

Informe final* del Proyecto GD001

Variabilidad genética y probable origen de las poblaciones colonizadoras en el área afectada por el buque tanque Lázaro Cárdenas II, Baja California Sur

Responsable: M. en C. Eduardo F Balart Páez
Institución: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
Dirección: Mar Bermejo # 195, Playa Palo de Santa Rita, La Paz, BCS, 23090 , México
Correo electrónico: ebalart04@cibnor.mx
Teléfono/Fax: 612-1238436 y 612-38484 ext. 3491
Fecha de inicio: Octubre 30, 2008.
Fecha de término: Marzo 15, 2016.
Principales resultados: Informe final.
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Balart Páez, E. F. y A. Ortega Rubio. 2016. Variabilidad genética y probable origen de las poblaciones colonizadoras en el área afectada por el buque tanque Lázaro Cárdenas II, Baja California Sur. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. **Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. GD001**, México D.F.

Resumen:

Los trabajos realizados en el proyecto CT001 "Programa de monitoreo de la restauración del arrecife coralino afectado por el buque tanque Lázaro Cárdenas II, Baja California Sur", han demostrado que existe un repoblamiento del área afectada, especialmente sobre y cerca de los módulos instalados. Con el fin de conocer los mecanismos involucrados en el proceso de restauración de este ecosistema y estimar las probabilidades de permanencia de las poblaciones en el futuro, es necesario evaluar la diversidad genética de estas poblaciones así como intentar identificar las fuentes de las cuales provienen estos colonizadores. Los organismos colonizadores pueden provenir de áreas adyacentes o de lugares alejados, e inclusive remotos, como ocurre con muchas poblaciones abiertas de arrecifes. Asimismo, la diversidad genética de los colonizadores podría tener consecuencias en la viabilidad de estas poblaciones en el futuro, ya que buena parte de la plasticidad a los cambios depende en gran medida de ello. Con la finalidad de estimar la variabilidad genética y el probable origen de las principales especies de invertebrados y peces que colonizan esta región se han empleado técnicas de genética molecular, que permiten inferir la estructura de las poblaciones y su flujo genético así como estimar la variabilidad mediante un análisis comparativo con organismos de diversa procedencia a diferentes escalas espaciales.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

Informe Final del proyecto GD001

“Variabilidad genética y probable origen de las poblaciones colonizadoras en el área afectada por el buque tanque Lázaro Cárdenas II, Baja California Sur.”

Responsables: Dr. Eduardo F. Balart Páez y Dr. Alfredo Ortega Rubio

Institución Responsable del Proyecto:

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dirección: Av. Politécnico Nacional 195, Col. Playa Palo de Santa Rita Sur,
La Paz, Baja California Sur, C.P. 23096

Correo electrónico: ebalart04@cibnor.mx

Telefonos: 612-1238551 y 612-1238484 ext. 3491 y 3449

Principales resultados: Informe Final, secuencias o microsatelites, publicaciones y tesis.

Autores del Informe: Eduardo F. Balart Páez, Alfredo Ortega Rubio, Pedro Cruz Hernández, Francisco J. García de León, Francisco González García, Carolina Galván Tirado, David A. Paz García, Fernando Aranceta Garza, José F. Meléndez Cal y Mayor, Octavio Aburto Oropeza, Sergio F. Flores Ramírez.

Octubre 2015.

RESUMEN

Los trabajos realizados Programa de monitoreo de la restauración del arrecife coralino afectado por el buque tanque Lázaro Cárdenas II, Baja California Sur (proyecto CT001 y Ampliación CT001), demostraron el repoblamiento y/o uso del área restaurada en el arrecife San Lorenzo y la recuperación funcional parcial de la misma. En este proyecto, GD001, se evaluó la diversidad genética de algunas especies representativas que colonizaron o usan frecuentemente esta área comparada con la de áreas testigos, y se exploró la probable fuente de origen de los mismos mediante análisis de flujo genético mediante marcadores moleculares. El coral risco, *Pocillopora verrucosa*, fue analizado a partir de 6 loci microsatélites, ya que el ADN mitocondrial analizado resultó poco informativo. La mayor heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e), como el número de alelos se registró en las localidades del Portugués y Cabo Pulmo-Los Frailes, y las localidades con menos diversidad alélica fueron el Arrecife San Lorenzo (área restaurada y adyacente) y San Gabriel en la Isla Espíritu Santo con 4 y 4.16 respectivamente. El índice de riqueza genotípica (N_g/N) en las localidades del Canal San Lorenzo y San Gabriel fueron menor al 0.12, indicando que solo el $\approx 10\%$ del total de individuos tuvieron genotipos únicos. Los valores de F_{st} mostraron un valor de divergencia genética moderado entre las poblaciones del Norte y Sur ($F_{st} = 0.054$), observándose una migración (N_m) muy baja, de 4.3 individuos/generación. La variabilidad genética fue mayor en Cabo Pulmo-Los Frailes y menor en el Canal de San Lorenzo e Isla Espíritu Santo, es decir, los valores son menores en el área restaurada e insular adyacente. Esto sugiere que los mecanismos de reproducción asexual (p. ej., a partir de fragmentación) pueden ser más importante que el reclutamiento a partir de reproducción sexual en estas dos áreas, y que en futuras restauraciones la variabilidad genética debiera ser considerada. El análisis de las 83 secuencias del gen CO1 de muestras de la estrella de mar *Phataria unifascialis* de Bahía de Los Ángeles, Punta Diablo, Canal San Lorenzo, El Portugués y Los Frailes indicó que existe una gran diversidad genética haplotípica y nucleotídica. La mayoría de los haplotipos fueron únicos (65), encontrándose 6 repetidos en dos localidades y otros ocho en 3 localidades. La diversidad nucleotídica total fue de 0.0688 y dentro de las localidades varió de 0.0064 a 0.0081. La localidad con mayor número de sitios polimórficos fue Los Frailes y el menor ocurrió en El Portugués. Tanto el

árbol, la red de haplotipos y valores no significativos de F_{ST} sugieren que no hay estructura poblacional y que aparentemente todos los sitios forman parte de una única población con alta diversidad genética. Para el caso de la estrella de mar *Pharia pyramidata* el análisis de las 32 secuencias del gen CO1 indicó que las muestras poseen una gran diversidad genética haplotípica y nucleotídica. La mayoría de los haplotipos fueron únicos (23), encontrándose 3 repetidos entre localidades, uno de los cuales estuvo presente en las 3 localidades. La diversidad nucleotídica total fue de 0.0054 y dentro de las localidades varió de 0.0032 a 0.0064. La localidad con mayor número de sitios polimórficos fue Punta Diablo y el menor ocurrió en Bahía de Los Ángeles. Tanto el árbol filogenético como la red de haplotipos no mostraron una agrupación geográfica de los haplotipos, sugiriendo que es una única población. Con base en estos resultados se concluye el origen de las estrellas que colonizaron el área restaurada (Área Primaria) en el Arrecife San Lorenzo, pudiera ser cualquiera de las localidades. En el caso de *Cirrhitichthys oxycephalus*, pequeño pez asociado a corales ramificados, se analizaron secuencias de la Región Control de muestras de siete localidades del Golfo de California. Los haplotipos fueron únicos y solamente se presentaron dos haplotipos repetidos. La diversidad nucleotídica total fue de 0.032 (SD = 0.015) y dentro de las localidades los valores variaron desde 0.028 hasta 0.034. La localidad de Loreto fue la que presentó un mayor número de sitios variables en las secuencias, y la menor Punta Diablo en bahía de La Paz. No se detectaron diferencias genéticas significativas entre las localidades, por lo cual se concluye que halcón de coral tiene una gran variación genética con abundante flujo genético entre las localidades las cuales están formando una sola población. Para el caso de *Stegastes rectifraenum*, pez territorialista con cuidado parental, se procesaron muestras procedentes de Bahía de Los Ángeles, Bahía Concepción, Isla San José, Isla Espíritu Santo, Ensenada de Muertos, Los Frailes y Bahía Magdalena. El análisis de las secuencias de la Región Control indicó gran diversidad haplotípica, con 131 haplotipos diferentes de 137 obtenidos y solo 6 compartidos. La diversidad nucleotídica fue mayor en Los Frailes y en Bahía Magdalena, con valores de 0.019 y 0.017, respectivamente. La AMOVA indicó que la variación genética fue mayor dentro de las localidades (76.06 %) y

escasa entre localidades (23.94 %). Los valores calculados de Φ_{ST} (y las probabilidades asociadas) entre pares de localidades demuestra que existen estructura poblacional, formándose dos grupos, uno con las localidades del sur del Golfo de California (incluyendo el área restaurada) y el otro con las localidades norteñas del Golfo y Bahía Magdalena. Esto sugiere que hay barreras o restricciones al flujo genético entre agrupaciones pero no dentro de ellas. La prueba de neutralidad de Tajima (D) fue significativa en las tres localidades norteñas, así como en el arrecife San Lorenzo y las localidades sureñas. Sin embargo, su valor negativo en todas ellas, podría indicar que la población ha experimentado un cuello de botella o una rápida expansión de tamaño poblacional. Los valores de F_s (F_s) y la de Onzin Rozas también fueron significativos para todas las localidades. Se concluye que la jaqueta de Cortés tiene una gran variación genética, que aparentemente se estructura en dos poblaciones espaciales (sur y norte) y que el origen de los peces en el área restaurada procede de los sitios del sur del Golfo de California. Del pez botete bonito *Canthigaster punctatissima*, se realizaron pruebas pilotos de extracción y amplificación de dos genes mitocondriales (CO1 y Región Control), obteniéndose secuencias de buena calidad en un 100% para el primer gen y del 60% para el segundo.

En general, se concluye que la variabilidad genética fue alta en todos los organismos colonizadores o que frecuentan el área restaurada en el arrecife San Lorenzo excepto el coral *Pocillopora verrucosa*, donde la mayoría de las colonias son clones originados por fragmentación asociada a eventos naturales como huracanes. En cuanto al origen de estos organismos se concluye que los propágulos pudieron originarse de prácticamente cualquier localidad del Golfo de California en el caso de las dos estrellas de mar y el pez *C. oxycephalus*, mientras que la damisela *S. rectifraenum* proviene de sitios del sur del golfo. En el caso del coral *Pocillopora verrucosa* el origen de los fragmentos cementados en los módulos (Área Primaria del arrecife San Lorenzo) procede del área adyacente, pero en general, más que diferencias genéticas entre sitios hay diferencias en el modo de reproducción.

ÍNDICE

Introducción	8
Materiales y métodos.....	10
Origen y conservación de las muestras	10
Trabajo de laboratorio	11
Análisis de datos.....	16
<i>Microsatélites (coral escleractinio)</i>	16
<i>Marcador mitocondrial (estrellas y peces)</i>	17
Resultados.....	19
Coral escleractinio: <i>Pocillopora verrucosa</i>	19
Estrellas de mar: <i>Phataria unifascialis</i>	22
Estrellas de mar: <i>Pharia pyramidata</i>	28
Peces: <i>Cirrhitichthys oxycephalus</i>	33
Peces: <i>Stegastes rectifraenum</i>	38
Peces: <i>Canthigaster punctatissima</i>	46
Discusión	47
Conclusiones	50
Literatura citada	51
Publicaciones asociadas al proyecto GD001	55

Tablas y figuras

Tabla 1. Características de los oligos-microsatélites empleados.....	12
Tabla 2. Concentraciones finales de reactivos para la amplificación de todos los oligonucleótidos.	12
Tabla 3. Oligonucleótidos de microsatélite que amplificaron exitosamente, de los cuales PV2 no fue informativo.....	13
Tabla 4. Variabilidad genética de seis loci microsatélites para el coral, <i>Pocillopora verrucosa</i> en cinco localidades de muestreo.	20
Tabla 5. Diferenciación Genética Poblacional (Valor F_{ST}).	21
Tabla 6. Valores de Heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e), Número de alelos (N_a) para el Portugués (P) y Cabo Pulmo (CP).	21
Tabla 7. Comparación de diversidad genética con otras localidades.	21
Tabla 8. Índices de diversidad de las cinco localidades muestreadas de la estrella de mar <i>Phataria unifascialis</i>	22
Tabla 9. Distribución y frecuencia de los haplotipos de la estrella de mar <i>Phataria unifascialis</i> por localidad de muestreo.	23
Tabla 10. Comparaciones pareadas de F_{ST} (bajo la diagonal) y de los valores de P asociados (arriba de la diagonal) entre las cinco localidades de <i>P. unifascialis</i>	26
Tabla 11. Análisis de variancia molecular de las cinco localidades muestreadas de <i>P. unifascialis</i>	27
Tabla 12. Pruebas de neutralidad de Tajima (D) y Fu (F_s) y el valor de probabilidad (P) asociado en las cinco localidades de <i>Phataria unifascialis</i>	27
Tabla 13. Número de migrantes entre las cinco localidades de <i>Phataria unifascialis</i>	28
Tabla 14. Índices de diversidad de las tres localidades muestreadas de la estrella de mar <i>Pharia pyramidata</i>	28
Tabla 15. Distribución y frecuencia de los haplotipos de la estrella de mar <i>Pharia pyramidata</i> por localidad de muestreo.	29

Tabla 16. Comparaciones pareadas de F_{ST} (bajo la diagonal) y de los valores de P asociados (arriba de la diagonal) entre las tres localidades de <i>Pharia pyramidata</i>	31
Tabla 17. Análisis de variancia molecular de las tres localidades muestreadas de <i>Pharia pyramidata</i>	32
Tabla 18. Pruebas de neutralidad de Tajima (D) y F_u (F_s) y el valor de probabilidad (P) de las tres localidades muestreadas de <i>Pharia pyramidata</i>	32
Tabla 19. Número de migrantes entre las tres localidades muestreadas de <i>Pharia pyramidata</i>	32
Tabla 20. Distribución de los haplotipos del halcón de coral, <i>Cirrhitichthys oxycephalus</i> en las siete localidades analizadas.	34
Tabla 21. Estadística descriptiva de las siete localidades muestreadas de <i>C. oxycephalus</i>	36
Tabla 22. Comparaciones pareadas de F_{ST} (bajo la diagonal) y de los valores de P asociados (arriba de la diagonal) entre las siete localidades de <i>C. oxycephalus</i>	37
Tabla 23. Resultados de las pruebas de neutralidad de Tajima (D), de F_u (F_s) y de Chakraborty (θ_{Hom}) para las siete las localidades de <i>C. oxycephalus</i>	37
Tabla 24. Número de migrantes entre las siete localidades de <i>C. oxycephalus</i>	38
Tabla 25. Distancias genéticas (\pm error estándar) estimadas utilizando el marcador mitocondrial Región Control, entre localidades con <i>Stegastes rectifraenum</i> (Bahía Concepción, Bahía de Los Ángeles y Bahía Magdalena) y <i>Stegastes flavilatus</i> (Ixtapa-Zihuatanejo).	39
Tabla 26. Distancias genéticas (\pm error estándar) estimadas utilizando el marcador mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad 1 (CO1) entre localidades con <i>Stegastes rectifraenum</i> (Bahía Concepción, Bahía de Los Ángeles y Bahía Magdalena) y <i>Stegastes flavilatus</i> (Ixtapa-Zihuatanejo).	40
Tabla 27. Descripción de los haplotipos de <i>S. rectifraenum</i> en las siete localidades muestreadas.	42
Tabla 28. Estadística descriptiva para las siete localidades de <i>S. rectifraenum</i>	44
Tabla 29. Análisis de variancia molecular (AMOVA) para las siete localidades de <i>S. rectifraenum</i>	44

Tabla 30. Comparaciones pareadas de F_{ST} (bajo la diagonal) y de los valores de P asociados (arriba de la diagonal) entre las siete localidades de <i>S. rectifraenum</i>	45
Tabla 31. Resultados de las pruebas de neutralidad de Tajima (D), de Fu (F_s), de Chakraborty (θ Hom), de Onzin y Rozas (R_2) para las siete localidades de <i>S. rectifraenum</i>	46
Figura 1. Microsatélite PV5 amplificado en las muestras del Portugués 25 al 47. Se encontró un tamaño aproximado de ≈ 220 -245 pb.	13
Figura 2. Microsatélite PV6 amplificado en las muestras de Cabo Pulmo 1 al 48. Se encontró un tamaño aproximado de ≈ 190 -215 pb.	14
Figura 3. Microsatélite PV7 amplificado en las muestras de Cabo Pulmo 1 al 32. Se encontró un tamaño aproximado de ≈ 220 -245 pb.	14
Figura 4. Microsatélite Pd3002 amplificado en las muestras de Portugués 1 al 47. Se encontró un tamaño aproximado de ≈ 190 -200 pb.	14
Figura 5. Microsatélite PV2 amplificado en muestras de la localidad “El Portugués”. Nótese como existen muchas bandas inespecíficas y como desaparecen casi todas al aumentar la temperatura a 55°C (extrema derecha); presentando posiblemente alelos nulos.	15
Figura 6. Reconstrucción filogenética por medio del vecino más cercano de <i>Phataria unifascialis</i> . Acrónimos de las localidades como en la Tabla 6.....	25
Figura 7. Red de haplotipos de <i>Phataria unifascialis</i> para las cinco localidades de muestreo. Acrónimos de las localidades como en la Tabla 6.	26
Figura 8. Reconstrucción filogenética por medio del vecino más cercano de <i>Pharia pyramidata</i> . Acrónimos de las localidades como en la Tabla 14.	30
Figura 9. Red de haplotipos de <i>Pharia pyramidata</i> para las tres localidades de muestreo en el Golfo de California. Acrónimos de las localidades como en la Tabla 14.....	31

Introducción

Los trabajos realizados en el proyecto CT001 y Ampliación del proyecto CT001 “Programa de monitoreo de la restauración del arrecife coralino afectado por el buque tanque Lázaro Cárdenas II, Baja California Sur”, han demostrado el repoblamiento del área afectada, especialmente sobre y cerca de los módulos (estructuras de roca y cemento) instalados como medida de mitigación del daño e inicio del proceso de recuperación funcional del área (Balart *et al.*, 2010; Balart *et al.*, 2015). Con el fin de conocer los mecanismos involucrados en el proceso de restauración de este ecosistema y estimar las probabilidades de permanencia de las poblaciones en el futuro, es necesario evaluar la diversidad genética de estas poblaciones así como intentar identificar las fuentes de las cuales provienen estos colonizadores. Los organismos colonizadores del área restaurada, especialmente aquellos asociados a los módulos (área Primaria), pueden provenir de áreas adyacentes o de lugares alejados, e inclusive remotos, como ocurre con muchas poblaciones abiertas de arrecifes (Caley *et al.*, 1996; Planes *et al.*, 1998; Sponaugle *et al.* 2002; Cowen *et al.*, 2006). La elucidación de esta pregunta es básica para determinar las tendencias a mediano y largo plazo de la viabilidad de la restauración en esta zona afectada. Asimismo, la diversidad genética de los colonizadores podría tener consecuencias en la viabilidad de estas poblaciones en el futuro, ya que buena parte de la plasticidad a los cambios depende en gran medida de ello. La respuesta más sencilla, rápida e informativa a estas preguntas es mediante el uso de marcadores moleculares, que permite inferir la estructura de las poblaciones y su flujo genético (medida indirecta de conectividad entre hábitats), así como estimar la variabilidad genética mediante un análisis comparativo con organismos de diversa procedencia a diferentes escalas espaciales.

Responder a estas preguntas nos puede llevar a optimizar los protocolos de restauración y manejo y, evidentemente, permitirían aplicar este conocimiento en el proceso de restauración a otras localidades. Por otro lado, los trabajos de conectividad entre poblaciones de especies marinas en el Golfo de California aplicados a la problemática en

arrecifes impactados son prácticamente desconocidos (Aranceta-Garza *et al.*, 2012), por lo que este estudio seguramente será de gran interés para la comunidad científica.

El primer informe de actividades y avances se centró primariamente en el coral risco, *Pocillopora verrucosa*, cuyo origen sí era conocido (los fragmentos cementados procedían del área Primaria impactada) y se utilizaron microsátélites como marcadores moleculares, ya que el ADN mitocondrial resultó, en primera instancia, poco informativo. El segundo informe sin embargo, se enfocó en dos especies ícticas asociadas a los módulos, el halconcito de coral *Cirrhitichthys oxycephalus*, especie que tiene una gran predilección por las cabezas de coral como hábitat, y a la jaqueta de Cortés *Stegastes rectifraenum*, especie territorial que se resguarda en los roqueríos o bajo los corales cuando están disponibles, como ocurre en el área de módulos. Para esos análisis se utilizó el estudio de la región control del ADN mitocondrial de ambas especies, ya que es uno de los marcadores con mayor variación genética en peces, y útil para estudios con distancias geográficas pequeñas a medianas entre sus localidades. En el tercer informe se presentaron los avances y problemática con las estrellas de mar *Pharia pyramidata* y *Pentaceraster cumingi*, utilizando como marcador molecular el gen mitocondrial Citocromo c Oxidasa subunidad 1, comúnmente llamado CO1, y los interesantes resultados finales obtenidos con la jaqueta de Cortés *Stegastes rectifraenum*, al ampliar la escala de estudio hasta el Alto Golfo y fuera del Golfo de California. En el cuarto informe se presentaron los resultados obtenidos con la estrellas de mar amarilla, *Pharia pyramidata*, y la común, *Phataria unifascialis*, aprovechando la optimización del protocolo a partir de Citocromo oxidasa subunidad I (COI), así como resultados y secuencias preliminares del pez botete bonito *Canthigaster punctatissima*, especie común en los arrecifes rocosos y coralinos del Golfo de California y en el área restaurada del Canal San Lorenzo en Bahía de La Paz. En este informe final se presenta la información recabada en el proyecto y se discuten los resultados obtenidos para todas las especies.

Materiales y métodos

Origen y conservación de las muestras

Las muestras de *Pocillopora verrucosa* consistieron de fragmentos pequeños de 2 cm de coral recolectados aleatoriamente en 50 colonias por localidad y preservado en etanol absoluto para el análisis molecular. Estas proceden de muestras depositadas en Laboratorio de Necton y Ecología de Arrecifes del CIBNOR y el Laboratorio de Sistemas Arrecifales de la UABCS. El material analizado de las estrellas de mar *Pharia pyramidata* y *Phataria unifascialis* procede de muestras depositadas en el Laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad Autónoma de Baja California Sur y del Laboratorio de Necton y Ecología de Arrecifes del CIBNOR. Este material (consistente en especímenes completos, fragmentos o tejido) estaba conservado en alcohol etílico al 96% o congelado. Posteriormente, se hicieron recambios de alcohol y se conservaron a temperatura ambiente o en congeladores hasta el momento de su análisis. Los peces (la jaqueta de Cortés *Stegastes rectifraenum*, el halconcito *Cirrhichthys oxycephalus* y el botete bonito *Canthigaster punctatissima*) fueron recolectados utilizando una solución de aceite de clavo como anestésico, muestreado directamente con redes manuales, o capturados con fisgas pequeñas. Este material fue conservado en alcohol etílico absoluto. Posteriormente, ya en el laboratorio, el alcohol fue reemplazado y dispuesto en un congelador hasta el momento de su análisis. Este material se obtuvo de la Colección Ictiológica del CIBNOR y del Laboratorio de Ecología Molecular de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Adicionalmente se procesaron algunos individuos de *Stegastes flavilatus* procedentes de Ixtapa-Zihuatanejo, originalmente identificados erróneamente como *S. rectifraenum*, para disponer de elementos de juicio moleculares adicionales a los taxonómicos tradicionales.

Trabajo de laboratorio

El ADN genómico de los organismos fue extraído utilizando el kit de extracción Dneasy Tissue Kit (Qiagen Inc. Valencia, CA). A continuación se detallan los métodos de amplificación para cada organismo utilizando marcadores mitocondriales, con excepción del coral *P. verrucosa* en el cual se utilizaron marcadores nucleares de microsatélite. Esto debido a que los marcadores mitocondriales tienen una baja tasa mutacional en los corales escleractinios (Hellberg 2006) y brindan poca información para cumplir los objetivos del presente estudio.

Coral escleractinio: *Pocillopora verrucosa*

Marcadores empleados

Se probaron 6 pares de oligonucleótidos de microsatélite (Tabla 1), de los cuales 4 fueron especie-específicos a *P. verrucosa* (Magalon *et al.*, 2004) y los restantes fueron obtenidos de la especie *P. damicornis* (Starger *et al.*, 2008).

Amplificaciones de PCR

Las condiciones *PCR* de cada oligonucleótidos de microsatélite fueron estandarizadas usando un termociclador *Applied Biosystems* con las concentraciones finales de los reactivos de amplificación en la Tabla 2. Los ciclos del *PCR* empleados fueron 1) desnaturalización inicial de 10 min a 94°C; 2) 30 ciclos de: a) 45s a 94°C; b) 45s a 56°C y c) 30s a 72°C; 3) extensión final de 8 min a 72°C. Cada amplificación de *PCR* se diluyó 1:5 con un colorante azul de bromo fenol/xilen cianol (al 0.3% cada uno) con formamida (98%), para después ser desnaturalizada por 5 min. Después cada muestra fue corrida en un gel de poliacrilamida al 4% dentro de una cámara de electroforesis vertical, y finalmente se visualizaron los microsatélites del gel por medio del colorante *Sybr-gold* en un escáner fluorescente multicolor *FMBIO III Multi Viex* (HITASHI).

Tabla 1. Características de los oligos-microsatélites empleados.

Locus	Especificidad	Secuencias de Oligo (5'-3')	Tipo de repetición	Ta (°C)	Na	Rango de tamaño (pb)
PV2	coral	GCCAGGACCCATTTATACTCC TGCAGTGTCTACTTGTTCAGTGC	(GA) ₂₀	56	7	130-196
PV5	coral	GGTCATCACGCAAAGTTCC GAATAGCCTGCGTTTATTTGG	(CA) ₁₁	56	12	221-255
PV6	coral	CTTCCCGACCAGTTTAGGG- AGCCGTTTCAGCTACCTATGG	(GT) ₇	56	14	195-219
PV7	coral	GGAGATGGATGGAGACTGC GGTATCTCTGTGCTCAGTTCTTTG	(GT) ₅ (CT) ₂ GT(CT) ₃	55	5	215-233
Pd2-006	coral	ATCTCCATGTGATCGGCATT GTTCCCCCAGCTGAGAAGTT	(CA) ₈	55	7	181-199
Pd3-002	coral	ATCCGAATACAAGCGAAACG CAAAGCTTCTATCAGAAAATGCAA	(AAC) ₁₀	55	10	195-243
Pd3-005	coral	AGAGTGTGGACAGCGAGGAT GTTCTTCGCCTTCGATTTT	(TGA) ₉	55	3	162-187
Pd3-008	coral	AGTTGAGGTTGTTGAAACATG TCCATGCAGAACCCC	(CTG) ₇	60	4	153-162

PV: *P. verrucosa*; Pd: *P. damicornis*; Ta: temperatura de alineamiento; Na: número de alelos; Ho: heterocigocidad observada; He: heterocigocidad esperada.

Tabla 2. Concentraciones finales de reactivos para la amplificación de todos los oligonucleótidos.

Reactivo	Concentración
ADN	20-40ng
Oligos	1.5µM
dNTP	0.2mM
MgCl ₂	1.5mM
Buffer 10X (Tris-HCl 100mM, MgCl ₂ 15mM, KCl, 500mM, ph 8.3)	1X
Taq Polimerasa	0.625 U/ µl
Volumen Final de reacción 25 µl	

Evaluación de los microsatélites

Se evaluaron todos los microsatélites buscando que fueran informativos-polimórficos y con eso darle una mayor resolución al estudio (Tabla 3). Se pudieron analizar

exitosamente ambas poblaciones, concluyendo que de los seis pares de oligos examinados solo 6 fueron informativos (PV5, PV6, PV7, Pd2006 Pd3002, Pd 3005, 3008; Figs.2-5), y el resto no fue informativo (PV2; Fig.6).

Tabla 3. Oligonucleótidos de microsatélite que amplificaron exitosamente, de los cuales PV2 no fue informativo.

Oligo	Informativo	No informativo
PV2		X
PV5	X	
PV6	X	
PV7	X	
Pd2006	X	
Pd3002	X	
Pd3005	X	

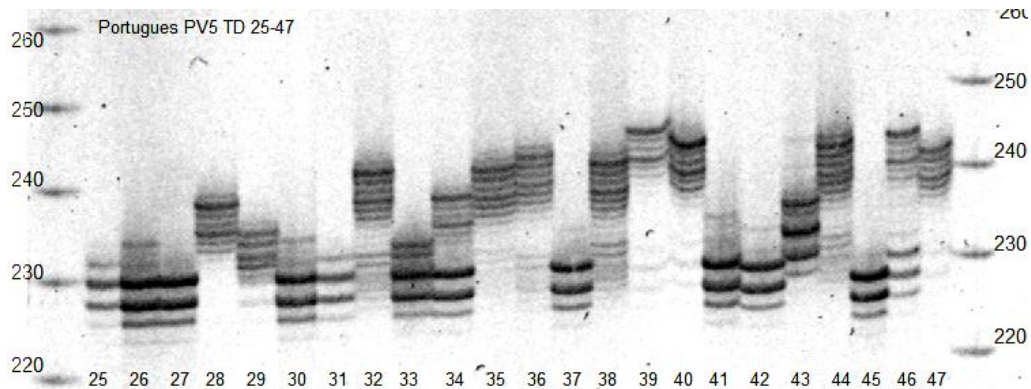


Figura 1. Microsatélite PV5 amplificado en las muestras del Portugués 25 al 47. Se encontró un tamaño aproximado de $\approx 220-245$ pb.

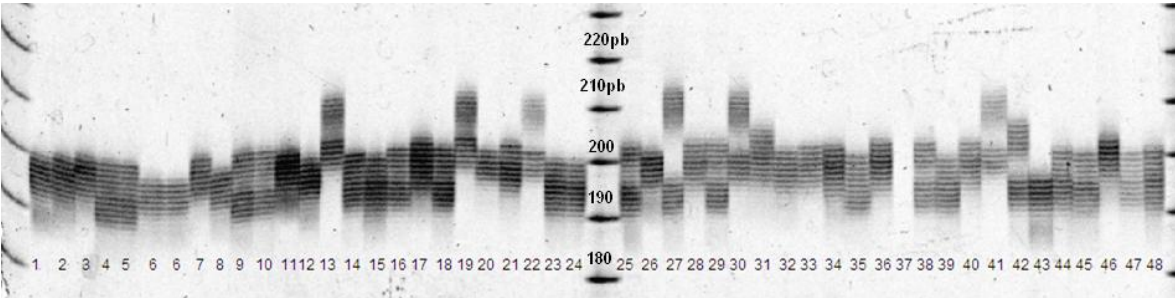


Figura 2. Microsatélite PV6 amplificado en las muestras de Cabo Pulmo 1 al 48. Se encontró un tamaño aproximado de ≈ 190 -215 pb.

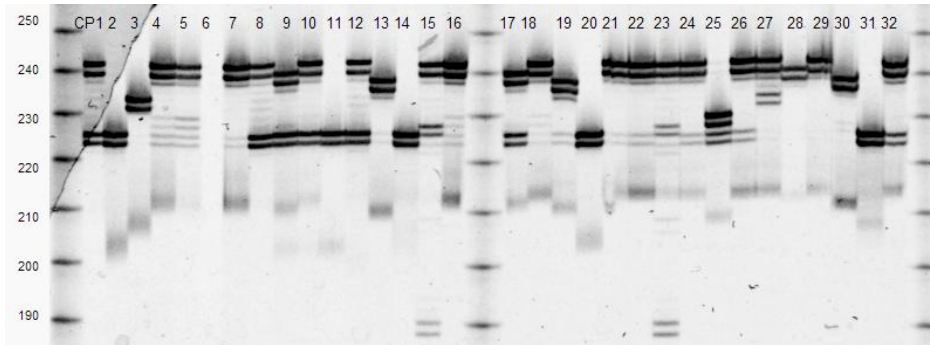


Figura 3. Microsatélite PV7 amplificado en las muestras de Cabo Pulmo 1 al 32. Se encontró un tamaño aproximado de ≈ 220 -245 pb.

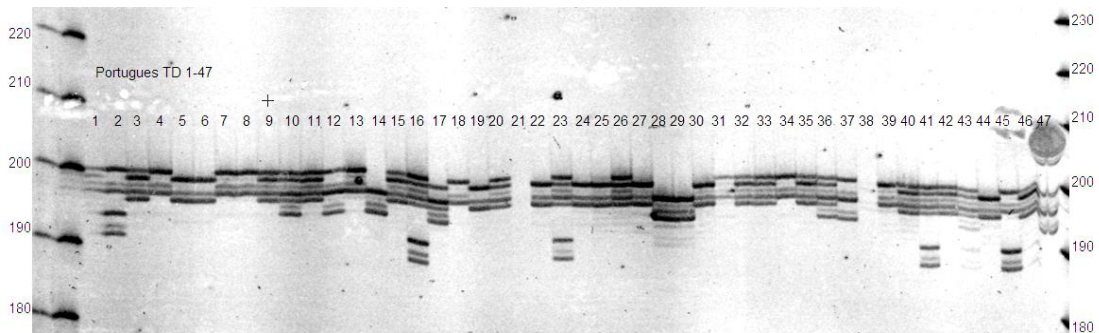


Figura 4. Microsatélite Pd3002 amplificado en las muestras de Portugués 1 al 47. Se encontró un tamaño aproximado de ≈ 190 -200 pb.

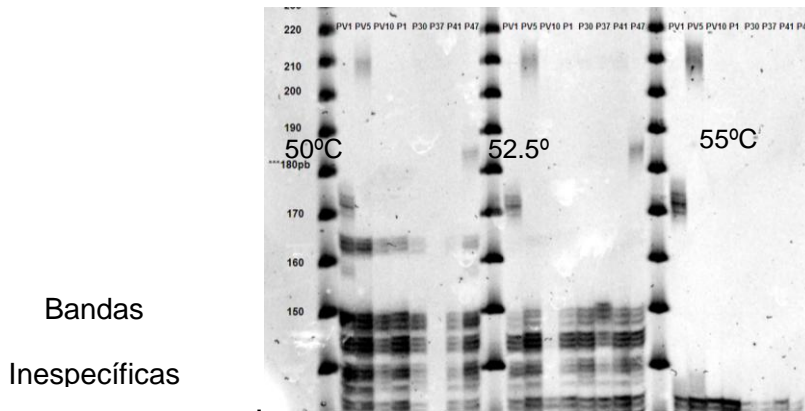


Figura 5. Microsatélite PV2 amplificado en muestras de la localidad “El Portugués”. Nótese como existen muchas bandas inespecíficas y como desaparecen casi todas al aumentar la temperatura a 55°C (extrema derecha); presentando posiblemente alelos nulos.

Estrellas de mar: *Pharia pyramidata* y *Phataria unifascialis*

Se utilizaron los iniciadores universales para amplificar la región del citocromo oxidasa subunidad I (COI) reportados por Folmer *et al.* (1994). Las amplificaciones se realizaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en volúmenes de 15 µl conteniendo ~50 ng de ADN, 1x de buffer, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP's, 0.2 µM de cada iniciador, 0.3 U Taq platinun ADN polimerasa (Invitrogene, Carlsband CA) y 0.08 µg de albúmina. Las condiciones de PCR fueron: 94° C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94° C por 1 minuto de desnaturalización, 45° C por 1 minuto de amplificación y 72° C por 1 minuto de extensión; con una extensión final de 72° C por 10 minutos.

Peces: *Cirrhichthys oxycephalus*, *Stegastes rectifraenum* y *Canthigaster punctatissima*

Una región de aproximadamente 1.1 kb de pares conteniendo toda la región control de ADN mitocondrial de las especies *Stegastes rectifraenum* y *Cirrhichthys oxycephalus* fue

amplificada usando la reacción en cadena de la polimerasa. La secuencia de los iniciadores hacia adelante fueron para *C. oxycephalus*: RCSR1 5'-CGGAGGTTAAAATCCTCCCTA-3' y para *Stegastes rectifraenum*: Pro2-F 5'-TCCCAAAGCTAGGATTCTAA-3' y para el reverso se utilizó el mismo iniciador PCR-R 5'-AACATCTTCAgTgTTATgCTTT-3'. Las amplificaciones fueron hechas en un volumen de reacción de 50 μ L conteniendo un total de 50 ng de ADN total, 10 pmol de cada iniciador, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada uno de los dNTPs, y .05 U/ μ L de *Taq* (Sigma). El programa de amplificación fue: 3 min a 95 °C, 35 ciclos de 30 sec a 95 °C, 1 min a 54 °C, y 1 min a 72 °C, y una extensión final a 72 °C por 4 min.

Para el caso del botete bonito *Canthigaster punctatissima*, se hicieron pruebas pilotos utilizando los iniciadores universales (FISH2) para amplificar la región del citocromo oxidasa subunidad I (COI) así como el gen mitocondrial región control. Para amplificar región control se diseñó un primer en sentido "forward" (Canthi-F) y se utilizó el "reverse" anteriormente diseñado por Rubén Valles (PCR-R). Los productos de las amplificaciones de las especies de peces fueron verificados en geles de agarosa 1% usando un marcador como estándar (100 pb ADN ladder) (Invitrogen, Carlsband CA). La Región Control amplificada de cada una de las muestras fue enviada para su secuenciado a la compañía de Genewiz, Inc.

Análisis de datos

Microsatélites (coral escleractinio)

Se obtuvieron los estimadores de la variabilidad genética: alelos promedio (A), números de alelos efectivos (n_e), heterocigosidad observada y esperada (H_o y H_e) utilizando el programa ARLEQUIN v3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Se revisó la presencia de alelos nulos mediante el programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.* 2004) y el equilibrio de Hardy-Weinberg utilizando la prueba de Fisher (Guo y Thompson, 1992). Se determinó el desequilibrio de ligamiento entre los pares de loci con el programa ARLEQUIN v3.11

(Excoffier *et al.*, 2005). Adicionalmente, para determinar la estructura poblacional en el coral *P. verrucosa* se utilizó el programa STRUCTURE y se analizaron los datos pareados de F_{ST} por localidad.

Marcador mitocondrial (estrellas y peces)

La edición de las secuencias se realizó con el programa CodonCode Aligner (<http://www.codoncode.com/aligner>). Se llevó a cabo una comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en el banco de genes Genbank para corroborar que se estuviese amplificando el COI en los organismos del presente estudio. Se realizó un alineamiento de las secuencias con el programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013) mediante Clustal W. El número de haplotipos, diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π) dentro de las localidades y totales fueron estimadas para la especie de estrellas y peces mediante el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

Reconstrucción genealógica

Se realizaron árboles filogenéticos con el criterio del vecino más cercano (Neighbour-joining) con el programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013). Se construyó una red de haplotipos con el programa Network 4.6.1.2 (<http://www.fluxus-engineering.com>) mediante el método de puntos medios (Bandelt *et al.*, 1999).

Análisis poblacional

Se estimaron los valores pareados de F_{ST} entre localidades y sus valores de significancia con el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer 2010). Los niveles de significancia fueron ajustados para múltiples pruebas usando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). La estructura genética entre las localidades se examinó con un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA; Excoffier, *et al.* 1992) para conocer la partición de la varianza genética dentro y entre localidades, y sus componentes, mediante los valores del estadístico Φ_{ST} . La estimación de Φ_{ST} es análoga al estadístico F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984). La significancia de la estimación fue evaluada mediante 10,100 permutaciones con

el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer 2010). Con este mismo programa se realizaron análisis para probar la hipótesis nula de neutralidad en los procesos de mutación para los haplotipos: se estimaron el estadístico de Tajima (D) (Tajima, 1989), la prueba de Fu (Fu) (Fu, 1997) y la prueba de amalgamación de Chakraborty (θ_{Hom}) usada para calcular evidencia de una mezcla de poblaciones (Chakraborty, 1990) y también fueron estimados sus valores de significancia.

Resultados

Coral escleractinio: Pocillopora verrucosa

Los resultados obtenidos (Tabla 4) indican una mayor heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e), y número de alelos para las localidades del Portugués (P) y Cabo Pulmo (CP), seguido de Loreto (L) y por último en el Canal (C) y la Isla (IS).

Se realizó un análisis de diferenciación poblacional (Valor F_{ST}) para las poblaciones del Portugués y Cabo Pulmo (únicas localidades con todos los microsatélites analizados), obteniéndose un F_{ST} significativo de 0.014 ($P=0.009$); donde de la variación genética total solo el 1.4% es debida a la diferencia en las frecuencias alélicas entre poblaciones, y el 98.6% restante se encuentra entre los individuos dentro de cada población. De acuerdo a Hart y Clark, (2007) existen diferencias genéticas bajas (rango 0 a 0.05), moderadas (0.05-0.15) y grandes (0.15-2.5), siendo nuestro resultado una diferencia leve. Este valor refleja la existencia de una migración (Nm) entre las poblaciones, resultando ser de 17.6 individuos/generación.

El valor obtenido de F_{ST} comparado con otro estudio realizado en Sudáfrica (Ridway *et al.*, 2008; Tabla 5), empleando la misma especie (*P. verrucosa*) y algunos microsatélites del presente estudio, demostró un valor de divergencia genética moderado entre las poblaciones del Norte y Sur ($F_{ST} = 0.054$). Esto indica una mayor estructura genética comparada con la encontrada para las poblaciones de Cabo Pulmo-Los Frailes y El Portugués, observándose una migración (Nm) muy baja de 4.3 individuos/generación.

De los seis locus microsatélites analizados en las poblaciones de Cabo Pulmo-Los Frailes y el Portugués, tres resultaron en desequilibrio de Hardy-Weinberg; observándose para el Portugués un déficit y en Cabo Pulmo-Los Frailes un exceso de heterocigotos (Tabla 6).

Al comparar estos resultados de heterocigocidad con otros estudios en Sudáfrica y Polinesia (Magalon *et al.*, 2005; Ridgway *et al.*, 2008) la variabilidad genética reportada en este estudio fue muy superior a la de Sudáfrica e inferior a la de Polinesia.

Tabla 4. Variabilidad genética de seis loci microsatélites para el coral, *Pocillopora verrucosa* en cinco localidades de muestreo.

		L	P	C	IS	CP
PV6	<i>n</i>	16	47	50	43	50
	<i>Ho</i>	0.8750	0.7021	0.3800	1.00	0.9600
	<i>He</i>	0.7842	0.8236	0.43273	0.551	0.8559
	<i>nA</i>	5	10	6	6	10
PV7	<i>n</i>	16	47	50	43	50
	<i>Ho</i>	0.25	0.7021	0.28	0.4883	0.74
	<i>He</i>	0.669	0.7526	0.2539	0.4013	0.7094
	<i>nA</i>	6	8	5	5	8
Pd 2006	<i>n</i>	16	47	50	43	50
	<i>Ho</i>	0.75	0.7446	0.98	0.9767	0.66
	<i>He</i>	0.6794	0.6836	0.6022	0.6432	0.6713
	<i>nA</i>	4	5	3	3	3
Pd3002	<i>n</i>	16	47	50	43	50
	<i>Ho</i>	0.25	0.5106	0.28	0.4883	0.54
	<i>He</i>	0.669	0.6552	0.2539	0.4013	0.55071
	<i>nA</i>	4	5	4	4	6
Pd3005	<i>n</i>	16	47	50	43	50
	<i>Ho</i>	0.5	0.5106	0.90	0.4651	0.44
	<i>He</i>	0.41331	0.4829	0.5913	0.6073	0.4109
	<i>nA</i>	4	5	4	4	7
Pd3008	<i>n</i>	16	47	50	43	50
	<i>Ho</i>	0.25	0.4255	0.28	0.9767	0.28
	<i>He</i>	0.669	0.4724	0.2539	0.6432	0.2854
	<i>nA</i>	4	4	3	4	4

* *n*: tamaño de muestra, *Ho*: Heterocigocidad observada, *He*: Heterocigocidad esperada, *nA*: número total de alelos. * Localidades- L: Loreto, P: Portugués, C: Canal, IS: Isla Espiritu Santo, CP: Cabo Pulmo-Los Frailes.

Tabla 5. Diferenciación Genética Poblacional (Valor F_{ST}).

	Valor F_{ST}	Valor P	Nm	Especie	Sitio
Trabajo actual	0.014	0.009*	17.6	<i>P. verrucosa</i>	Portugués-Cabo Pulmo
Ridgway <i>et al.</i> 2008	0.054	P<0.05	4.3	<i>P. verrucosa</i>	Sudáfrica

* Valor significativo

Tabla 6. Valores de Heterocigocidad observada (H_o) y esperada (H_e), Número de alelos (N_a) para el Portugués (P) y Cabo Pulmo (CP).

Locus	Localidad											
	Portugués (n=47)				Cabo Pulmo (n=50)				Sudáfrica ¹ y Polinesia ²			
	H_o	H_e	N_a	Valor P	H_o	H_e	N_a	Valor P	H_o	H_e	N_a	Valor P
PV6	0.68	0.82	10	0.003**	0.96	0.85	10	0.0054**	0.08 ¹	0.37	14	-
PV7	0.70	0.75	7	0.0002**	0.74	0.70	8	0.00039**	0.10 ¹	0.45	5	-
Pd3005	0.48	0.46	5	0.90	0.44	0.41	7	0.79	0.37 ²	0.45	3	1
Pd3002	0.57	0.67	4	0.011**	0.50	0.55	5	0.20	0.86 ²	0.81	10	0.4
Pd3008	0.42	0.47	4	0.28	0.28	0.28	4	0.168	0.66 ²	0.57	4	0.08
Pd2006	0.78	0.69	5	0.040	0.70	0.68	4	0.005**	0.759 ²	0.70	7	0.032

** Desequilibrio de Hardy-Weinberg; corrección de Bonferroni con valor $p < 0.016$

¹ Ridgway *et al.*, 2008; ² Magalon *et al.*, 2005.

Nuestros resultados de variabilidad genética (Tabla 7) concuerdan con el gradiente genético latitudinal reportado para los corales (Ayre y Hughes, 2004), donde a mayores latitudes menor será la variabilidad genética.

Tabla 7. Comparación de diversidad genética con otras localidades.

	Sudáfrica ¹ <i>P. verrucosa</i> Latitud 27°S	Trabajo Actual Latitud 23°N	Polinesia ² <i>P. meandrina</i> Latitud 17°S	Indonesia ³ <i>P. damicornis</i> Latitud 0°
N_a	5	6.25	12.1	6
H_o	0.297	0.60	0.607	0.665
H_e	0.562	0.62	0.755	0.632

¹En Ridgway *et al.* 2008; ²en Magalon *et al.* 2005; ³ en Starger *et al.*, 2008.

Estrellas de mar: *Phataria unifascialis*

Se obtuvo un fragmento de 566 pb del gen COI para 86 secuencias de buena calidad pertenecientes a cinco localidades del Golfo de California (Tabla 8). El promedio de la composición nucleotídica fue de 28% de A, 24% de G, 25% de C y de 23% T. En total se presentaron 57 transiciones, 12 transversiones, 69 sustituciones, y 65 sitios polimórficos. De las 86 secuencias, 65 fueron secuencias únicas y solamente se observaron seis haplotipos compartidos entre localidades (Tabla 9). El haplotipo más común H_7 estuvo presente en todas las localidades. Se observaron haplotipos únicos en todas las localidades pero Punta Diablo y Los Frailes presentaron el mayor número debido probablemente a la diferencia en el número de muestra. La diversidad nucleotídica total fue de 0.0688 (SD = 0.006) y dentro de las localidades los valores variaron desde 0.0064 hasta 0.0081 (Tabla 10). La diversidad haplotípica para todas las localidades fue alta (Tabla 8).

Tabla 8. Índices de diversidad de las cinco localidades muestreadas de la estrella de mar *Phataria unifascialis*.

N=tamaño de muestra, H=número de haplotipos, S=número de sitios polimórficos, h =diversidad haplotípica, π =diversidad nucleotídica (\pm desviación estándar).

Localidad	Acrónimo	N	H	S	h	π
Bahía Los Ángeles	BLA	10	8	15	0.956 \pm 0.058	0.0071 \pm 0.0044
Punta Diablo	PD	27	26	33	0.997 \pm 0.011	0.0072 \pm 0.0041
Canal San Lorenzo	CSL	12	12	19	1.000 \pm 0.034	0.0078 \pm 0.0046
El Portugués	EP	10	7	12	0.933 \pm 0.062	0.0064 \pm 0.0039
Los Frailes	LF	27	23	37	0.983 \pm 0.017	0.0081 \pm 0.0046
	Total	86	65	65	0.986 \pm 0.006	0.0688 \pm 0.0379

Tanto el árbol (Fig. 6) como la red de haplotipos (Fig. 7) no mostraron una agrupación geográfica de los haplotipos, sugiriendo que es una única población. Ninguno de los valores calculados de F_{ST} entre pares de localidades fue estadísticamente diferente de

cero después de la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples (Tabla 10). El análisis de AMOVA indicó que la variación genética en *P. unifascialis* ocurrió exclusivamente dentro de las localidades (>99.9%) y fue nula entre las localidades (Tabla 10).

Tabla 9. Distribución y frecuencia de los haplotipos de la estrella de mar *Phataria unifascialis* por localidad de muestreo. Los acrónimos son como en la Tabla 8.

Haplotipo/Localidad	BLA	PD	CSL	EP	LF
Hap_1	1	0	0	0	0
Hap_2	1	0	0	0	0
Hap_3	1	0	0	0	0
Hap_4	2	0	0	0	0
Hap_5	2	0	0	0	0
Hap_6	1	0	0	0	0
Hap_7	1	1	1	2	3
Hap_8	1	1	0	0	0
Hap_9	0	1	0	0	0
Hap_10	0	1	0	0	0
Hap_11	0	1	0	0	0
Hap_12	0	1	0	0	0
Hap_13	0	1	0	0	0
Hap_14	0	1	0	0	0
Hap_15	0	1	0	0	0
Hap_16	0	1	0	0	0
Hap_17	0	1	0	0	0
Hap_18	0	1	0	0	0
Hap_19	0	1	1	0	0
Hap_20	0	1	0	0	0
Hap_21	0	1	0	0	0
Hap_22	0	1	0	0	0
Hap_23	0	1	0	0	0
Hap_24	0	1	0	0	0
Hap_25	0	1	0	0	0
Hap_26	0	2	0	1	3
Hap_27	0	1	0	0	0
Hap_28	0	1	0	0	0
Hap_29	0	1	0	0	0

Hap_30	0	1	0	1	0
Hap_31	0	1	0	0	0
Hap_32	0	1	0	0	0
Hap_33	0	0	1	0	0
Hap_34	0	0	1	0	0
Hap_35	0	0	1	0	0
Hap_36	0	0	1	0	0
Hap_37	0	0	1	0	0
Hap_38	0	0	1	0	0
Hap_39	0	0	1	0	0
Hap_40	0	0	1	0	1
Hap_41	0	0	1	0	0
Hap_42	0	0	1	0	1
Hap_43	0	0	0	2	0
Hap_44	0	0	0	2	0
Hap_45	0	0	0	1	0
Hap_46	0	0	0	1	0
Hap_47	0	0	0	0	1
Hap_48	0	0	0	0	1
Hap_49	0	0	0	0	1
Hap_50	0	0	0	0	1
Hap_51	0	0	0	0	1
Hap_52	0	0	0	0	1
Hap_53	0	0	0	0	1
Hap_54	0	0	0	0	1
Hap_55	0	0	0	0	1
Hap_56	0	0	0	0	1
Hap_57	0	0	0	0	1
Hap_58	0	0	0	0	1
Hap_59	0	0	0	0	1
Hap_60	0	0	0	0	1
Hap_61	0	0	0	0	1
Hap_62	0	0	0	0	1
Hap_63	0	0	0	0	1
Hap_64	0	0	0	0	1
Hap_65	0	0	0	0	1

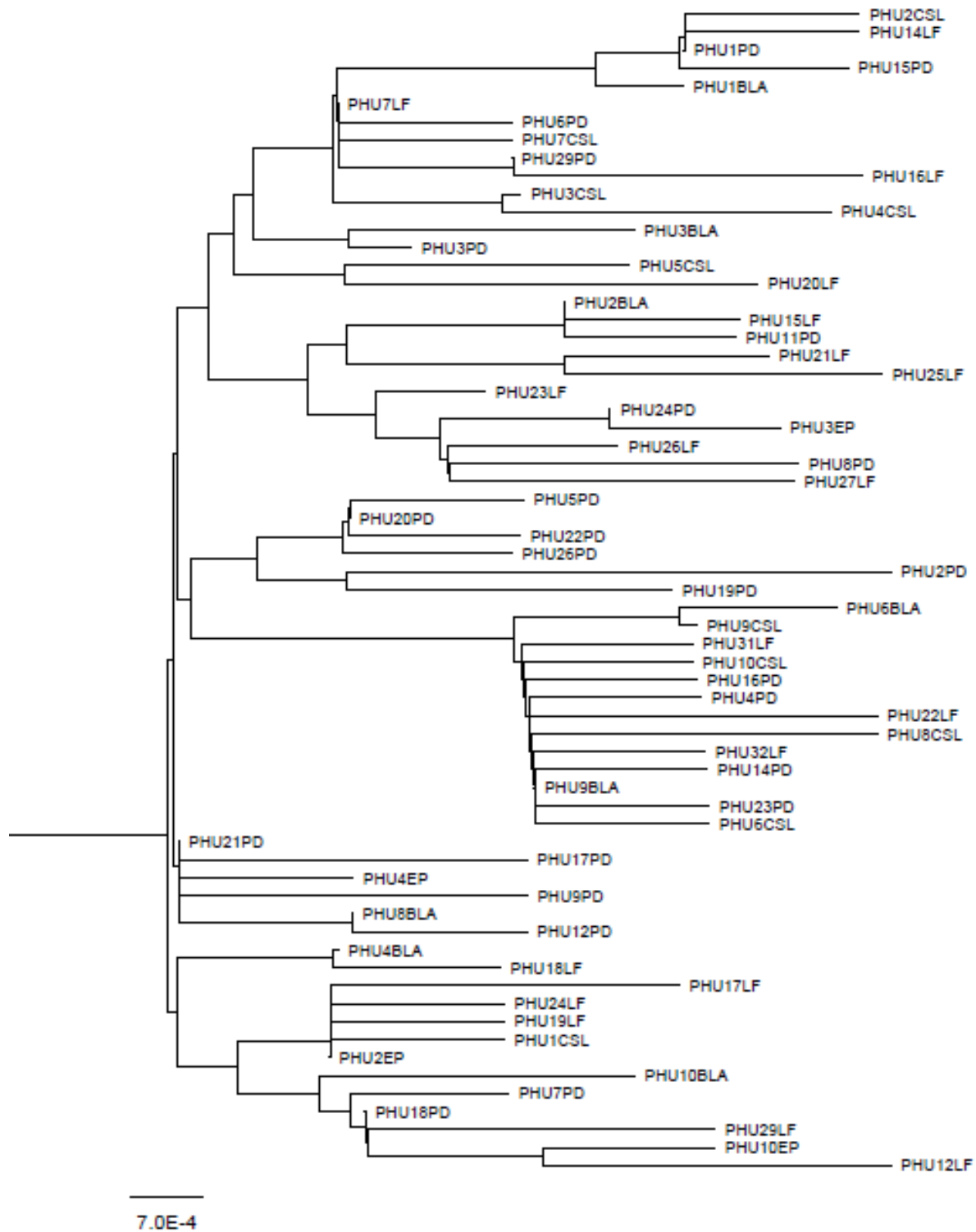


Figura 6. Reconstrucción filogenética por medio del vecino más cercano de *Phataria unifascialis*.

Acrónimos de las localidades como en la Tabla 8.

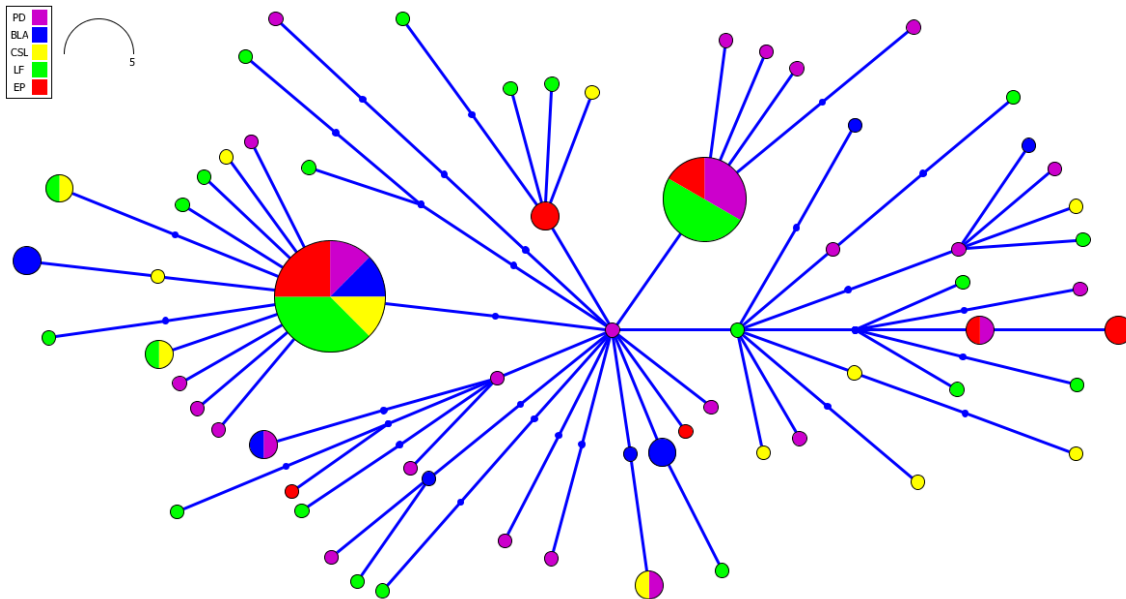


Figura 7. Red de haplotipos de *Phataria unifascialis* para las cinco localidades de muestreo. Acrónimos de las localidades como en la Tabla 8.

Tabla 10. Comparaciones pareadas de F_{ST} (bajo la diagonal) y de los valores de P asociados (arriba de la diagonal) entre las cinco localidades de *P. unifascialis*.

	BLA	PD	CSL	EP	LF
BLA	0	0.528	0.424	0.401	0.849
PD	-0.005	0	0.073	0.722	0.561
CSL	-0.003	0.033	0	0.184	0.435
EP	0.009	-0.017	0.030	0	0.5435
LF	-0.022	-0.004	-0.002	-0.008	0

Tabla 11. Análisis de variancia molecular de las cinco localidades muestreadas de *P. unifascialis*.

Estructura	Fuente de variación	Componente de la varianza	Porcentaje de variación	Índice fijación	P
Todas las localidades	Entre poblaciones	-0.00204	-0.09		
	Dentro de las poblaciones	2.236	100.09	-0.001	0.477

Las pruebas de neutralidad resultaron estadísticamente significativas con ambos índices para las localidades de Punta Diablo y Los Frailes, lo que sugiere que pueden haber sufrido un proceso de expansión poblacional reciente (Tabla 12). El flujo genético fue alto para todas las comparaciones con un valor mínimo de 15 migrantes por generación llegando a infinito entre el resto de las localidades (Tabla 13).

Tabla 12. Pruebas de neutralidad de Tajima (*D*) y Fu (*F_s*) y el valor de probabilidad (*P*) asociado en las cinco localidades de *Phataria unifascialis*.

	D	P	F_s	P
BLA	-0.8996	0.1969	-2.4369	0.0651
PD	-1.8515	0.0153	-25.7583	0
CSL	-1.1303	0.1298	-8.5666	0.00003
EP	-0.4468	0.3469	-1.40218	0.1735
LF	-1.8399	0.0156	-18.2302	0

Tabla 13. Número de migrantes entre las cinco localidades de *Phataria unifascialis*.

	BLA	PD	CSL	EP	LF
BLA	*				
PD	∞	*			
CSL	∞	15	*		
EP	57	∞	16	*	
LF	∞	∞	∞	∞	*

Estrellas de mar: *Pharia pyramidata*

Se obtuvo un fragmento de 574 pb del gen COI para 32 secuencias de buena calidad pertenecientes a tres localidades del Golfo de California (Tabla 14). El promedio de la composición nucleotídica fue de 26% de A, 20% de G, 21% de C y de 33% T. En total se presentaron 32 transiciones, 22 transversiones, 34 sustituciones, y 34 sitios polimórficos. De las 32 secuencias, 23 fueron secuencias únicas y solamente se observaron tres haplotipos compartidos entre localidades (Tabla 15). El haplotipo más común H_1, estuvo presente en todas las localidades. Se observaron haplotipos únicos en todas las localidades pero Punta Diablo presentó el mayor número debido, probablemente, a la diferencia en el número de muestra. La diversidad nucleotídica total fue de 0.0054 (SD = 0.006) y dentro de las localidades los valores variaron desde 0.0064 hasta 0.0032 (Tabla 14). La diversidad haplotípica para todas las localidades fue alta (Tabla 14).

Tabla 14. Índices de diversidad de las tres localidades muestreadas de la estrella de mar *Pharia pyramidata*. N=tamaño de muestra, H=número de haplotipos, S=número de sitios polimórficos, *h*=diversidad haplotípica, π =diversidad nucleotídica (\pm desviación estándar).

Localidad	Acrónimo	N	H	S	<i>h</i>	π
Bahía Los Ángeles	BLA	7	6	9	0.952 \pm 0.096	0.0051 \pm 0.003
Punta Diablo	PD	14	13	22	0.989 \pm 0.031	0.0067 \pm 0.004
Canal San Lorenzo	CSL	11	8	10	0.927 \pm 0.067	0.0040 \pm 0.003
	Total	32	23	34	0.949 \pm 0.029	0.0054 \pm 0.003

Tabla 15. Distribución y frecuencia de los haplotipos de la estrella de mar *Pharia pyramidata* por localidad de muestreo. Los acrónimos son como en la Tabla 14.

Haplotipo/Localidad	BLA	PD	CSL
Hap_1	2	2	3
Hap_2	1	0	0
Hap_3	1	0	0
Hap_4	1	0	2
Hap_5	1	0	0
Hap_6	1	0	0
Hap_7	0	1	0
Hap_8	0	1	0
Hap_9	0	1	0
Hap_10	0	1	0
Hap_11	0	1	0
Hap_12	0	1	0
Hap_13	0	1	0
Hap_14	0	1	0
Hap_15	0	1	0
Hap_16	0	1	1
Hap_17	0	1	0
Hap_18	0	1	0
Hap_19	0	0	1
Hap_20	0	0	1
Hap_21	0	0	1
Hap_22	0	0	1
Hap_23	0	0	1

Tanto el árbol (Fig. 8) como la red de haplotipos (Fig. 9) no mostraron una agrupación geográfica de los haplotipos, sugiriendo que es una única población.

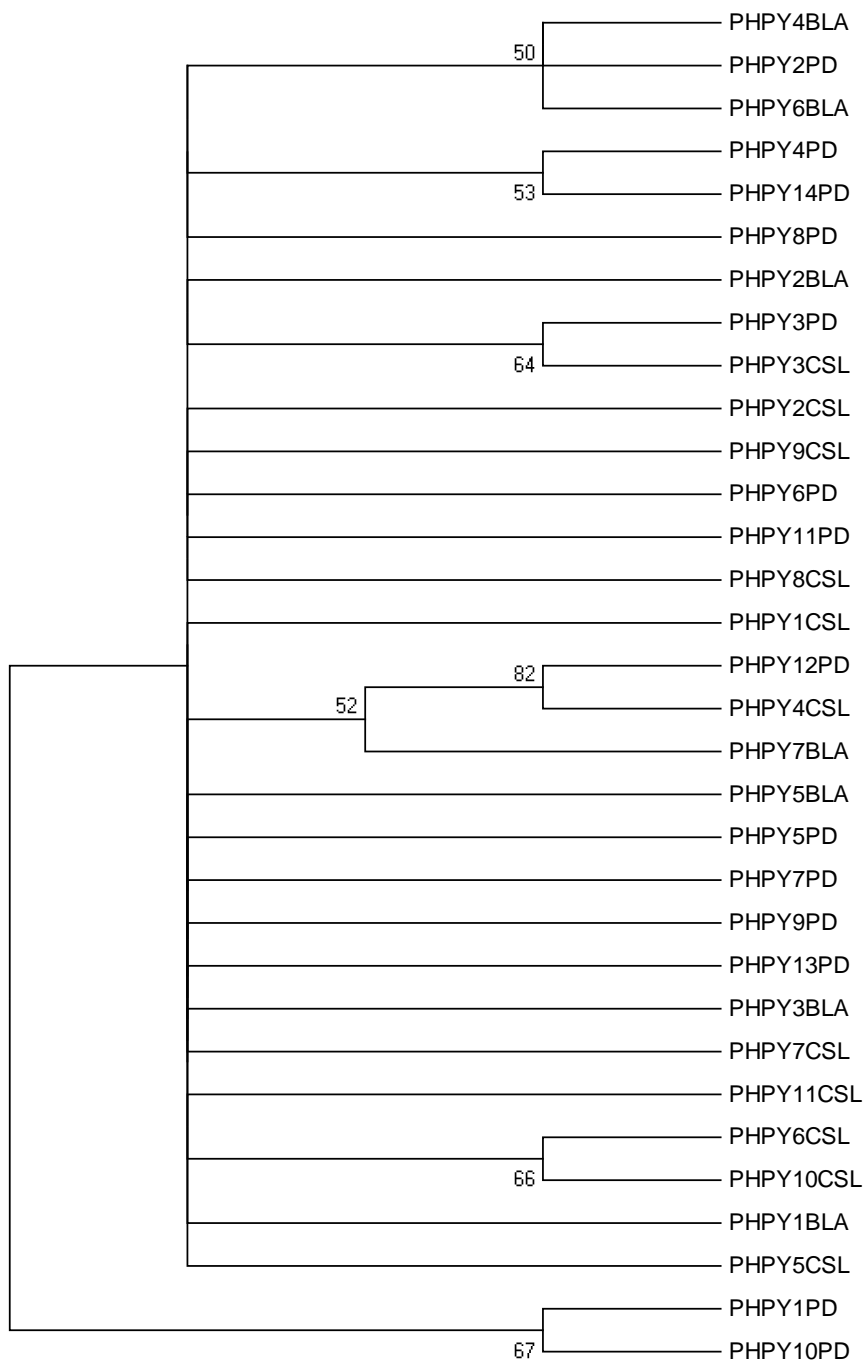


Figura 8. Reconstrucción filogenética por medio del vecino más cercano de *Pharia pyramidata*. Acrónimos de las localidades como en la Tabla 14.

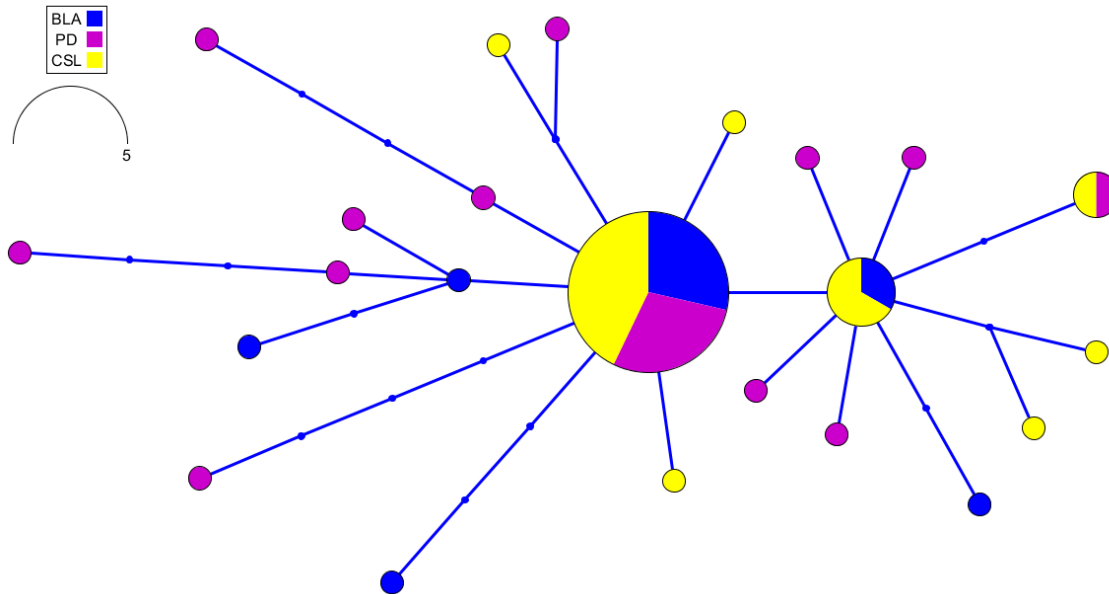


Figura 9. Red de haplotipos de *Pharia pyramidata* para las tres localidades de muestreo en el Golfo de California. Acrónimos de las localidades como en la Tabla 14.

Ninguno de los valores calculados de F_{ST} entre pares de localidades fue estadísticamente diferente de cero después de la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples (Tabla 16). El análisis de AMOVA indicó que la variación genética en *P. pyramidata* ocurrió exclusivamente dentro de las localidades (>99.9%) y fue nula entre las localidades (Tabla 17).

Tabla 16. Comparaciones pareadas de F_{ST} (bajo la diagonal) y de los valores de P asociados (arriba de la diagonal) entre las tres localidades de *Pharia pyramidata*.

	BLA	PD	CSL
BLA	0	0.885	0.669
PD	-0.02941	0	0.326
CSL	-0.01151	0.010	0

Las pruebas de neutralidad resultaron estadísticamente significativas con el índice de F_u para las tres localidades y para Punta Diablo con la D de Tajima, lo que sugiere que pueden haber sufrido un proceso de expansión poblacional reciente (Tabla 18). El flujo genético fue alto para todas las comparaciones con un valor mínimo de 50 migrantes por generación llegando a infinito entre el resto de las localidades (Tabla 19).

Tabla 17. Análisis de variancia molecular de las tres localidades muestreadas de *Pharia pyramidata*.

Estructura	Fuente de variación	de Componente de la varianza	Porcentaje de variación	Índice fijación	P
Todas las localidades	Entre poblaciones	-0.021	-1.34		
	Dentro de las poblaciones	1.571	101.34	-0.013	0.724

Tabla 18. Pruebas de neutralidad de Tajima (D) y F_u (F_s) y el valor de probabilidad (P) de las tres localidades muestreadas de *Pharia pyramidata*.

	D	P	F_s	P
BLA	-1.0433	0.177	-2.2755	0.044
PD	-1.8625	0.018	-9.3800	0.00004
CSL	-1.3552	0.092	-3.8923	0.0052

Tabla 19. Número de migrantes entre las tres localidades muestreadas de *Pharia pyramidata*.

	BLA	PD	CSL
BLA	*		
PD	∞	*	
CSL	∞	50	*

Peces: *Cirrhichthys oxycephalus*

Se secuenciaron 84 organismos de un total de siete localidades del Golfo de California para la región control de ADN mitocondrial de un tamaño de 766 pares de bases. El promedio de la composición nucleotídica fue de 31% de A, 18% de G, 23% de C y de 28% T. Se presentaron en las secuencias 117 transiciones, 50 transversiones, 167 sustituciones, y con 140 sitios variables. De las 84 secuencias, 81 fueron secuencias únicas y solamente se observaron dos haplotipos repetidos (Tabla 20). La localidad de San Gabriel y Áreas Secundaria compartieron un mismo haplotipo, así como el Área Secundaria compartió un haplotipo igual con Punta Diablo (Tabla 20). La diversidad nucleotídica total fue de 0.032 (SD = 0.015) y dentro de las localidades los valores variaron desde 0.028 hasta 0.034 (Tabla 21). Los haplotipos prácticamente fueron únicos, ya que solamente se presentaron dos haplotipos repetidos. Del total de sitios variables en las secuencias, la localidad de Loreto fue la que presentó un mayor número de sitios variables con 92, mientras que la localidad con menor número fue Punta Diablo con 57 (Tabla 21). La diversidad haplotípica para la todas las localidades fue alta (Tabla 21). El análisis de AMOVA indicó que la variación genética en *C. oxycephalus* ocurrió exclusivamente dentro de las localidades (>99.9%) y fue nula entre las localidades. No se detectaron diferencias genéticas significativas entre las localidades pero el poder del análisis fue bajo (12.49%) debido quizás a un tamaño de muestra pequeño de las localidades (Tabla 22). Ninguno de los valores calculados de Φ_{ST} entre pares de localidades fue estadísticamente diferente de cero después de la corrección de Bonferroni para pruebas múltiples (Tabla 23). Un resultado no significativo de la prueba de neutralidad de Tajima (D) total para todas las localidades juntas (D = -0.382, y P = 0.414), sugiere que la selección puede no estar afectando la región control de *C. oxycephalus*, pero también puede indicar que la población ha pasado por una rápida expansión de tamaño poblacional o por un cuello de botella al tener un valor negativo (Tabla 24). La prueba de Fu no mostró valores significativos de F_s para las localidades, ni tampoco se observó para todas juntas. El flujo genético entre localidades fue alto para todas las

comparaciones con un valor mínimo de 8 migrantes por generación y llegando hasta infinito entre otras (Tabla 25).

Tabla 20. Distribución de los haplotipos del halcón de coral, *Cirrhitichthys oxycephalus* en las siete localidades analizadas.

Loreto= Lo; El Portugués= Po; San Gabriel= Ga; Módulos= Mo; Área Secundaria= Se; Punta Diablo= Di; y Ensenada de Muertos= En.

Haplotipo	Lo	Po	Ga	Mo	Se	Di	En
Co001	1						
Co003	1						
Co004	1						
Co005	1						
Co006	1						
Co007	1						
Co008	1						
Co009	1						
Co010	1						
Co011	1						
Co012	1						
Co013	1						
Co014	1						
Co015	1						
Co017	1						
Co035		1					
Co036		1					
Co037		1					
Co051		1					
Co052		1					
Co053		1					
Co072		1					
Co073		1					
Co074		1					
Co075		1					
Co002			1				
Co038			1				
Co039			1				
Co040			1				

Co041	1		1	
Co048	1			
Co049	1			
Co050	1			
Co076	1			
Co077	1			
Co078	1			
Co079	1			
Co080	1			
Co018		1		
Co019		1		
Co020		1		
Co021		1		
Co022		1		
Co023		1		
Co042		1		
Co043		1		
Co061		1		
Co062		1		
Co063		1		
Co065		1		
Co066		1		
Co067		1		
Co068		1		
Co069		1		
Co024			1	1
Co028			1	
Co029			1	
Co032			1	
Co034			1	
Co056			1	
Co057			1	
Co058			1	
Co059			1	
Co044				1
Co045				1
Co046				1
Co047				1
Co054				1
Co055				1

Co071						1	
Co212							1
Co213							1
Co214							1
Co215							1
Co216							1
Co217							1
Co218							1
Co219							1
Co220							1
Co224							1
Co225							1
Co226							1
Total	15	10	13	16	10	8	12

Tabla 21. Estadística descriptiva de las siete localidades muestreadas de *C. oxycephalus*. n = Tamaño de muestra, No. Hapl. = Número de haplotipos, S = No. de sitios polimórficos, Hesp = Diversidad genética (\pm d. e.) (Nei, 1987).

Localidades	n	No. Hapl.	S	H_{esp}
Loreto= Lo	15	15	92	1,00 (\pm 0,06)
El Portuques= Po	10	10	63	1,00 (\pm 0,04)
San Gabriel= Ga	13	13	75	1,00 (\pm 0,03)
Módulos= Mo	16	16	86	1,00 (\pm 0,02)
Área Secundaria= Se	10	10	75	1,00 (\pm 0,04)
Punta Diablo= Di	8	8	57	1,00 (\pm 0,06)
Ensenada de Muertos= En	12	13	76	1,00 (\pm 0,03)
Total	84	82	140	1,00 (\pm 0,03)

Tabla 22. Comparaciones pareadas de F_{ST} (bajo la diagonal) y de los valores de P asociados (arriba de la diagonal) entre las siete localidades de *C. oxycephalus*. Loreto= Lo, El Portugués= Po, San Gabriel= Ga, Módulos= Mo, Área Secundaria= Se, Punta Diablo= Di y Ensenada de Muertos= En. *valores significativos con $P < 0,001$ (después de la corrección de Bonferroni).

	Lo	Po	Ga	Mo	Se	Di	En
Lo		0.2443	0.6590	0.8991	0.6887	0.1038	0.3851
Po	0.0232		0.9014	0.5797	0.3695	0.3397	0.3074
Ga	-0.0187	-0.0542		0.9920	0.7329	0.4233	0.4437
Mo	-0.0300	-0.0169	-0.0505		0.8257	0.2099	0.3855
Se	-0.0222	0.0052	-0.0318	-0.0326		0.5888	0.381
Di	0.5555	0.0124	-0.0016	0.0281	-0.0226		0.0938
En	0.0027	0.0119	-0.0125	0.0024	0.0046	0.0527	

Tabla 23. Resultados de las pruebas de neutralidad de Tajima (D), de Fu (F_s) y de Chakraborty (θ_{Hom}) para las siete localidades de *C. oxycephalus*.

Localidad	D	P	θ_{Hom}
Lo	-0.460	0.359	<i>n.d.</i>
Po	0.697	0.766	<i>n.d.</i>
Ga	0.463	0.731	<i>n.d.</i>
Mo	-0.005	0.553	<i>n.d.</i>
Se	-0.082	0.508	<i>n.d.</i>
Di	0.196	0.612	<i>n.d.</i>
En	-0.578	0.298	<i>n.d.</i>
Todas las localidades	-0.382	0.414	<i>n.d.</i>

n.d. = La prueba de neutralidad de Chakraborty (θ_{Hom}) no está disponible en el programa Arlequin porque todas secuencias son diferentes. Loreto= Lo, El Portuques= Po, San Gabriel= Ga, Módulos= Mo, Área Secundaria= Se, Punta Diablo= Di y Ensenada de Muertos= En.

Tabla 24. Número de migrantes entre las siete localidades de *C. oxycephalus*.

	Lo	Po	Ga	Mo	Se	Di	En
Lo							
Po	21						
Ga	inf.	inf.					
Mo	inf.	inf.	inf.				
Se	inf.	94	inf.	inf.			
Di	8	39	inf.	17	inf.		
En	181	41	inf.	206	106	8	

inf = Infinto. Loreto= Lo, El Portuques= Po, San Gabriel= Ga, Módulos= Mo, Área Secundaria= Se, Punta Diablo= Di y Ensenada de Muertos= En.

Peces: *Stegastes rectifraenum*

Distancia genética entre *Stegastes rectifraenum* y *Stegastes flavilatus*

El número promedio de sustituciones por sitio entre los pares de secuencias para los sitios Bahía concepción (Bahía de los Ángeles y Bahía Magdalena) corresponden a valores cercanos. Sin embargo, las distancias genéticas de las muestras de Ixtapa-Zihuatanejo con el resto de los sitios son de casi dos órdenes de magnitud. La Tabla 26 también indica que la distancia genética entre los individuos de Ixtapa-Zihuatanejo (*S. flavilatus*) es mayor con los individuos de *S. rectifraenum* situados fuera del Golfo (B. Magdalena) que con aquellos dentro del Golfo de California (*S. rectifraenum*).

Tabla 25. Distancias genéticas (\pm error estándar) estimadas utilizando el marcador mitocondrial Región Control, entre localidades con *Stegastes rectifraenum* (Bahía Concepción, Bahía de Los Ángeles y Bahía Magdalena) y *Stegastes flavilatus* (Ixtapa-Zihuatanejo).

Localidad	Bahía Concepción	Bahía de Los Ángeles	Bahía Magdalena	Ixtapa-Zihuatanejo
Bahía Concepción				
Bahía de Los Ángeles	0.021 (\pm 0.005)			
Bahía Magdalena	0.022 (\pm 0.005)	0.015 (\pm 0.004)		
Ixtapa-Zihuatanejo	1.214 (\pm 0.387)	1.240 (\pm 0.420)	1.313 (\pm 0.455)	

Una situación similar ocurre utilizando el gen CO1 (Tabla 27), donde las distancias genéticas entre las localidades con individuos de *S. rectifraenum* son parecidas y cercanas a cero. En contraste, las muestras de Ixtapa-Zihuatanejo (*S. flavilatus*) tienen distancias genéticas casi dos órdenes de magnitud mayor con las localidades con presencia de *S. rectifraenum*. Hacemos notar que no se encontraron secuencias de CO1 de ambas especies en el sitio de FishBol.

Tabla 26. Distancias genéticas (\pm error estándar) estimadas utilizando el marcador mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad 1 (CO1) entre localidades con *Stegastes rectifraenum* (Bahía Concepción, Bahía de Los Ángeles y Bahía Magdalena) y *Stegastes flavilatus* (Ixtapa-Zihuatanejo).

Localidades	Bahía Concepción	Bahía de Los Ángeles	Bahía Magdalena	Ixtapa-Zihuatanejo
Bahía Concepción				
Bahía de Los Ángeles	0.001 (\pm 0.001)			
Bahía Magdalena	0.002 (\pm 0.001)	0.001 (\pm 0.001)		
Ixtapa-Zihuatanejo	0.125 (\pm 0.017)	0.124 (\pm 0.017)	0.123 (\pm 0.017)	

Se concluye que las muestras de Ixtapa-Zihuatanejo son, tal como las identificó el curador de la Colección Ictiológica del CIBNOR, una especie diferente: *S. flavilatus*. Por lo tanto para los análisis posteriores ya no fueron utilizadas estas muestras. Además de las 53 secuencias obtenidas, se añadieron otras 83 (ver archivo Excel) procedentes de la región central (Bahía Concepción= 32) y Alto Golfo de California y (Bahía de Los Ángeles= 23), además de muestras de la costa occidental de Baja California Sur, fuera del Golfo de California (Bahía Magdalena= 29). Debido a que las muestras del Área Primaria (módulos) y Secundaria presentaron gran similitud y forman un mismo grupo, se decidió agruparlas (como Canal San Lorenzo= 13 secuencias) para este análisis de mayor cobertura espacial (pasamos de cerca de 300 km a cerca de 1000 km), dando así mayor robustez a los análisis. De las 137 secuencias, 97 fueron secuencias únicas y solamente se observaron 8 haplotipos repetidos una vez y 8 repetidos tres veces (Tabla 28). En general la diversidad haplotípica fue de uno (Tabla 29), es decir, la probabilidad de escoger al azar dentro de la misma población dos haplotipos diferentes es del 100%. La diversidad nucleotídica, por localidad variaron desde 0.012 hasta 0.019 (Tabla 30), lo que implica que la probabilidad de encontrar diferencias al comparar haplotipos de la misma población es cercana a cero. Hay una variación latitudinal de la diversidad nucleotídica en domo,

aumentando hacia las latitudes medias dentro del Golfo de California, y también si incluimos el valor de Bahía Magdalena fuera del Golfo.

El análisis de variancia molecular (AMOVA) indicó que la variación genética se da en mayor proporción dentro de las localidades (76.06%) que entre ellas (23.94%) (Tabla 30). Los valores calculados de Φ_{ST} y los valores de probabilidad asociados entre pares de localidades muestran claramente la presencia de dos grupos, uno que asocia las localidades del sur del Golfo de California (Isla San José, Canal San Lorenzo, Ensenada de Muertos y Los Frailes) y otro que reúne a las localidades del norte del Golfo de California (bahías de Los Ángeles y Concepción) y a Bahía Magdalena (Tabla 31). Las localidades del sur son significativamente diferentes ($p < 0.002$) de las norteñas (incluida B. Magdalena), pero no significativamente diferentes entre sí ($p > 0.002$).

Tabla 27. Descripción de los haplotipos de *S. rectifraenum* en las siete localidades muestreadas. Jo= Isla San José; Lo= Canal San Lorenzo (módulos y área secundaria); En= Ensenada de Muertos; Fr= Los Frailes; Co= Bahía Concepción; An= Bahía de Los Ángeles; Ma= Bahía Magdalena.

Haplotipo	Jo	Lo	En	Fr	Co	An	Ma	Haplotipo	Jo	Lo	En	Fr	Co	An	Ma
Hap 1	2	1	0	0	0	0	0	Hap 36	0	0	1	0	0	0	0
hap 2	1	0	0	0	0	0	0	Hap 37	0	0	1	0	0	0	0
hap 3	1	0	0	0	0	0	0	Hap 38	0	0	0	1	0	0	0
Hap 4	1	1	1	0	0	0	0	Hap 39	0	0	0	1	0	0	0
Hap 5	1	0	0	0	0	0	0	Hap 40	0	0	0	1	0	0	0
Hap 6	1	0	0	0	0	0	0	Hap 41	0	0	0	1	0	0	0
Hap 7	1	0	0	0	0	0	0	Hap 42	0	0	0	1	0	0	0
Hap 8	1	0	0	0	0	0	0	Hap 43	0	0	0	1	0	0	0
Hap 9	1	0	1	0	0	0	0	Hap 44	0	0	0	1	0	0	0
Hap 10	1	0	0	0	0	0	0	Hap 45	0	0	0	0	1	0	0
Hap 11	1	0	0	0	0	0	0	Hap 46	0	0	0	0	1	0	0
Hap 12	1	0	0	0	0	0	0	Hap 47	0	0	0	0	1	0	0
Hap 13	1	0	0	0	0	0	0	Hap 48	0	0	0	0	1	1	0
Hap 14	1	0	0	0	0	0	0	Hap 49	0	0	0	0	2	0	1
Hap 15	1	0	0	1	0	0	0	Hap 50	0	0	0	0	2	0	0
Hap 16	1	0	0	0	0	0	0	Hap 51	0	0	0	0	1	0	0
Hap 17	0	1	0	0	0	0	0	Hap 52	0	0	0	0	1	0	0
Hap 18	0	1	0	0	0	0	0	Hap 53	0	0	0	0	1	0	0
Hap 19	0	1	0	0	0	0	0	Hap 54	0	0	0	0	1	0	0
Hap 20	0	1	0	0	0	0	0	Hap 55	0	0	0	0	1	0	0
Hap 21	0	1	1	1	0	0	0	Hap 56	0	0	0	0	1	0	0
Hap 22	0	1	0	0	0	0	0	Hap 57	0	0	0	0	1	0	1
Hap 23	0	1	1	0	0	0	0	Hap 58	0	0	0	0	1	0	0
Hap 24	0	1	0	0	0	0	0	Hap 59	0	0	0	0	1	0	0
Hap 25	0	1	0	0	0	0	0	Hap 60	0	0	0	0	1	0	0
Hap 26	0	1	0	0	0	0	0	Hap 61	0	0	0	0	1	0	0
Hap 27	0	1	0	0	0	0	0	Hap 62	0	0	0	0	1	0	0
Hap 28	0	0	1	0	0	0	0	Hap 63	0	0	0	0	1	0	0
Hap 29	0	0	1	0	0	0	0	Hap 64	0	0	0	0	2	1	0
Hap 30	0	0	1	0	0	0	0	Hap 65	0	0	0	0	1	1	1
Hap 31	0	0	1	0	0	0	0	Hap 66	0	0	0	0	1	1	1
Hap 32	0	0	1	0	0	0	0	Hap 67	0	0	0	0	1	0	0
Hap 33	0	0	1	0	0	0	0	Hap 68	0	0	0	0	1	0	0
Hap 34	0	0	1	0	0	0	0	Hap 69	0	0	0	0	1	0	0
Hap 35	0	0	1	0	0	0	0	Hap 70	0	0	0	0	1	0	0

Haplotipo	Jo	Lo	En	Fr	Co	An	Ma
Hap 71	0	0	0	0	1	0	0
Hap 72	0	0	0	0	1	0	0
Hap 73	0	0	0	0	1	0	1
Hap 74	0	0	0	0	0	1	0
Hap 75	0	0	0	0	0	1	0
Hap 76	0	0	0	0	0	1	0
Hap 77	0	0	0	0	0	1	0
Hap 78	0	0	0	0	0	1	0
Hap 79	0	0	0	0	0	1	0
Hap 80	0	0	0	0	0	1	0
Hap 81	0	0	0	0	0	1	0
Hap 82	0	0	0	0	0	1	0
Hap 83	0	0	0	0	0	1	2
Hap 84	0	0	0	0	0	1	0
Hap 85	0	0	0	0	0	1	0
Hap 86	0	0	0	0	0	1	0
Hap 87	0	0	0	0	0	1	0
Hap 88	0	0	0	0	0	1	0
Hap 89	0	0	0	0	0	1	0
Hap 90	0	0	0	0	0	1	0
Hap 91	0	0	0	0	0	1	0
Hap 92	0	0	0	0	0	1	0
Hap 93	0	0	0	0	0	0	1
Hap 94	0	0	0	0	0	0	1
Hap 95	0	0	0	0	0	0	1
Hap 96	0	0	0	0	0	0	1
Hap 97	0	0	0	0	0	0	1
Hap 98	0	0	0	0	0	0	1
Hap 99	0	0	0	0	0	0	2
Hap 100	0	0	0	0	0	0	1
Hap 101	0	0	0	0	0	0	1
Hap 102	0	0	0	0	0	0	1
Hap 103	0	0	0	0	0	0	1
Hap 104	0	0	0	0	0	0	1
Hap 105	0	0	0	0	0	0	1
Hap 106	0	0	0	0	0	0	1
Hap 107	0	0	0	0	0	0	1
Hap 108	0	0	0	0	0	0	1
Hap 109	0	0	0	0	0	0	1
Hap 110	0	0	0	0	0	0	1
Hap 111	0	0	0	0	0	0	1
Hap 112	0	0	0	0	0	0	1
Hap 113	0	0	0	0	0	0	1
Total	17	13	12	2	0	0	0

Tabla 28. Estadística descriptiva para las siete localidades de *S. rectifraenum*.

Localidades	n	H	S	$H_{exp} \pm S.D.$	$\pi \pm S.D.$
Bahía de Los Ángeles= An	23	23	34	1.000 ± 0.013	0.012 ± 0.007
Bahía Concepción= Co	32	29	41	0.994 ± 0.010	0.015 ± 0.008
Bahía Magdalena= Ma	29	27	52	0.995 ± 0.011	0.017 ± 0.009
Ensenada de Muertos= En	14	14	25	1.000 ± 0.027	0.014 ± 0.008
Los Frailes= Fr	9	9	20	1.000 ± 0.052	0.015 ± 0.009
Canal San Lorenzo= Lo	13	13	31	1.000 ± 0.030	0.016 ± 0.009
Isla San José= Jo	17	16	37	0.993 ± 0.023	0.019 ± 0.010
Total	53	52	113		

n = Tamaño de muestra, H= Número de haplotipos, S = No. de sitios polimórficos,
 H_{exp} = Diversidad genética (± d. e.) (Nei, 1987), π = Diversidad nucleotídica (± d. e.) (Nei, 1987).

Tabla 29. Análisis de variancia molecular (AMOVA) para las siete localidades de *S. rectifraenum*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Varianza de los componentes	Porcentaje de variación	Índices de fijación
Entre poblaciones	6	159.507	1.19733	23.94	0.23944
Dentro de las poblaciones	130	494.419	3.80323	76.06	
Total	136	653.927	5.00056		

Tabla 30. Comparaciones pareadas de F_{ST} (bajo la diagonal) y de los valores de P asociados (arriba de la diagonal) entre las siete localidades de *S. rectifraenum*.

Localidad	Jo	Lo	En	Fr	Co	An	Ma
Jo	-	0.872	0.195	0.725	0.000	0.000	0.000
Lo	-0.027	-	0.544	0.987	0.000	0.000	0.000
En	0.019	-0.008	-	0.161	0.000	0.000	0.000
Fr	-0.022	-0.056	0.029	-	0.000	0.000	0.000
Co	0.334	0.367	0.393	0.369	-	0.923	0.726
An	0.349	0.398	0.426	0.414	-0.016	-	0.711
Ma	0.303	0.332	0.366	0.33	-0.008	-0.008	-
Valor de significancia con corrección de Bonferroni $p < 0.002$.							
Isla San José= Jo, Módulos= Mo, Área Secundaria= Se, Ensenada de Muertos= En, Los Frailes= Fr, Bahía Concepción= Co, Bahía de los Angeles= An, Bahía Magdalena= Ma.							

Un resultado significativo de la prueba de neutralidad de Tajima (D_T), como se registró en las tres localidades norteñas y solo en el Canal San Lorenzo entre las localidades sureñas (Tabla 32), sugiere que la selección puede estar afectando la región control de *S. rectifraenum*, pero su valor negativo, como ocurrió en todas ellas, también puede indicar que la población ha experimentado un cuello de botella o una rápida expansión de tamaño poblacional. Los valores de las otras pruebas, como la de Fu (F_s) y la de Onzin Rozas también fueron significativas pero para todas las localidades (Tabla 32).

Tabla 31. Resultados de las pruebas de neutralidad de Tajima (D), de Fu (F_s), de Chakraborty (θ_{Hom}), de Onzin y Rozas (R_2) para las siete localidades de *S. rectifraenum*.

Localidad	n	H	D_T	P	θ_{Hom}	F_s	P	R_2	P
An	23	23	-1.824*	0.019	N.d.	-21.811*	0	0.048*	0
Co	32	29	-1.629*	0.029	0.006	-21.376*	0	0.054*	0.002
En	14	14	-1.459	0.063	N.d.	-10.193*	0	0.067*	0.001
Fr	9	9	-0.927	0.195	N.d.	-4.050*	0.012	0.092*	0.008
Lo	13	13	-1.642*	0.044	N.d.	-7.602*	0.001	0.066*	0.001
Jo	17	16	-1.396	0.067	0.007	-7.636*	0.002	0.073*	0.004
Ma	29	27	-1.981*	0.007	0.005	-19.639*	0	0.046*	0

n.d. = Prueba de neutralidad de Chakraborty (θ_{Hom}) no disponible en el programa Arlequin si todas las secuencias son diferentes. n= No. de haplotipos; H= No. de haplotipos diferentes; D_T = prueba de Tajima y su probabilidad; θ_{Hom} = prueba Chakraborty; F_s = prueba de Fu y su probabilidad (P); R_2 = prueba de Onzin y Rozas y su probabilidad (P). * $P < 0.05$.

Peces: Canthigaster punctatissima

Se realizaron pruebas de optimización del proceso de extracción de ADN y de amplificación de dos genes mitocondriales con 10 organismos de Punta Diablo. Las 10 muestras enviadas a secuenciar para COI fueron exitosas. De acuerdo con el BOLD System, el porcentaje de similitud con las secuencias de *Canthigaster punctatissima* ahí registradas fue del 98%. En cuanto a la Región Control, todas las muestras amplificaron bien, pero solamente salieron bien siete secuencias, de las cuales 6 son haplotipos diferentes.

Discusión

Existe un gradiente latitudinal en la diversidad genética, donde a mayores latitudes esta es menor cuando se observó con el número total y efectivo de alelos. Se presentaron clones en todos los sitios, siendo los sitios más dominados el arrecife San Lorenzo (Ng/N:0.1 y Go/Ng/Go:0.353) y San Gabriel en la Isla Espíritu Santo (Ng/N:0.12 y Go/Ng/Go:0.45), con un dominio de la reproducción asexual por fragmentación. No hubo diferencias en las frecuencias alélicas (FST) cuando se toma en cuenta solo a los genotipos únicos de cada población con la corrección de Bonferoni, lo cual es indicativo de una alta conectividad entre las poblaciones. Al realizar el análisis FSt con todos los genotipos sí existen diferencias muy significativas entre las poblaciones donde las únicas poblaciones no diferentes son Loreto y el Portugués, y esto está asociado fuertemente a la alta clonalidad y a que los sitios no comparten genotipos. Esto lleva a concluir que no existen diferencias genéticas entre los sitios pero si en su modo de reproducción, donde los sitios de Loreto, el Portugués y Cabo Pulmo-Los Frailes tienen un modo de reproducción dominado por la reproducción sexual, a comparación del arrecife San Lorenzo y San Gabriel dominados por el modo asexual de la fragmentación. Esto sugiere que puede ser muy importante genotipificar mediante microsatélites u otros marcadores moleculares a los corales antes de realizar tareas de restauración, de modo de poder establecer la variabilidad genética deseada en los sitios afectados. Es más, sería posible establecer guarderías permanentes con fragmentos o colonias de corales de diversas localidades, que podrían ser utilizados en el futuro donde fueran necesarios acordes a diseños preestablecidos dependiendo las condiciones del sitio.

Se constata, mediante el marcador molecular mitocondrial CO1, que la variación genética en ambas estrellas de mar, *Phataria unifascialis* como en *Pharya pyramidata*, ocurre al interior de las localidades y no entre localidades. Tanto la AMOVA, el árbol filogenético, y la red de haplotipos no muestran estructura poblacional en términos geográficos, lo cual sugiere que todas las localidades muestreadas representan la misma población. Por lo

tanto el origen de las estrellas que colonizaron el área restaurada (Área Primaria) en el Arrecife San Lorenzo, pudiera ser cualquiera de las localidades.

La diversidad mitocondrial de la región control en *Stegastes rectifraenum* es alta, típica como en otras especies de peces. Inicialmente (Balart y Ortega-Rubio, 2012), basado en las localidades sureñas del Golfo de California, no se detectó estructura poblacional, lo cual indicaba que todas las localidades muestreadas representan la misma población. El origen de los peces colonizadores del área restaurada por tanto, pudiera ser cualquiera de las localidades. Sin embargo, al aumentar el área geográfica hacia el extremo norte de su área de distribución en el Golfo de California, se evidencia que las localidades del sur del golfo, incluida el área restaurada en el Canal San Lorenzo, se separan significativamente de las norteñas y de la población de Bahía Magdalena, que conforman aparentemente otra población. La presencia de estructura poblacional para en *S. rectifraenum* sugiere que el flujo genético está restringido al interior de las dos áreas geográficas del Golfo (Sur y Norte), existiendo barreras entre ambas que disminuyen la dispersión e intercambio de las larvas (ya que los huevos son bentónicos). La jaqueta de Cortés deposita sus huevos en el fondo en un nido y tiene cuidado parental (Petersen y Marchetti, 1989) y su capacidad de dispersión de la larva pelágica, con un promedio de 21.5 días de duración antes de asentarse en un arrecife e iniciar una vida bentónica (Victor y Wellington, 2000). Estas características biológicas en conjunto con los patrones de circulación costera y oceánica propios del Alto Golfo de California, además de los procesos de surgencia asociados a los patrones de vientos y mareas de las grandes islas (Alvarez-Borrego, 2002), pudiera estar ocasionando la estructura genética observada. Por otro lado, la gran distancia genética entre los organismos del sur del Golfo de California con Bahía Magdalena era previsible, dada la barrera geográfica que representa la península de Baja California, pero la cercanía de esta última con las localidades norteñas del Golfo sugiere hipótesis similares a otras especies ícticas disjuntas como en *Anisotremus* (Bernardi y Lape, 2005; 2008; Tavera *et al.*, 2012), y otros grupos de peces (i.e., Riginos and Nachmann, 2001; Bernardi *et al.* 2003).

La falta de estructura poblacional para *C. oxycephalus* y la amplia dispersión de los haplotipos sugieren que no existen barreras geográficas que impidan el flujo genético entre las localidades estudiadas. Esto debido a que estos peces poseen huevos y larvas planctónicas que tienen una dispersión potencial alta. Por lo mismo el origen de los colonizadores es incierto como es determinado por el marcador molecular utilizado. En cuanto al botete bonito, *Canthigaster punctatissima*, no hay suficiente información para concluir si se comportará de manera similar a *C. oxycephalus*.

Conclusiones

La variabilidad genética de las colonias de *Pocillopora verrucosa* depende de si se evalúa las colonias con reproducción sexual o todas, con reproducción y asexual, ya que estas últimas tienen gran clonalidad. Este es el caso de las colonias del arrecife San Lorenzo, incluyendo el área restaurada, donde domina el modo asexual de reproducción por fragmentación. Cuando consideramos solo a los genotipos únicos de cada población se encontró alta conectividad entre las poblaciones.

Los resultados indican que las estrellas marinas *Phataria unifascialis* y *Pharya pyramidata* poseen, como lo evidencia el marcador mitocondrial CO1, gran variabilidad genética. Asimismo, los análisis indican que en las localidades analizadas hay una ausencia de estructura poblacional, esto es, que aparentemente existe una sola población con una alta diversidad genética, por lo que el origen de las poblaciones colonizadoras pudiera ser cualquiera de ellas.

Se demuestra que la jaqueta de Cortés *Stegastes rectifraenum* posee una gran variación genética, al menos como lo evidencia la región control del ADN mitocondrial, lo que indica un buen estado de salud. Asimismo, el análisis demostró que la jaqueta de Cortés se estructura en al menos dos poblaciones (sur vs norte) y que los organismos del área restaurada pueden proceder de las localidades del área sur del Golfo de California, pero no de las localidades norteñas, con las cuales presenta una gran distancia genética.

Se demuestra que tanto el halcón de coral *Cirritichthys oxycephalus* como el botete bonito *Canthigaster punctatissima* tienen una gran variación genética. Asimismo, el análisis de un fragmento de la región control del ADN mitocondrial de *C. oxycephalus* sugieren que no presentan una estructura genética dentro de las localidades muestreadas, indicando que hay un flujo genético entre las localidades y que están formando una sola población. Por lo tanto el origen de las poblaciones colonizadoras puede ser cualquiera de las localidades, y no puede ser determinado con este marcador molecular.

Literatura citada

- Alvarez-Borrego, S. 2002. Physical oceanography. Pp. 41-59. In: T.J. Case, M.L. Cody & E. Ezcurra (Eds.), A new island biogeography of the Sea of Cortés. Oxford University Press.
- Ayre, D. y T. Hughes. 2000. Genotypic diversity and gene flow in brooding and spawning corals along the Great Barrier Reef, Australia. *Evolution* 54:1590-1605.
- Aranceta-Garza, F., E.F. Balart, H. Reyes-Bonilla & P. Cruz-Hernández. 2012. Effect of tropical storms on sexual and asexual reproduction in coral *Pocillopora verrucosa* subpopulations in the Gulf of California. *Coral Reefs* 31: 1157-1167.
- Balart Páez, E.F. & A. Ortega-Rubio. 2012. Proyecto GD001: Variabilidad genética y probable origen de las poblaciones colonizadoras en el área afectada por el buque tanque Lázaro Cárdenas II, Baja California Sur. Segundo informe de actividades y resultados a CONABIO. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 27 p.
- Balart Páez, E.F., Reyes Bonilla, H., De León González, JA., Serviere Zaragoza, E., Hernández Moreno, L.G., Cabral Tena, R., Mazariegos, A., Ortega Rubio, A. 2010. Proyecto CT001 "Programa de monitoreo de la restauración de arrecife coralino afectado por el Buque Tanque Lázaro Cárdenas II, y de las comunidades arrecifales de la región del Parque de Loreto, Baja California Sur. Financiado por CONABIO. Informe Final. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 80 p.
- Balart Páez, E.F., A. Ortega-Rubio, L. G. Hernández Moreno, J. A. De León González, A.M. López Ortiz, I. Sánchez Alcántara, D.A. Paz García, N. Bocanegra Castillo, y H. Reyes Bonilla. 2015. Ampliación del Proyecto CT001: Programa de monitoreo de la restauración de arrecife coralino afectado por el Buque Tanque Lázaro Cárdenas II, y de las comunidades arrecifales de la región del Parque de Loreto,

- Baja California Sur. Financiado por CONABIO. Informe Final. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 66 p.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Rohlf, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Bernardi G., Lape J. 2005. Tempo and mode of speciation in the Baja California disjunct fish species *Anisotremus davidsonii*. *Mol. Ecol.* 14:4085–4096.
- Bernardi G., L.Findley, A. Rocha-Olivares. 2003. Vicariance and dispersal across Baja California in disjunct fish populations. *Evolution* 57: 1599-1609.
- Bernardi G., Alva-Campbell Y., Gasparini J., Floeter S. 2008. Molecular ecology, speciation and evolution of the reef fish genus *Anisotremus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 48:929–935.
- 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. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 27: 477-500.
- Chakraborty, R. 1990. Mitochondrial DNA polymorphism reveals hidden heterogeneity within some Asian populations. *Am. J. Hum. Genet.* 47: 87-94.
- Cowen, R.K., C.B. Paris & A. Srinivasan. 2006. Scaling of connectivity in marine populations. *Science* 311:522-527.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567.
- Excoffier, L., P. E. Smouse & J. M. Quattro. 1992 Analysis of molecular variance from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7881515>

- Fu, X. Y. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and back ground selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Guo, S.W. and E.A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrika* 48(2):361-372.
- Hellberg, M. E. 2006. No variation and low synonymous substitution rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evol. Biol.* 6:24.
- Magalon, H., S. Samadi, M. Murielle, M. Adjeroud y M. Veuille. 2004. Development of coral and zooxanthella-specific microsatellites in three species of *Pocillopora* (Cnidaria, Scleractinia) from French Polynesia. *Mol. Eco. Notes*, 4:206-208.
- Petersen, C.W. & Marchetti, K. 1989. Filial cannibalism in the Cortez Damselfish *Stegastes rectifraenum*. *Evolution*. 43: 158-168.
- Planes, S. et al. 1998. Genetic evidence of closed life-cycle for some coral reef fishes within Taiaro lagoon (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). *Coral Reefs* 17: 9-14.
- Rice, W. R. 1989 Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 41:223-235.
- Ridgway, T., C. Riginos, J. Davis y O. Hoegh-Guldberg. 2008. Genetic connectivity patterns of *Pocillopora verrucosa* in southern African Marine Protected Areas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 354:161-168.
- Riginos, C., M.W. Nachmann. 2001. Population subdivisión in marine environments: the contribution of biogeography, geographical distance and discontinuous hábitat to genetic differentiation in a blennioid fish, *Axoclinus nigricaudus*. *Mol. Ecol.* 10: 1439-1453.
- Sponaugle, S., R.K. Cowen, A. Shanks, S.G. Morgan, J.M. Leis, J. Pineda, G.W. Boehlert, M.J. Kingsford, K.C. Lindeman, C. Grimes & J.L. Munro. 2002. Predicting self-recruitment in marine populations: biophysical correlates and mechanisms. *Bull. Mar. Sci.* 70: 341-375.
- Starger C., S. Yeoh, C. Dai, A. Baker y R. DeSalles. 2008. Ten polymorphic STR loci in the cosmopolitan reef coral, *Pocillopora damicornis*. *Mol. Eco. Res.* 8:619-621.

- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 597–601.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–9.
- Tavera, J.J., A. Acero P., E.F. Balart & G. Bernardi. 2012. Molecular phylogeny of grunts (Teleostei, Haemulidae), with an emphasis on the ecology, evolution, and speciation history of New World species. *BMC Evolutionary Biology* 2012, 12: 57.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills and P.F. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: For identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535-538.
- Victor B.C. and G.M. Wellington. 2000. Endemism and pelagic larval duration of reef fishes in the eastern Pacific Ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 205:241–248.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Anexo

Tesis terminadas asociadas al proyecto GD001

Fernando Aranceta Garza. 2010. Determinación de la estructura genética del coral hermatípico *Pocillopora verrucosa* en el Golfo de California mediante el uso de microsatélites. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 108 pp.

José F. Meléndez. 2014. Variabilidad genética y conectividad de la jaqueta de Cortés, *Stegastes rectifraenum* (Gill, 1862), Perciformes: Pomacentridae, en ambas costas de la Península de Baja California. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas del IPN. 87 pp.

Publicaciones asociadas al proyecto GD001

Aranceta-Garza, F., E.F. Balart, H. Reyes-Bonilla & P. Cruz-Hernández. 2012. Effect of tropical storms on sexual and asexual reproduction in coral *Pocillopora verrucosa* subpopulations in the Gulf of California. *Coral Reefs* 31: 1157-1167.

Aranceta-Garza, F., P. Cruz-Hernández, H. Reyes-Bonilla & E.F. Balart. (en preparación). Determination of the genetic structure and connectivity patterns of the coral *Pocillopora verrucosa* and its implications for a network of protected areas in the Gulf of California. A ser sometido a *Biological Conservation*.

Ponencias/carteles en congresos asociadas al proyecto GD001

Meléndez-Cal y mayor, J.F., F.J. García-Rodríguez & E.F. Balart. 2012. Variabilidad genética y conectividad de la jaqueta de Cortés, *Stegastes rectifraenum* (Gill, 1862;

Perciformes: Pomacentridae) en el Golfo de California. XIII Congreso Nacional de Ictiología. San Cristóbal de las Casas, Chiapas. 29 octubre-3 noviembre 2012.

Meléndez Cal y mayor, F.J., F.J. García-Rodríguez & E.F. Balart. 2013. Variabilidad genética y conectividad de la jaqueta de cortés, *Stegastes rectifraenum* (Gill, 1982; Perciformes: Pomacentridae) en el Golfo de California. XIII Congreso del Mar de Cortés & VII Simposio del Mar de Cortés. Ensenada, B.C. 8-12 abril 2013.

Meléndez Cal y Mayor, J.F., F.J. García Rodríguez & E. Balart. 2013. Variabilidad genética y conectividad de la jaqueta de Cortés, *Stegastes rectifraenum* (Gill, 1982; Perciformes: Pomacentridae) en el Golfo de California. VII Congreso Mexicano & 1er Congreso Panamericano de Arrecifes Coralinos. Mérida, Yuc. 8-11 octubre 2013.