt, 2012), cuya contribución es identificar el número de grupos genéticos de la muestra total en estudio. Este se condujo en la plataforma <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>.

RESULTADOS

El análisis se hizo utilizando siete poblaciones del Pacífico oriental tropical, de las cuales se utilizaron en total 158 individuos. Se logró la amplificación de 76 bandas con un tamaño de entre 300pb y 1500pb. Los tres iniciadores utilizados, permitieron evaluar satisfactoriamente la estructura génica de estas poblaciones. Primer I ((CT)₈RG) con 27 bandas polimórficas, primer II ((GA)₈YG) con 26 bandas polimórficas y primer III ((CT)₈RA) con 23 bandas polimórficas.

El análisis de asignación bayesiano, clasificó a todos los individuos en sus poblaciones correspondientes, evidenciando una alta estructura dentro de las siete poblaciones estudiadas para el Pacífico oriental tropical (Figura 3.1). Las proporciones de ancestría compartida son muy bajas, los valores permaneces por debajo del 0.1 entre pares de poblaciones (Cuadro 3.2). La población de Isla Isabel comparte la mayor ancestría con Bahía Banderas ($q=0.097$). Isla Isabel también comparte ancestría con Bahía de Chamela ($q= 0.015$) y con Cuastecomate ($q= 0.027$), aunque los valores son muy bajos. Las poblaciones de Bahía Banderas, Bahía de Chamela e Ixtapa agruparon individuos exclusivamente de su localidad ($q= 1$), comportándose como una población única.

Los valores de la probabilidad de Δk aumentaron de forma constante desde $k= 1$ hasta $k= 7$, pero no alcanzaron la asíntota (Figura 3.2). El valor más alto para Δk fue $k= 3$, sugiriendo que existen tres grupos de poblaciones reales en el análisis (Figura 3.2 y 3.3). Los grupos

identificados, son los formados por 1) las poblaciones de Isla Isabel, Bahía Banderas, Bahía de Chamela y Cuastecomate, 2) Mazatlán y Panamá e 3) Ixtapa que no se encuentra asociada con ninguna otra población (Figura 3.3, Cuadro 3.3). Mientras que los valores tuvieron un ligero aumento en $k=6$, por lo que se reconoce que existe una subestructura en las poblaciones analizadas.

Cuadro 3.2. Matriz del análisis de asignación Bayesiana calculada con el programa Structure (Pritchard *et al.*, 2000). Se muestran los coeficientes de ancestría vertical compartidos entre pares de poblaciones.

| Población | M | II | BB | BC | C | Ix | P |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Mazatlán (M) | 0.997 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.004 |
| Isla Isabel (II) | 0.000 | 0.861 | 0.000 | 0.000 | 0.013 | 0.000 | 0.002 |
| Bahía Banderas (BB) | 0.000 | 0.097 | 1.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Bahía de Chamela (BC) | 0.000 | 0.015 | 0.000 | 1.000 | 0.025 | 0.000 | 0.001 |
| Cuastecomate (C) | 0.001 | 0.027 | 0.000 | 0.000 | 0.962 | 0.000 | 0.001 |
| Ixtapa (Ix) | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 1.000 | 0.001 |
| Panamá (P) | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.990 |

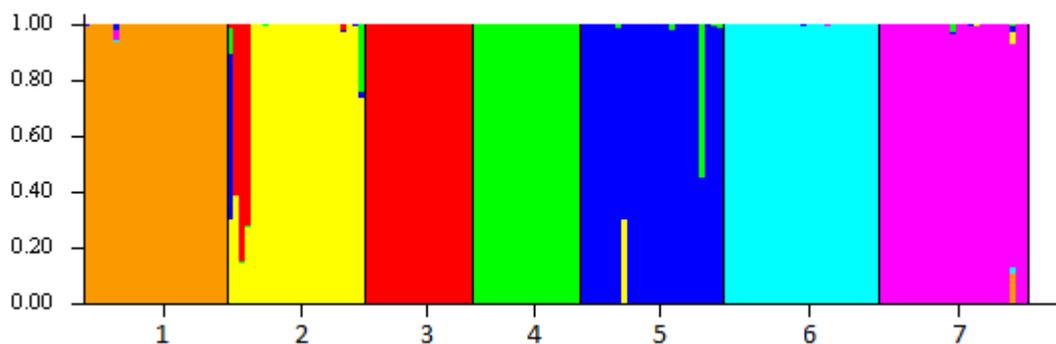
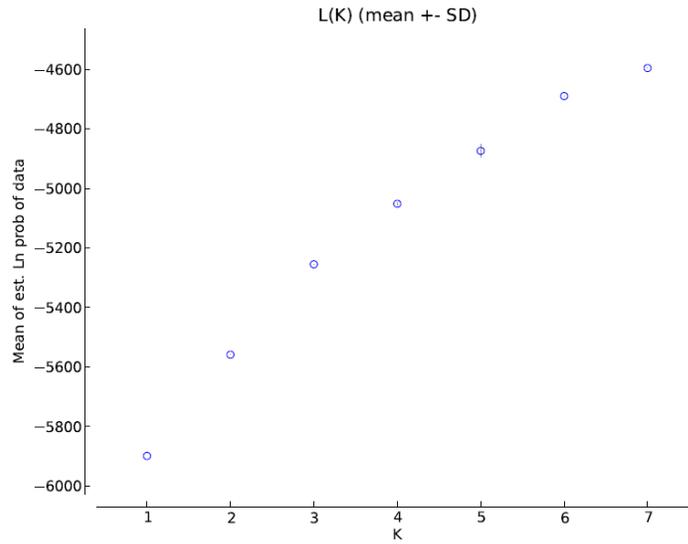


Figura 3.1. Análisis de asignación Bayesiana calculado con el programa Structure (Pritchard *et al.*, 2000). Se presenta el coeficiente de ancestría calculado (q) agrupado por población ($k=7$). Cada individuo se representa con una línea vertical, 1) Mazatlán, 2) Isla Isabel, 3) Bahía Banderas, 4) Bahía de Chamela, 5) Cuastecomate 6) Ixtapa y 7) Panamá.

a)



b)

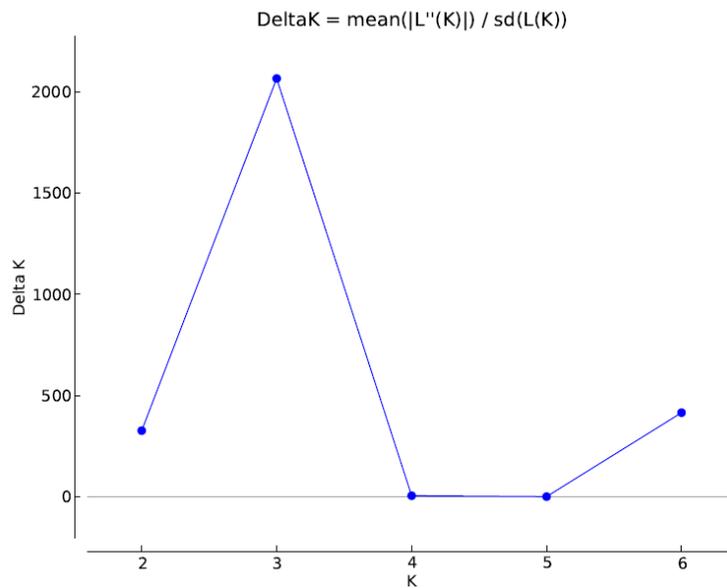


Figura 3.2. Agrupamiento de las poblaciones, en el que se sugieren tres grupos génicos de las poblaciones de *Fissurella virescens*. a) Probabilidades de las poblaciones y su desviación estándar calculado con el programa Structure (Pritchard *et al.*, 2000). b) Valores de Δk generados con el método de Evano y colaboradores (2005) con el programa Structure Harvester (Earl y VonHoldt, 2011).

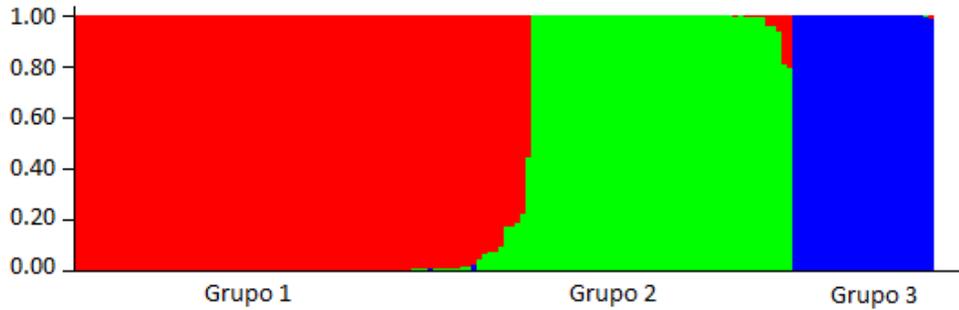


Figura 3.3. Análisis de asignación Bayesiana calculado con Structure (Pritchard *et al.*, 2000) para las poblaciones de *Fissurella virescens*. Se presentan tres grupos formados a partir del análisis de Evanno (k=3). Grupo 1) Isla Isabel, Bahía Banderas, Bahía de Chamela y Cuastecomate. Grupo 2) Mazatlán y Panamá. Grupo 3) Ixtapa.

Cuadro 3.3. Matriz de asignación bayesiano para los tres grupos formados con el análisis de Evanno para siete poblaciones de *F. virescens* del Pacífico oriental tropical. Se presenta el coeficiente de ancestría calculado con Structure-Harvester

| Población | Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 3 |
|-------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Mazatlán | 0.002 | 0.998 | 0.000 |
| Isla Isabel | 0.99 | 0.008 | 0.001 |
| Bahía Banderas | 0.999 | 0.001 | 0.000 |
| Bahía de Chamela | 1.000 | 0.000 | 0.000 |
| Cuastecomate | 0.957 | 0.043 | 0.000 |
| Ixtapa | 0.000 | 0.000 | 1.000 |
| Panamá | 0.042 | 0.958 | 0.000 |

DISCUSIÓN

Se cree que las poblaciones de animales marinos en general poseen una conectividad alta. Lo anterior se supone, por la falta de barreras geográficas, la movilidad alta de sus individuos, principalmente de las larvas, y del uso de corrientes marinas como corredores biológicos (Tello, 2005; Lee y Boulding, 2007; Fenberg *et al.*, 2010). Aunque, se ha demostrado que algunas poblaciones de invertebrados, sobre todo aquellas que poseen movilidad baja, tienden a poseer poblaciones bien estructuradas lo que implica que tengan conectividad baja entre ellas (Hoffman *et al.*, 2011).

El análisis de agrupamiento bayesiano confirmó lo encontrado en el capítulo 2 de esta tesis, las poblaciones están bien diferenciadas y existe bajo flujo génico entre ellas. Los valores de ancestría muestran muy poco intercambio reciente entre las poblaciones. Esto concuerda con lo observado para poblaciones que se encuentran en el intermareal y que poseen larvas de poca duración, ya que las especies marinas sésiles o sedentarias como las lapas, dependen de la fase larval para su dispersión (Becker, 2007; Cowen *et al.*, 2007; Cowen y Sponaugle, 2009; Levin, 2011). Se calcula que las fissurellas poseen una larva pelágica que no dura más de una semana (Pérez *et al.*, 2007), limitando la conexión entre las poblaciones. Se ha calculado que la distancia de dispersión para los invertebrados marinos y algunos peces es de entre 25 y 150 km cuando presentan estadíos larvales de más de cuatro semanas (Palumbi, 2003).

El análisis de asignación no muestra un claro patrón de agrupamiento en términos geográficos. Sin embargo, confirma los resultados de la diferenciación y los del análisis UPGMA realizado con las distancias genéticas de Nei (1978) (Capítulo 2). Los tres grupos formados por el análisis, indican que la falta de flujo génico no es el único factor que contribuye a la alta diferenciación y estructura de las poblaciones, es probable que estas poblaciones se hayan visto envueltas en un fuerte evento de deriva génica, debido al aislamiento por distancia.

Las poblaciones de Isla Isabel, Bahía Banderas, Bahía de Chamela, y Cuastecomate forman el primer grupo generado por el análisis bayesiano. Existe un nivel de ancestría compartido entre estas poblaciones, (Figura 3.1), aunque es mínima. Los individuos de Isla Isabel son los que presentan los niveles de ancestría un poco más altos, sobre todo con la población de

Bahía Banderas (0.97) lo que sugiere que existió un intercambio con Bahía Banderas donde en algún momento los individuos de esta población se movieron hacia la Isla Isabel. Esto podría deberse a la cercanía de las poblaciones y de las corrientes que actúan en la zona, como la corriente nororiental Ecuatorial, que proviene del sur, trayendo aguas cálidas (Galicia-Pérez *et al.*, 2006) las que pudieran provocar que las larvas sean arrastradas por la corriente y llevadas hacia la isla. En la matriz de asignación (Cuadro 3.3) se observa que no existen ancestría reciente entre las poblaciones de Bahía de Chamela y de Bahía Banderas con otras de este grupo, esto podría deberse a un reclutamiento de los especímenes dentro de la bahía y que no parecen haber migrado fuera de ésta, por lo menos no recientemente. Esto es común en organismos que no poseen una larva pelágica, o que están sometidas a fuertes mareas internas. Según Gawarkiewiks y colaboradores (2007) las bahías se ven sometidas a fuertes oleajes internos que pueden actuar como barreras geográficas. Asimismo se sabe que la corriente de Ecuador y la corriente Costanera de Costa Rica corren paralelas a la costa (Kessler, 2006; Pineda *et al.*, 2007) y a las bocas de Bahía de Chamela y Bahía Banderas. Esto significa que las larvas podrían encontrar inconvenientes para ser transportadas hacia el centro de las bahías, pues el mismo oleaje interno de éstas podría estar actuando como barreras para la dispersión. Esto se ha demostrado para la Bahía de Monterrey en California, donde hasta el 80% de las partículas son retenidas por las mareas internas (Lipphardt *et al.*, 2006)

El segundo grupo está formado por las poblaciones que se encuentran en los extremos de la distribución estudiada de la especie, Mazatlán al norte y Panamá al sur. Cuando observamos la matriz de asignación (Cuadro 3.3) se aprecia que la ancestría que comparten es mínima. Esto puede sugerir que la estructura de estas poblaciones no ha cambiado mucho o que tuvieron algún tipo de intercambio genético en el pasado, los valores de diferenciación nos sugieren que otras fuerzas evolutivas como la deriva génica o el tamaño poblacional actúan sobre estas poblaciones. También es probable que las poblaciones presenten genotipos parecidos lo que provoca que sus frecuencias haplotípicas sean similares generando así un agrupamiento. El aislamiento por distancia encontrado en estas poblaciones (Capítulo 2), la poca duración del estadio larval y los fuertes valores de diferenciación ($F_{st}= 0.2935$) explican que no es la existencia de un flujo génico el causante de esta agrupación (Cowen y Spounagle, 2007; Marko y Hart, 2011).

El tercer grupo está formado únicamente por la población de Ixtapa, Guerrero. Ésta parece estar aislada del resto de las poblaciones y no comparte ancestría con ninguno de los grupos, lo que también concuerda con el estudio previo (Capítulo 2) que refieren una fuerte diferenciación. La alta estructura de esta población está influenciada por las bajas tasas de flujo génico que parecen existir en *F. virescens*. Además es posible que esta población también este sometida a las mareas internas de la bahía de Ixtapa. A su vez es bueno recordar que esta población se encontraba integrada por pocos individuos, y se encontraron de forma aislada en una pequeña playa rocosa de la bahía.

La poca conectividad entre las poblaciones y la fuerte estructura parece estar estrechamente relacionada con dos factores principalmente, la poca duración de la larva en la columna de agua y la distancia entre las poblaciones, lo que limita fuertemente el intercambio génico (Palumbi, 2003; Gawarkiewiks, *et al.*, 2007). Las corrientes marinas como la Corriente Ecuatorial, la Corriente Costanera de Costa Rica y la Corriente del Golfo de California parecen actuar como barreras geográficas sobre todo hacia el centro de las bahías. Esto limita la movilidad de las larvas y la conectividad de las poblaciones (Cowen y Spounagle, 2009).

Existen pocos estudios que evidencien como los factores oceanográficos limitan la estructura genética de las poblaciones (Zhan *et al.*, 2009), por eso es importante integrar la ecología del paisaje con los estudios genéticos para así traer luz a cuales son los factores que realmente limitan o favorecen la dispersión. En conclusión las poblaciones de *F. virescens* en el Pacífico oriental tropical exhiben una fuerte estructura poblacional, con poco flujo génico reciente y un fuerte aislamiento entre las poblaciones, sobre todo aquellas que se encuentran en bahías cerradas, como Bahía de Banderas o Bahía de Chamela.

LITERATURA CITADA

- Becker, B.K., L.A. Levin, F.J. Fodrie y P.A. McMillan. 2007. Complex larval connectivity patterns among marine invertebrate populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(9): 3267-3272.
- Casu, M., F. Maltagliati, P. Cossu, T. Lai, M. Curini-Galletti, A. Castelli y J. A. Commito. 2005. Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from Maine and Virginia (USA), as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 325: 46-54.
- Cornuet, J.M., S. Piry, G. Luikart, A. Estoup y M. Solignac. 1999. New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics* 153: 1989-2000.
- Coulon, A., G. Guillot, J.F. Cosson, J.M.A. Angibault, S. Aulagnier, B. Cargnelutti M. Galan y J.M. Hewison. 2006. Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Molecular Ecology* 15: 1669-1679.
- Cowen, R. K., G. Gawarkiewicz, J. Pineda, S. R. Thorrold y F. E. Werner. 2007. Population connectivity in marine systems. *Oceanography* 20: 14-21.
- Cowen, R. K. y S. Sponaugle. 2009. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science* 1: 443-466.
- Earl, D.A., B.M. vonHoldt. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2): 359-361.
- Evanno, G., S. Regnaut y J. Gpudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Excoffier, L., G. Laval, y S. Schneider. 2005. Arlequin V. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.

- Falush, D., M. Stephens y J.K. Pritchard. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587.
- Fenberg, P. B., M. E. Hellberg, L. Mullen y K. Roy. 2010. Genetic diversity and population structure of the size selectively harvested owl limpet, *Lottia gigantea*. *Marine Ecology* 31: 574-583.
- Galicia-Pérez, M. A., J. H. Gaviño-Rodríguez, E. Torres-Orozco y M. Sánchez-Barajas. 2006. Condiciones hidrológicas y de circulación en el litoral de Colima durante el año 2002. En: M. del C. Jiménez-Quiroz y E. Espino-Barr (ed.). 2006. Los recursos pesqueros y acuícolas de Jalisco, Colima y Michoacán. SAGARPA 622p.
- Gawarkiewicz, G., S. Monismith, J. Largier. 2007. Observing larval transport processes affecting population connectivity: Progress and challenges. *Oceanography* 20: 40-53.
- Hedgecock, D., P. H. Barber y S. Edmands. 2007. Genetic approaches to measuring connectivity. *Oceanography* 20 (3): 70-79.
- Hoffman, J. I., L. S. Peck, G. Hillyard, A. Zieritz, M. S. Clark. 2010. No evidence for genetic differentiation between Antarctic limpet *Nacella concinna* morphotypes. *Marine Biology* 157: 765-778.
- Hou, L., H. Lu, X. Zou, X. Bi, D. Yan y C. He. 2006. Genetic characterizations of *Macra veneriformis* (Bivalve) along the Chinese coast using ISSR-PCR markers. *Aquaculture* 261: 865-871.
- Hubisz, M.J., D. Falush, M. Stephens y J.K. Pritchard. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322–1332.
- Keen, A. M. 1971. Seashells of Tropical West America. Marine mollusks from Baja California to Peru. Stanford Univ. Press, Stanford. 1065p.
- Kessler, W. S. 2006. The circulation of the eastern tropical Pacific: A review. *Progress in Oceanography* 69: 181-217.

- Lee, H. J. y E. G. Boulding. 2007. Mitochondrial DNA variation in space and time in the northeastern Pacific gastropod, *Littorina keenae*. *Molecular Ecology* 16: 3084-3103.
- Levin L. A. 2011. Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and digressions. *Integrative comparative biology* 46(3):282-297.
- Lipphardt, B., D. Small, A. Kirwan, S. Wiggins, K. Ide, C. Grosch y J. Paduan. 2006. Synoptic Lagrangian maps: Applications to surface transport in Monterey Bay. *Journal of Marine Research* 64: 221-247.
- Liu, N. y H. Zhao. 2006. A non-parametric approach to population structure inference using multilocus genotypes. *Human Genomics* 2(6): 353-364.
- Manel, S., O. E. Gaggioti y R. S. Waples. 2005. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 136-142.
- Marko, P. B. y M. W. Hart. 2011. The complex analytical landscape of gene flow inference. *Trends in Ecology and Evolution* 26(9): 448-456.
- McArthur, G. A. 2008. Mollusk DNA extraction CTAB. Accesado en noviembre 2010. <http://mcarthurlab.blogspot.mx/2008/03/mollusc-dna-extraction-ctab.html>.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Palumbi, S. R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* 13(1): 146-158.
- Pérez, M. C., M. L. González y D. A. López. 2007. Breeding cycle and early development of the keyhole limpet *Fissurella nigra* Lesson, 1831. *Journal of Shellfish Research* 26 (2): 315-318.
- Pineda J., H. A. Hare, y S. Spounagle. 2007. Larval transport and dispersal in the coastal ocean and consequences for population connectivity. *Oceanography* 20: 22-39.

- Pritchard, J.K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of populations structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Ríos-Jara, E., M. Pérez-Peña, E. Juárez-Carrillo, E. López-Uriarte, L. Enciso-Padilla y E. G. Robles-Jarero. 2002. Moluscos macrobénticos del intermareal y plataforma continental de Jalisco y Colima. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No.S110. México, D.F.
- Sambrook, J., D. Russelly W. David. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanguineti , C, F. Diaz-Neto y A. J. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on acylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-918.
- Tello-Cetina, J. A., L. A. Rodríguez-Gil y F. Rodríguez-Romero. 2005. Genética poblacional del caracol rosado *Strombus gigas* en la Península de Yucatán: Implicaciones para su manejo y pesquería. *Ciencias Marinas* 31(2): 379-386.
- Weir, S. y C. Cockerman. 1984. Estimating F- Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Zhan, A., J. Hu, X Hu, Z. Zhou, M. Hui, S. Wang, W. Peng, M. Wang y Z. Bao. 2009. Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): do local marine currents drive geographical differentiation?. *Marine Biotechnology* 11: 223-235.

DISCUSIÓN GENERAL

Las lapas del género *Fissurella* son especies comunes en las zonas rocosas intermareales del Pacífico americano (Serra *et al.*, 2001; Ríos-Jara *et al.*, 2002). La especie *F. virescens* es un molusco que aunque pequeño en comparación con otros moluscos de importancia comercial; es utilizado para consumo de forma local en Jalisco y Colima (Ríos-Jara *et al.*, 2002). El género *Fissurella* en Chile es muy apreciado y se consume en grandes escalas (Serra *et al.*, 2001; Olivarez-Paz, 2007). Esto es poco probable para *F. virescens*, pues aunque es muy abundante en las playas de Jalisco, parece que su abundancia se reduce hacia el sur, siendo poco conocida en el estado de Guerrero y es escasa o ausente en las playas rocosas de la región de Huatulco, Oaxaca a pesar de que su costa posee una gran cantidad de playas rocosas donde se esperaría la presencia de la especie.

La concha de las lapas es cónica. Los factores ambientales como la desecación, la exposición al oleaje, la temperatura e incluso la disponibilidad del alimento suelen ser los causantes de las principales diferencias en la morfología de las conchas de los moluscos (Vermeij, 2002; Ríos-Jara *et al.*, 2004; Teso *et al.*, 2011). Sin embargo sabemos que la mayoría de las lapas se desarrollan en playas rocosas, las cuales son sitios de gran estrés físico (Denny, 2000; Serra *et al.*, 2001; Olivares-Paz, 2007), lo que hace suponer que esta forma evolucionó para adaptarse a las fuerzas hidrodinámicas de estas playas, como la corriente y la fuerza del oleaje, al mismo tiempo que permitía obtener un área mayor para la adhesión al sustrato rocoso y también disminuir la desecación y el sobrecalentamiento (Denny, 2000; Khouw, 2006). Esto es el caso para la lapa *F. virescens*, aunque las colectas se hicieron en playas con poca exposición al oleaje y en el mismo nivel del intermareal para reducir este efecto, aun así parece ser que la acción hidrodinámica es muy fuerte, porque evolutivamente es el factor que más influye a la forma de las lapas en general (Denny, 2000).

El análisis de morfometría se basó en tres métodos distintos que pueden ser complementarios. Las diferencias en la forma de la concha de *F. virescens* y los valores de las diferencias significativas fueron altos. Estas diferencias se observan claramente en el ancho del organismo, que parece ser el que mayor influencia tiene y parece ser fundamental para diferenciar a las poblaciones. Estas diferencias en el anchos de la concha pueden estar

relacionados con la altura que éstas alcanzan, y la posición del intermareal en la que se encuentran (Rolán-Alvarez *et al.*, 2004; Khouw, 2006). Los organismos tienden a ensancharse y a ser más altos, en áreas con acción de las olas, entre mayor superficie de la apertura y de sujeción por el pie del organismo, menor posibilidad de ser desalojado por las corrientes y los depredadores carnívoros que se alimentan de moluscos (Hobday, 1995; Denny, 2000; Khouw, 2006).

Por mucho tiempo se especuló que las poblaciones marinas eran abiertas, pero se ha demostrado que no en todos los casos es así (Cowen y Sponaugle, 2009). En los últimos años diferentes estudios han revelado que existe un gran número de formas de dispersión y afectaciones a la conectividad de las poblaciones, haciendo de estas grupos bien estructurados (Palumbi, 2003; Cowen y Sponaugle, 2009). Las distancias de dispersión se han calculado hasta de 1000 km. No obstante la mayoría de las especies se dispersan solo cientos de kilómetros y otras especies mucho menos (Kinlan y Gaines, 2003).

La *Fissurella* presentan una larva pelágica de poca duración (McLean, 1984). Aunque no existen trabajos sobre la larva de *F. virescens*, estudios en otras especies de *Fissurella* como *F. barbadensis* (Lewis, 1960); *F. maxima* (Bretos *et al.*, 1983) y *F. nigra* (Pérez *et al.*, 2007) han demostrado que sus larvas son de poca duración (de entre tres días a una semana aproximadamente). Los valores de diversidad y de diferenciación de las poblaciones de *F. virescens* son altos lo que hace pensar que la dispersión entre estas poblaciones son eventos raros lo que explica la poca conectividad y la alta estructuración que existe en estas poblaciones o que simplemente los organismos no pueden establecerse o no pueden crecer y reproducirse (Palumbi, 2003). Regularmente los valores de F_{st} para poblaciones marinas es alrededor de <0.05 (Palumbi, 2003; Hedgecock *et al.*, 2007) lo que se explica por una alta conectividad de las poblaciones y larvas pelágicas de larga duración. El valor de F_{st} para *F. virescens* (0.2935) es común para poblaciones con poca conectividad, que poseen larvas pelágicas de corta duración, que están sometidas a autoreclutamiento y a barreras geográficas que limitan a las poblaciones.

Cuando comparamos los valores genéticos y la morfometría, observamos un fuerte patrón de diferenciación entre las poblaciones. Aunque la naturaleza de las diferencias parece ser distinto. Mientras que para los moluscos las diferencias genéticas está determinada

principalmente por la poca conexión que parece existir entre las poblaciones y las historia biogeográfica de la especie; los valores de la morfometría están caracterizados por la influencia de los factores físicos a los que se ve sometida la concha.

Cuanto del valor de la morfometría está influenciado por la genética es difícil saberlo con la información disponible. Las playas rocosas están sujetas a un gradiente geográfico y vertical muy marcado, lo que puede provocar que existan diferentes estratos dentro de un mismo sitio con sus propios microhabitats con condiciones propias que puedan moldear las diferencias entre las lapas. Es recomendable que se realicen estudios para determinar el valor de la diversidad de los genes que codifican para la forma de la concha, así mismo determinar cuáles factores físicos son los que mayor influencia tiene en la variación de la forma de la concha.

Las poblaciones de *F. virescens* están muy aisladas entre sí, comparten poca ancestría y tienen una conectividad muy limitada, parecida a la que presentan los individuos sin larvas pelágicas como es el caso de los moluscos *Acanthina spirata*, *Nucella emarginata* y *N. ostrina* que presentan altos valores de diferenciación y estructura para las poblaciones de la costa oeste de Estados Unidos (Kelly y Palumbi, 2010). Como todos los moluscos de intermareal, los individuos de *F. virescens* están amenazados por el desarrollo turístico. Las poblaciones del centro del país son un buen grupo para la conservación sobre todo la población que se encuentra en el parque nacional Isla Isabel. Ixtapa y Bahía Banderas merecen una mención aparte, pues su fuerte aislamiento y sus fuertes niveles de heterocigocidad los hacen buenos candidatos para estudio, ya que ambos se encuentran en zonas turísticas de fuerte afluencia y crecimiento. Por su parte, la población de Bahía de Chamela presentó bajo nivel de heterocigotos y una nula conectividad con otras poblaciones. Lo que la hace vulnerable ante cambios en el hábitat.

CONCLUSIONES GENERALES

La información obtenida durante el presente estudio, así como los resultados de los análisis realizados indican que existen diferencias significativas en la forma de la concha entre las siete poblaciones de *F. virescens* estudiadas en el Pacífico oriental tropical.

Las conchas de estos organismos presentan diferencias significativas fuertes. Las principales diferencias se encuentran en el ancho y en la relación largo/ancho (L/An). El ancho de la concha esta normalmente determinado por la superficie de sujeción del pie del organismo al sustrato rocoso de las playas, lo cual es importante en áreas donde la exposición al oleaje es mayor.

Factores ambientales como la exposición al oleaje, la depredación, el tipo de sustrato y la desecación son los causantes de la diversidad fenotípica. Sin embargo estos factores pueden estar influenciando las playas de manera similar, siendo la posición del individuo en el intermareal el que mayor influye a las diferencias. Esto puede explicar por qué ninguno de los métodos logró discriminar de forma efectiva los stocks entre las poblaciones.

Las poblaciones de *F. virescens* son diversas genéticamente y poseen una estructura genética alta, debido a la falta de conectividad entre las poblaciones. Estos niveles son los esperados en poblaciones con larvas pelágicas de corta duración en la columna de agua y con poca conectividad. Los resultados del presente estudio indican que entre estas poblaciones existe aislamiento por distancia.

A partir del análisis de estructura de Evanno se concluye que las poblaciones de *F. virescens* estudiadas constituyen tres grupos génicos diferentes. Uno formado por las poblaciones del centro (Isla Isabel, Bahía Banderas, Bahía de Chamela y Cuastecomate), que están conectadas gracias a las corrientes cálidas del sur. La segunda formada por las poblaciones de los extremos, Panamá y Mazatlán, las cuales presentan niveles bajos de ancestría lo que supone que estas poblaciones debieron estar conectadas en algún momento y el tiempo de divergencia no ha sido el suficiente para diferenciarlas del todo. El tercer grupo formado por la población de Ixtapa, la cual no comparte ancestría con ningún otro grupo, haciéndola un stock génico único.

Las poblaciones de las bahías parecen estar sometidas a una fuerte marea interna que impide el intercambio de larvas, lo que genera un autoreclutamiento en las poblaciones. Esto se evidencia sobre todo en las poblaciones de Bahía de Chamela, Bahía Banderas e Ixtapa.

Las corrientes costaneras parecen haber sido utilizadas como corredores biológicos por las larvas de manera reciente, lo que explicaría la ancestría entre las poblaciones del centro, sin embargo esta es muy baja, lo que confirma una alta estructura génica entre las poblaciones.

El análisis de asignación Bayesiano confirmó que las poblaciones de *F. virescens* del Pacífico oriental tropical carecen de una conectividad fuerte lo que ha generado poblaciones bien estructuradas y diferenciadas entre sí.

LITERATURA CITADA

- Bretos, M. y R. H. Chihuailaf. 1990. Biometría y otros aspectos biológicos de *Fissurella pulchra* (Mollusca: Prosonbranchia). *Revista de Biología Marina, Valparaíso* 25(1): 1-14.
- Cowen, R. K. y S. Sponaugle. 2009. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science* 1: 443-466.
- Denny, M. W. 2000. Limits to optimization: Fluid dynamics, adhesive strength and the evolution of shape in limpet shells. *Journal of Experimental Biology* 203: 2603-2622.
- Hobday, A. 1995. Body-size variation exhibited by an intertidal limpet: Influence of wave exposure, tidal height and migratory behavior. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 189: 29-45.
- Kelly, R.P. y S.R. Palumbi. 2010. Genetic Structure Among 50 Species of the Northeastern Pacific Rocky Intertidal Community 5(1): e8594.
- Khouw, A. S. 2006. Shell shape variation of tropical limpet *Cellana testudinaria* (Class: Gastropoda, Family: Patellidae) Living on the Rocky Shore in Relation to Their Zonal Distribution. *ILMU KELAUTAN* 11(3): 171-180.
- Kinlan, B.P. y S.D. Gaines. 2003. Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: A community perspective. *Ecology* 84(8): 2007-2020.
- Lewis, J. B. 1960. The fauna of rocky shores of Barbados, West Indies. *Canadian Journal of Zoology* 38: 391-435.
- McLean, J. H. 1984. Systematics of *Fissurella* in the Peruvian and Magellanic faunal provinces (Gastropoda: Prosobranchia). *Natural History Museum of Los Angeles County, Contributions in Science*, 354: 1-70.
- Olivares-Paz, A. N. 2007. Sistemática molecular del género *Fissurella* en el Pacífico sudoriental. Tesis de doctorado. Universidad de Santiago de Compostela, España.

- Palumbi, S. R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications* 13(1): 146-158.
- Pérez, M. C., M. L. González y D. A. López. 2007. Breeding cycle and early development of the keyhole limpet *Fissurella nigra* Lesson, 1831. *Journal of Shellfish Research* 26 (2): 315-318.
- Ríos-Jara, E., M. Pérez-Peña, E. Juárez-Carrillo, E. López-Uriarte, L. Enciso-Padilla y E. G. Robles-Jarero. 2002. Moluscos macrobénticos del intermareal y plataforma continental de Jalisco y Colima. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No.S110. México, D.F.
- Ríos-Jara, E., C. C. H. Cedillo, E. J. Carrillo e I. E. Padilla. 2004 Variations in density, shell-size and growth with shore height and wave exposure of the rocky intertidal snail, *Calyptraea spirata* (Forbes, 1852), in the tropical Mexican Pacific *Journal of Shellfish Reserch* 23 (2): 545-552.
- Rolán-Alvarez, E., M. Carballo, J. Galindo, P. Morán, B. Fernández, A. Caballero, R. Cruz, E. G. Boulding, K. Johannesson. 2004. Nonallopatric and parallel origin of local reproductive barriers between two snail morphotypes. *Molecular Ecology* 13: 3415–3424.
- Serra, G., J.C. Castilla y G. Chelazzi. 2001. Temporal and spatial activity of the key-hole limpet *Fissurella crassa* (Mollusca: Gastropoda) in the eastern Pacific, *Journal of Marine Biology Association UK* 81: 485-490.
- Teso, V., J. H. Signorelli y G. Pastorino. 2011. Shell phenotypic variation in the southwestern Atlantic gastropod *Olivancillaria carcellesi* (Mollusca: Olividae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 91(5): 1089-1094.
- Vermeij, G. J. 1973. Morphological patterns in high intertidal gastropods: adaptative strategies and their limitations. *Marine Biology* 30: 319-346.

Anexo 1. Estadística básica de la morfometría tradicional de las conchas. Donde S.D. es desviación estándar. Cf coeficiente de variación.

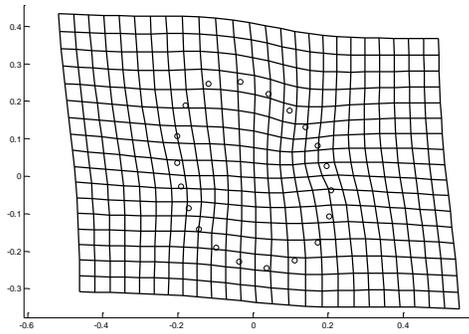
| Mazatlán | Media | S.D. | Máximo | Mínimo | Cf |
|-------------------------|-------|-------|--------|--------|------|
| Ancho | 22.87 | 8.46 | 35.74 | 6.96 | 0.37 |
| Alto | 9.58 | 3.81 | 14.90 | 1.91 | 0.40 |
| Largo | 30.55 | 10.33 | 44.74 | 9.86 | 0.34 |
| L/An | 1.36 | 0.08 | 1.54 | 1.21 | 0.06 |
| Largo foramen | 5.71 | 2.02 | 8.70 | 1.90 | 0.35 |
| Ancho foramen | 3.19 | 1.18 | 5.20 | 1.04 | 0.37 |
| Lf/Anf | 1.81 | 0.22 | 2.37 | 1.38 | 0.12 |
| Foramen-Frente | 15.67 | 5.87 | 23.59 | 3.07 | 0.37 |
| Foramen-Ancho | 13.56 | 5.32 | 21.18 | 2.62 | 0.39 |
| Número de crenulaciones | 42.70 | 14.59 | 58.00 | 19.00 | 0.34 |
| Ancho crenulaciones | 9.87 | 4.28 | 17.01 | 3.84 | 0.43 |
| No. de bandas | | | 11.00 | | |
| Peso bicho y concha | 4.29 | 3.62 | 12.03 | 0.04 | 0.85 |
| Peso bicho | 1.57 | 1.51 | 4.75 | 0.56 | 0.96 |
| Peso concha | 2.71 | 2.15 | 7.28 | 0.04 | 0.79 |
| Isla Isabel | Media | S.D. | Máximo | Mínimo | Cf |
| Ancho | 29.11 | 6.20 | 41.18 | 17.45 | 0.21 |
| Alto | 13.84 | 3.11 | 20.78 | 7.27 | 0.22 |
| Largo | 38.29 | 7.81 | 51.23 | 24.95 | 0.20 |
| L/An | 1.32 | 0.05 | 1.44 | 1.20 | 0.04 |
| Largo foramen | 7.80 | 2.18 | 18.45 | 4.22 | 0.28 |
| Ancho foramen | 4.77 | 1.08 | 6.79 | 2.57 | 0.23 |
| Lf/Anf | 1.64 | 0.29 | 3.18 | 1.28 | 0.17 |
| Foramen-Frente | 20.28 | 4.83 | 29.48 | 11.18 | 0.24 |
| Foramen-Ancho | 19.23 | 4.12 | 27.00 | 10.51 | 0.21 |
| Número de crenulaciones | 42.00 | 12.37 | 58.00 | 34.00 | 0.29 |
| Ancho crenulaciones | 9.51 | 3.79 | 23.48 | 4.54 | 0.40 |
| No. de bandas | | | 13.00 | | |
| Peso bicho y concha | 8.97 | 3.54 | 14.48 | 1.03 | 0.39 |
| Peso bicho | 2.89 | 1.39 | 5.42 | 0.73 | 0.48 |
| Peso concha | 6.07 | 2.68 | 11.45 | 1.09 | 0.44 |
| Bahía Banderas | Media | S.D. | Máximo | Mínimo | Cf |
| Ancho | 24.65 | 7.68 | 35.05 | 9.48 | 0.31 |
| Alto | 11.10 | 3.90 | 17.45 | 3.22 | 0.35 |
| Largo | 33.78 | 9.61 | 48.03 | 14.81 | 0.28 |
| L/An | 1.39 | 0.09 | 1.71 | 1.26 | 0.07 |
| Largo foramen | 6.95 | 2.02 | 10.30 | 2.45 | 0.29 |
| Bahía Banderas | Media | S.D. | Máximo | Mínimo | Cf |

| | | | | | |
|-------------------------|--------------|-------------|---------------|---------------|-----------|
| Ancho foramen | 3.90 | 1.14 | 6.50 | 1.06 | 0.29 |
| Lf/Anf | 1.81 | 0.34 | 3.16 | 1.35 | 0.19 |
| Foramen-Frente | 16.90 | 5.43 | 24.91 | 6.96 | 0.32 |
| Foramen-Ancho | 15.72 | 5.51 | 24.30 | 5.21 | 0.35 |
| Número de crenulaciones | 45.96 | 7.29 | 64.00 | 33.00 | 0.16 |
| Ancho crenulaciones | 11.03 | 3.65 | 18.07 | 3.80 | 0.33 |
| No. de bandas | | | 14.00 | | |
| Peso bicho y concha | 5.21 | 3.78 | 12.56 | 0.28 | 0.72 |
| Peso bicho | 1.84 | 1.46 | 5.02 | 0.19 | 0.79 |
| Peso concha | 3.38 | 2.44 | 8.68 | 0.15 | 0.72 |
| Bahía de Chamela | Media | S.D. | Máximo | Mínimo | Cf |
| Ancho | 21.33 | 4.66 | 31.47 | 13.13 | 0.22 |
| Alto | 10.13 | 2.79 | 15.95 | 5.20 | 0.28 |
| Largo | 30.11 | 5.90 | 43.74 | 18.27 | 0.20 |
| L/An | 1.42 | 0.08 | 1.58 | 1.28 | 0.05 |
| Largo foramen | 5.92 | 1.28 | 8.32 | 3.28 | 0.22 |
| Ancho foramen | 3.50 | 0.91 | 5.30 | 1.92 | 0.26 |
| Lf/Anf | 1.73 | 0.25 | 2.55 | 1.36 | 0.14 |
| Foramen-Frente | 60.19 | 268.13 | 1601.00 | 7.62 | 4.45 |
| Foramen-Ancho | 13.02 | 3.26 | 21.02 | 6.92 | 0.25 |
| Número de crenulaciones | 37.46 | 14.61 | 60.00 | 30.00 | 0.39 |
| Ancho crenulaciones | 9.79 | 4.24 | 16.95 | 3.43 | 0.43 |
| No. de bandas | | | 12.00 | 11.00 | |
| Peso bicho y concha | 3.36 | 2.28 | 9.90 | 0.57 | 0.68 |
| Peso bicho | 1.24 | 0.99 | 4.00 | 0.21 | 0.80 |
| Peso concha | 2.12 | 1.36 | 5.90 | 0.48 | 0.64 |
| Cuastecomate | Media | S.D. | Máximo | Mínimo | Cf |
| Ancho | 20.89 | 3.05 | 28.14 | 17.15 | 0.15 |
| Alto | 9.35 | 1.57 | 12.92 | 7.18 | 0.17 |
| Largo | 29.58 | 4.14 | 39.36 | 22.98 | 0.14 |
| L/An | 1.42 | 0.06 | 1.60 | 1.34 | 0.04 |
| Largo foramen | 5.92 | 0.76 | 7.51 | 4.69 | 0.13 |
| Ancho foramen | 3.29 | 0.49 | 4.41 | 2.34 | 0.15 |
| Lf/Anf | 1.82 | 0.20 | 2.33 | 1.50 | 0.11 |
| Foramen-Frente | 14.61 | 2.28 | 20.02 | 11.27 | 0.16 |
| Foramen-Ancho | 12.87 | 2.34 | 20.53 | 10.13 | 0.18 |
| Número de crenulaciones | 47.52 | 3.87 | 60.00 | 40.00 | 0.08 |
| Ancho crenulaciones | 9.59 | 4.66 | 18.47 | 2.13 | 0.49 |
| No. de bandas | | | 12.00 | 9.00 | |
| Peso bicho y concha | 3.02 | 1.41 | 6.63 | 1.35 | 0.47 |
| Peso bicho | 1.06 | 0.58 | 2.70 | 0.40 | 0.54 |
| Peso concha | 1.96 | 0.84 | 3.93 | 0.95 | 0.43 |

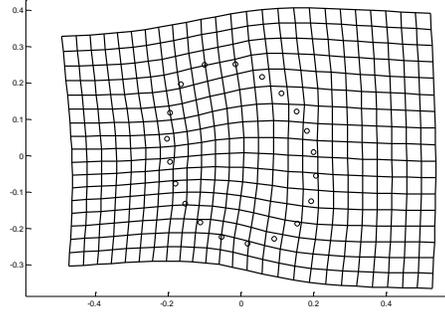
| Ixtapa | Media | S.D. | Máximo | Mínimo | Cf |
|-------------------------|-------|-------|--------|--------|------|
| Ancho | 12.41 | 2.10 | 16.51 | 8.54 | 0.17 |
| Alto | 5.50 | 1.10 | 7.49 | 3.78 | 0.20 |
| Largo | 18.47 | 3.08 | 24.79 | 12.90 | 0.17 |
| L/An | 1.49 | 0.08 | 1.65 | 1.34 | 0.06 |
| Largo foramen | 2.66 | 0.51 | 3.51 | 1.77 | 0.19 |
| Ancho foramen | 1.50 | 0.32 | 2.20 | 0.78 | 0.22 |
| Lf/Anf | 1.79 | 0.25 | 2.42 | 1.28 | 0.14 |
| Foramen-Frente | 8.30 | 1.90 | 11.37 | 4.65 | 0.23 |
| Foramen-Ancho | 7.80 | 1.26 | 10.15 | 5.23 | 0.16 |
| Número de crenulaciones | 31.97 | 16.24 | 50.00 | 23.00 | 0.51 |
| Ancho crenulaciones | 10.26 | 2.16 | 14.58 | 6.08 | 0.21 |
| No. de bandas | | | 12.00 | 9.00 | |
| Peso bicho y concha | 0.75 | 0.36 | 1.51 | 0.19 | 0.48 |
| Peso bicho | 0.29 | 0.13 | 0.54 | 0.08 | 0.45 |
| Peso concha | 0.46 | 0.23 | 1.03 | 0.11 | 0.51 |
| Panamá | Media | S.D. | Máximo | Mínimo | Cf |
| Ancho | 17.57 | 6.51 | 37.12 | 7.39 | 0.37 |
| Alto | 6.98 | 3.26 | 18.01 | 2.48 | 0.47 |
| Largo | 25.28 | 8.33 | 50.94 | 12.53 | 0.33 |
| L/An | 1.46 | 0.10 | 1.76 | 1.32 | 0.07 |
| Largo foramen | 5.87 | 1.88 | 11.29 | 2.58 | 0.32 |
| Ancho foramen | 3.31 | 1.07 | 6.72 | 1.57 | 0.32 |
| Lf/Anf | 1.79 | 0.28 | 2.32 | 0.78 | 0.16 |
| Foramen-Frente | 11.57 | 4.08 | 24.45 | 5.60 | 0.35 |
| Foramen-Ancho | 10.10 | 4.31 | 24.06 | 4.04 | 0.43 |
| Número de crenulaciones | 44.46 | 22.43 | 78.00 | 36.00 | 0.50 |
| Ancho crenulaciones | 11.99 | 4.78 | 27.94 | 6.66 | 0.40 |
| No. de bandas | | | 11.00 | 3.00 | |
| Peso bicho y concha | 2.36 | 3.09 | 16.21 | 0.10 | 1.31 |
| Peso bicho | 0.70 | 1.00 | 5.23 | 0.22 | 1.42 |
| Peso concha | 1.65 | 2.11 | 10.98 | 0.10 | 1.28 |

Anexo 2. Gradillas de deformación para cada población, generados por medio de Morfometría geométrica.

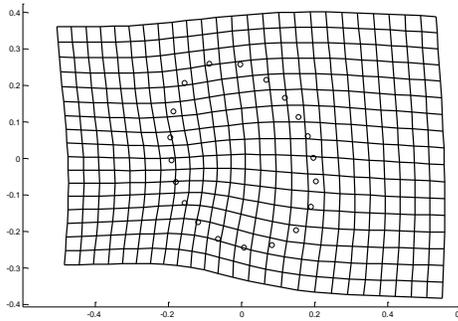
Mazatlán



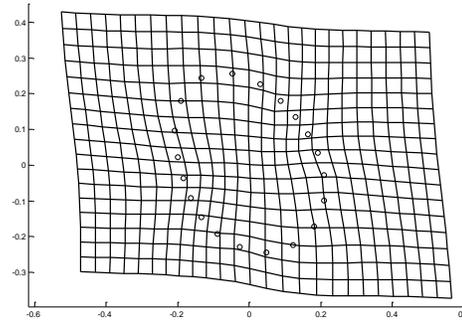
Isla Isabel



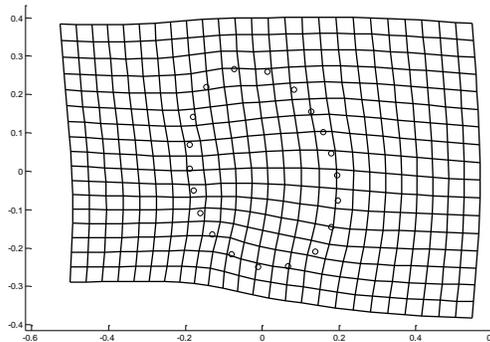
Bahía Banderas



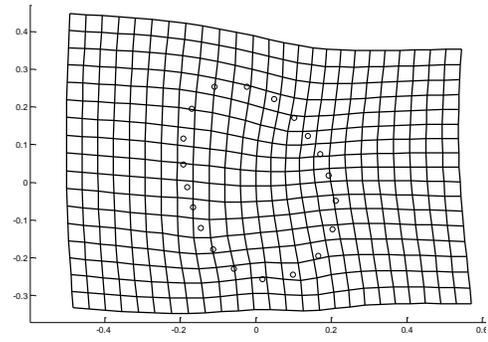
Bahía de Chamela



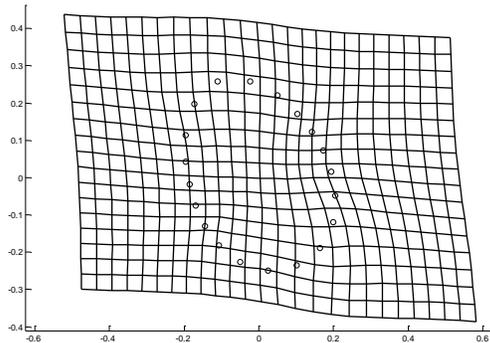
Cuastecomate



Ixtapa



Panamá



Anexo 3. Protocolo de Extracción de ADN por CTAB modificado por McCarthur (2008) para moluscos.

1. Coloque y macere 1-2 mm³ de tejido en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 300 ul de 2X CTAB buffer precalentado a 60°C
2. Encubar en baño maría a 60 °C por 30 minutos
3. Agregue 300 ul de Cloroformo-Isoamil alcohol (96:4) y agite por 2 minutos.
4. Centrifugue a 15 000g por 10 minutos
5. Tome la parte acuosa y repita el paso 3 y 4.
6. En tubos de eppendorf nuevos agregue 600 ul de Isopropanol frío, 25 ul 3M NAOAc y la parte acuosa de la extracción. Mezcle por inversión.
7. Centrifugue a 15 000g por 10 minutos
8. Tire el ETOH y resuspenda el pellet en EtOH al 70%.
9. Centrifugue a 15 000 por 5 minutos.
10. Tire el EtOH y deje el tubo al aire libre para que se seque por 40 minutos.
11. Resuspenda el pellet en 25 ul de 0.1X TE y deje los tubos en un refrigerador a 4°C toda la noche.
12. Verifique la calidad y la cantidad de la muestra.

2X CTAB buffer

- 100 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 1.4 M NaCl
- 20 mM EDTA
- 2% Hexadecyltrimethylammonio bromido (CTAB)
- 2% polyvinylpyrrolidone (40,000 MW)
- 0.2% 2-mercaptoethanol – agregue al final.