

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Genética de poblaciones de *Thais melones*: implicaciones
de su explotación en Galápagos y Ecuador continental**

Trabajo de Investigación

Sandy Nicole Valdiviezo Orellana

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 20 de diciembre de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Genética de poblaciones de *Thais melones*: implicaciones de su explotación en Galápagos y Ecuador continental

Sandy Nicole Valdiviezo Orellana

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico Margarita Brandt , Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 20 de diciembre de 2016

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Sandy Nicole Valdiviezo Orellana

Código: 00107330

Cédula de Identidad: 0704011485

Lugar y fecha: Quito, 20 de diciembre de 2016

DEDICATORIA

A mis papás, Manuel y Bella

A mis hermanos: Alysson, Kevin, Kelly y Lía

Son mi vida

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias a Dios por todas las bendiciones que me ha otorgado. A mis padres por darme el estudio, por apoyarme y forjarme para ser de mí lo que soy, a mis hermanos por estar ahí y alegrar mis días. Fue su existencia y amor incondicional lo que me motivó cada día a culminar este trabajo.

Agradezco infinitamente a mi directora de tesis Margarita Brandt por brindarme la oportunidad de estar en este proyecto y confiar en mí. Por ayudarme y darme los medios para poder realizar todo este trabajo. De igual manera agradezco a María de Lourdes Torres y Venancio Arahana por guiarme y compartir sus conocimientos para poder realizar con éxito toda la etapa experimental.

A Jael Martínez, Jens Mayorga, Jacob Guachisaca, Alicia Bertolotti, Katie McCabe, Anne-Maxwell Ellet, Kathryn Cobleigh, Brianne Varnerin, Christopher Versch y Shannon Wesstrom por ayudar en la recolección de muestras. Además, Alicia Bertolotti colaboró con el desarrollo de primers para microsatélites e intervino en su evaluación y selección. A Jaime Chaves y Sarah Griffiths por ayudarme en los análisis genéticos.

A los chicos del laboratorio de Biotecnología vegetal Laia Muñoz, Juan Delgado, Nina Espinoza, Alejandro Alvear, Estefanía Rojas y Juan Salazar. Además a David Fernández y Martín Carrera.

A mis amigos Mayra Ortega, Emilia Peñaherrera, Michelle Rodríguez y Carlos Fierro por ayudarme durante todo este trabajo, estuvieron siempre ahí aportando con su conocimiento y brindándome siempre su apoyo. Chicas gracias por compartir junto a mí esta travesía.

A aquellos profesores que me enseñaron con toda la paciencia y amor, estaré eternamente agradecida. Definitivamente este trabajo existe gracias a la colaboración de todas las personas que aportaron en el proyecto. A todas esas personas que intervinieron, hasta con el más mínimo detalle, ¡muchas gracias!

RESUMEN

Thais melones pertenece a la familia Muricidae y habita en zonas rocosas intermareales, desde México hasta Perú y en las Islas Galápagos. En Ecuador, la especie forma parte de los recursos capturados en la pesca artesanal de ciertos pueblos costeros. El objetivo de este estudio fue caracterizar genéticamente las poblaciones de *Thais melones* provenientes de las provincias de Esmeraldas, Manabí, Santa Elena y Galápagos para así poder determinar si existían diferencias genéticas debido a su explotación y ubicación geográfica, además de establecer el grado de conectividad entre las poblaciones de estudio. Para esto, se desarrollaron 27 primers específicos, de los cuales 13 sirvieron para los análisis genéticos. Se analizó un total de 114 muestras de *Thais melones* y se encontró alta diversidad genética, reflejada en la heterocigocidad, número de alelos promedio por locus e índice de Shannon. La diversidad genética no varió entre las poblaciones según su explotación ni ubicación geográfica. El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que el 75% de la variabilidad se encontraba dentro de los individuos y el 25% entre los individuos. Los análisis de coordenadas principales (PCoA) e inferencia bayesiana (Structure) reflejaron escasa estructura genética; todos los individuos estudiados se agruparon en una sola población. Por lo tanto, se estableció que existe alta conectividad entre las distintas poblaciones de estudio, posiblemente debido a una probable larga duración del desarrollo larval en la especie. Además, se estimó que las tasas de migración entre poblaciones con bajo y alto impacto humano iban de 0.10 a 0.20; en consecuencia, posiblemente las poblaciones con alto impacto humano se recuperan debido a la migración que existe.

Palabras clave: *Thais melones*, pesca artesanal, microsátélites, diversidad genética, conectividad, genotipado.

ABSTRACT

Thais melones belongs to the Muricidae family and inhabits intertidal rocky areas from Mexico to Peru and the Galapagos Islands. In Ecuador, the species is captured by artisanal fishing at certain coastal towns. The aim of this study was to genetically characterize the populations of *Thais melones* from the Esmeraldas, Manabí, Santa Elena and Galapagos provinces to determine if there were genetic differences due to its exploitation and geographic location, as well as to establish the degree of connectivity among the study populations. In order to do this, 27 specific microsatellite primers were developed, of which 13 were used for the genetic analysis. By analyzing a total of 114 samples, high genetic diversity was found, reflected by the heterozygosity, average number of alleles per locus, and Shannon index. Genetic diversity did not vary between populations according to their exploitation or geographic location. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that 75% of the variability was found within the individuals and 25% among individuals. Principal coordinates analysis (PCoA) and Bayesian inference (Structure) reflected a lack of genetic structure; all the individuals were grouped in one population. Therefore, it was established that there is high connectivity among the different study populations, potentially due to a long larval development duration in the species. Furthermore, migration rates between populations with low and high human impact ranged from 0.10 to 0.20; consequently, populations with high human impact are likely to recover due to migration.

Key words: *Thais melones*, artisanal fishing, microsatellites, genetic diversity, connectivity, genotyping.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	14
1.1 Genética de poblaciones	14
1.1.1 Equilibrio Hardy-Weinberg.....	15
1.1.2 Diversidad genética	15
1.2 Marcadores moleculares	16
1.2.1 Microsatélites	17
1.3 Conectividad.....	18
1.4 Familia Muricidae	18
1.4.1 <i>Thais melones</i>	19
2. Objetivos.....	21
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Área de estudio	21
4. Justificación.....	23
5. Materiales	24
5.1 Colección de muestras	24
5.2 Extracción de ADN	24
5.3 Cuantificación de ADN	25
5.4 Desarrollo de primers	25
5.5 Amplificación de regiones microsatélites SSR mediante PCR	25
5.6 Electroforesis en geles de agarosa	26
5.7 Toma de datos y análisis genéticos.....	26
6. Métodos	27

6.1 Obtención de muestras.....	27
6.2 Extracción de ADN y cuantificación.....	27
6.3 Desarrollo de primers	28
6.4 Selección y evaluación de primers	29
6.5 Amplificación con primers marcados con fluoróforos	29
6.6 Toma de datos y Análisis estadísticos	30
7. Resultados	32
7.1 Extracción de ADN y cuantificación.....	32
7.2 Selección y evaluación de primers	32
7.3 Amplificación de regiones microsatélites con primers marcados con fluorescencia.....	33
7.4 Análisis de loci en equilibrio de Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamiento y frecuencia de alelos nulos.....	33
7.5 Diversidad genética	34
7.6 Diferenciación genética	35
7.7 Estructura poblacional	35
7.8 Cuellos de botella	36
7.9 Migración	36
8. Discusión.....	36
9. Conclusiones.....	45
10. Recomendaciones.....	46
11. Referencias	47
12. Tablas.....	54
13. Figuras	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de individuos de <i>Thais melones</i> colectados para el presente estudio, según la localidad en cada provincia. Además, se indica el potencial impacto humano en base a la cercanía de las localidades a las zonas pobladas.....	54
Tabla 2. Primers desarrollados y seleccionados para el estudio genético de las poblaciones de <i>Thais melones</i> provenientes de Galápagos y Ecuador continental.	55
Tabla 3. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg para las regiones de Galápagos y Ecuador continental en <i>Thais melones</i>	56
Tabla 4. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg considerando las seis ubicaciones geográficas en <i>Thais melones</i>	57
Tabla 5. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg para las poblaciones, según su potencial impacto humano, en <i>Thais melones</i>	58
Tabla 6. Frecuencia de alelos nulos para las regiones de Galápagos y Ecuador continental de <i>Thais melones</i>	58
Tabla 7. Frecuencia de alelos nulos considerando las seis ubicaciones geográficas de <i>Thais melones</i>	58
Tabla 8. Frecuencia de alelos nulos para las dos poblaciones, según potencial impacto humano, de <i>Thais melones</i>	59
Tabla 9. Medidas de diversidad genética para las regiones de Galápagos y Ecuador continental de <i>Thais melones</i> utilizando 13 loci microsatelitales.....	59
Tabla 10. Medidas de diversidad genética para las seis ubicaciones geográficas de <i>Thais melones</i> utilizando 13 loci microsatelitales.	60
Tabla 11. Medidas de diversidad genética para las 10 poblaciones (según su potencial impacto humano) de <i>Thais melones</i> utilizando 13 loci microsatélites.	61

Tabla 12. Medidas de diversidad genética para las dos clasificaciones (según su potencial impacto humano) de <i>Thais melones</i> utilizando 13 loci microsatelitales.	62
Tabla 13. Matriz de distancia genética de Weir (Fst) entre las regiones de Galápagos y Ecuador continental en <i>Thais melones</i>	62
Tabla 14. Matriz de distancia genética de Weir (Fst) entre las 6 ubicaciones geográficas de <i>Thais melones</i>	62
Tabla 15. Matriz de distancia genética de Weir (Fst) entre 10 poblaciones (según su potencial impacto humano) de <i>Thais melones</i>	63
Tabla 16. Análisis de varianza molecular de individuos de <i>Thais melones</i> agrupados en distintos niveles. siendo el menor las 12 localidades de muestreo y el mayor Galápagos y Ecuador continental. Se muestran promedios de estadísticos F junto a la significancia estadística.	63
Tabla 17. Valores para la estimación de K óptima por medio del método de Evanno et al. (2005) a partir de los datos obtenidos en Structure Harvester de los individuos de <i>Thais melones</i>	64
Tabla 18. Análisis de Probabilidad de exceso de heterocigocidad en base a la prueba de estadística de Wilcoxon y según diferentes modelos mutacionales para las regiones de Galápagos y Ecuador continental de <i>Thais melones</i>	64
Tabla 19. Análisis de Probabilidad de exceso de heterocigocidad en base a la prueba estadística de Wilcoxon y según diferentes modelos mutacionales para las seis ubicaciones geográficas de <i>Thais melones</i>	65
Tabla 20. Análisis de Probabilidad de exceso de heterocigocidad en base a la prueba estadística de Wilcoxon y según diferentes modelos mutacionales para las dos poblaciones (en base a su potencial impacto humano) de <i>Thais melones</i>	65

Tabla 21. Estimación de tasas de migración entre las regiones de Ecuador continental y Galápagos, en <i>Thais melones</i>	66
Tabla 22. Estimación de tasas de migración entre las 2 poblaciones de San Cristóbal, en <i>Thais melones</i>	66
Tabla 23. Estimación de tasas de migración entre las 2 poblaciones de Santa Cruz, en <i>Thais melones</i>	66
Tabla 24. Estimación de tasas de migración entre las 2 poblaciones de Floreana, en <i>Thais melones</i>	67
Tabla 25. Estimación de tasas de migración entre las 2 poblaciones de Esmeraldas, en <i>Thais melones</i>	67
Tabla 26. Estimación de tasas de migración entre las poblaciones de la playita y La Entrada ,en <i>Thais melones</i>	67

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de las 12 localidades de estudio. Los puntos rojos indican los sitios muestreados. Arriba: Islas Galápagos. Abajo: Ecuador continental.**68**
- Figura 2.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) en dos dimensiones, correspondiente a muestras de *Thais melones*. Se obtuvo de la matriz de disimilitud elaborada con 114 individuos y 13 loci. Las poblaciones se identifican de la siguiente manera: San Cristóbal (café), Santa Cruz (negro), Floreana (morado), Norte (verde), Centro (rojo) y Sur (celeste). No existen agrupamientos claros entre los individuos, más bien se da una distribución aleatoria en todos los cuadrantes.....**69**
- Figura 3.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) en dos dimensiones, correspondiente a muestras de *Thais melones*. Se obtuvo de la matriz de disimilitud elaborada con 97 individuos y 13 loci. Las poblaciones se identifican de la siguiente manera: alto impacto humano (rojo) y bajo impacto humano (negro). Los individuos se encuentran dispersos en todos los cuadrantes, no existen agrupamientos según las poblaciones.....**70**
- Figura 4.** Media de L(K) y varianza por cada valor K de a partir de los datos obtenidos en Structure Harvester de los individuos de *Thais melones*.....**71**

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Genética de poblaciones

La genética de poblaciones es una rama de la genética que se encarga del estudio comparativo de las frecuencias génicas y genotípicas de las poblaciones (composición genética), la manera en que esta distribución de variabilidad cambia a través del tiempo y del espacio y sus efectos en la adaptación y evolución de las poblaciones. Las frecuencias génicas se refieren a la variación de alelos de un locus determinado, mientras que las frecuencias genotípicas se refieren a cómo se distribuye esta variación en los individuos (Orengo, 2002; Templeton, 2006).

Para lograr esto, se han desarrollado modelos matemáticos que evalúan la dinámica de las frecuencias genéticas. A través de estos modelos, se saca conclusiones sobre los patrones de variación genética en las poblaciones y se comparan los resultados con los datos empíricos (Orengo, 2002; Okasha, 2015). Así, uno de los modelos utilizados para entender la composición genética de las poblaciones fue el Equilibrio de Hardy-Weinberg, con el cual solo se estudiaban pocos genes con comportamiento mendeliano. Esto constituyó la base de desarrollo de la genética de poblaciones. Luego con el avance de las investigaciones, se logró estudiar modelos más realistas que implican un mayor número de genes al utilizar los marcadores genéticos, en los cuales se encuentran los marcadores moleculares. Al existir estas alternativas, se busca analizar en mayor medida la diversidad genética de las poblaciones por medio del estudio de una mayor cantidad de loci (Eguiarte et al., 2013).

Para poder sacar conclusiones, la genética de poblaciones se enfoca en los mecanismos de cambio microevolutivo: mutación, flujo génico, selección natural y deriva génica (Templeton, 2006). Por la tanto, de manera general, si se ve que la frecuencia

alélica varía en las poblaciones puede ser debido a un balance entre el flujo génico y la deriva génica; a mayor flujo génico menor diferencia entre las poblaciones, mientras que a mayor deriva génica más diferentes van a ser. En cambio, si solo se ve diferencia en ciertos genes entre las poblaciones, se puede estar distinguiendo las consecuencias de la selección natural (Eguiarte et al., 2013).

1.1.1 Equilibrio Hardy-Weinberg

El equilibrio de Hardy-Weinberg se basa en una serie de supuestos, en donde las poblaciones se reproducen sexualmente al azar y no existe sobre ellas ninguna fuerza evolutiva. De esta manera, se mantienen constantes las frecuencias génicas y genotípicas a lo largo de las generaciones y si existe desviación, solo tomará una generación para volver al equilibrio en los loci autosómicos. Los supuestos del equilibrio de Hardy-Weinberg son los siguientes: que apareamiento es al azar; que no existe mutación, ni selección, ni migración; que el tamaño de la población es infinito; que las generaciones son discretas; y que los organismos son diploides y se reproducen sexualmente (Orengo, 2002; Andrews, 2010).

1.1.2 Diversidad genética

La diversidad genética se refiere a las variaciones existentes en los alelos y genotipos en los individuos y entre poblaciones. Las variantes genéticas se denominan alelos y éstas aparecen debido a mutaciones, ya sea al momento de la replicación del ADN o por recombinación genética. Las frecuencias de los alelos varía dependiendo de factores físicos y biológicos como deriva génica, selección (natural y artificial), flujo génico y

barreras geográficas (Ramanatha y Hodgkin, 2002; Abdul-Muneer, 2014; Ellegren y Galtier, 2016).

Gracias a la existencia de esta diversidad genética las especies pueden responder a los cambios que se dan en el ambiente en el que viven y pueden colonizar nuevas áreas. Si la variabilidad genética se reduce, va a ser más difícil para la población poder adaptarse a los cambios ambientales, ocasionando que se disminuya la probabilidad de supervivencia a largo plazo (Kuo y Janzen, 2004).

1.2 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son fragmentos de ADN que se encuentran en una ubicación específica en el genoma y cuya herencia se puede rastrear. Este tipo de marcadores constituye una excelente opción para el estudio genético de individuos, ya que son polimórficos, abundantes y no se ven influenciados por el ambiente. Se puede encontrar diferentes tipos de marcadores, según la manera en que se los clasifique. Si se toma en consideración la técnica utilizada están: los marcadores basados en hibridación de ADN y los marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, Kumar et al., 2009). A través de las PCR se puede generar varias copias de una secuencia de ADN, con la ayuda de oligonucleótidos y una enzima polimerasa de ADN termoestable, teniendo la ventaja de utilizar pequeñas cantidades de ADN (Abdul-Muneer, 2014). Dentro de esta técnica están los marcadores según los polimorfismos de ADN amplificados aleatoriamente (RAPDs, por sus siglas en inglés), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLPs, por sus siglas en inglés), secuencias simples

repetidas (SSR) o microsatélites y polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés; Kumar et al., 2009).

1.2.1 Microsatélites

Son fragmentos de ADN que se repiten en tándem en unidades de 1 a 6 pares de bases hasta 100 veces en cada locus. Los alelos corresponden a las variaciones en el número de repeticiones (Ellegren y Galtier, 2016) que se dan debido a deslizamientos o errores de la polimerasa durante las replicaciones de ADN y recombinación desigual de las hebras de ADN (Li et al., 2002). Los microsatélites se caracterizan por heredarse de manera mendeliana, estar distribuidos por todo el genoma, ser abundantes, codominantes (se pueden distinguir entre heterocigotos y homocigotos), polimórficos, tener una alta tasa de mutación, alrededor de 10^{-2} y 10^{-6} mutaciones por locus por generación (Selkoe y Toonen, 2006), y, ser relativamente fáciles de manipular, lo que los hace ideales para estudios genéticos (Kumar et al., 2009).

Estos marcadores se pueden identificar por medio de reacciones PCR y visualizar a través de geles de agarosa y poliacrilamida o por medio de un analizador genético, al utilizar primers marcados con fluorescencia. Para hacer estudios con microsatélites es necesario conocer las secuencias flanqueantes a los mismos; de esta manera, se generarán primers específicos. Estas secuencias se pueden obtener de los bancos de genes, bibliotecas genómicas o se pueden utilizar primers desarrollados para otras especies, ya que existen ciertas secuencias flanqueantes de microsatélites que son conservadas entre especies relacionadas (Abdul-Muneer, 2014). Los usos que se le pueden dar a los microsatélites son amplios, entre los cuales están: estructura poblacional, variación genética, ciencia forense,

mapeo del genoma, diagnóstico de enfermedades, estudios taxonómicos, entre otros (Abdul-Muneer, 2014).

1.3 Conectividad

La conectividad se puede definir como el grado en el que se encuentran unidas las poblaciones por medio del intercambio de huevos, larvas, juveniles o adultos (Palumbi, 2003), estando dominada por la dispersión de las formas de vida temprana de los individuos (Gawarkiewicz et al., 2007). De tal manera, la conectividad forma un aspecto clave para mantener la variabilidad genética en la especie y determinar su estructura poblacional; además, interfiere en la capacidad de recuperación de las poblaciones a los efectos de la explotación humana (Cowen et al., 2007).

La conectividad se puede evaluar a través de métodos directos o indirectos en los que incluyen técnicas geoquímicas, genéticas, observaciones *in situ*, estudios de la duración de las etapas pelágicas y modelos biofísicos como el análisis del movimiento de partículas según las corrientes oceánicas (Cowen et al., 2007; Cowen y Sponaugle, 2009). Además, por medio de estos estudios, se puede tener un visión general de los patrones de dispersión y conectividad, sirviendo para el establecimiento de las reservas marinas protegidas (Palumbi, 2003).

1.4 Familia Muricidae

Esta familia de gasterópodos está conformada por 100 géneros y más de 1000 especies. Se encuentran en todos los mares, en sustratos duros y fondos blandos, pero son más abundantes en aguas tropicales (Hickman, 1999; Zobebe y Negra, 2008). Debido a su amplia distribución y adaptación a diferentes ambientes, las especies de esta familia

presentan conchas con una gran variedad de tamaños, formas y colores. Por ejemplo, las especies que habitan en aguas tranquilas o profundas poseen espinas; las que habitan en fangos o en la arena, tienen un canal sifonal alargado y las que se encuentran en la zona de rompiente, cuentan con una base aplanada y un pie bien desarrollado (Zobeles y Negra, 2008).

Por otro lado, los miembros de esta familia se caracterizan por ser carnívoros y alimentarse de balanos, erizos, estrellas de mar, conchas, gasterópodos y otros invertebrados. Para atacar a su presa secretan una sustancia neurotóxica de la glándula hipobranqueal; además, perforan la concha de su presa por medio de la rádula dentada y secreciones ácidas (provenientes del órgano perforador accesorio) o por medio del pie y de su propia concha (Hickman, 1999; Morton, 1998; Zobeles y Negra, 2008).

El género *Thais* se caracteriza por presentar “una concha oval oblonga, con espira corta y ornamentada con costillas nodulosas en espiral”. Posee una abertura grande que termina en un canal corto con una ranura sifonal (García y Reguero, 2004). Por otra parte, la secreción que utilizan para inmovilizar a la presa es blanca y luego de la exposición al aire, se torna morada (Myra, 1971). Por tal motivo, a lo largo de la historia se han usado algunas especies de este género y de la familia para la obtención de tinte (Zobeles y Negra, 2008).

1.4.1 *Thais melones*

Se lo conoce comúnmente como murícido manzana, churo morado, churo verde, caracol melón y púrpura melón (Romero, comunicación personal, 2016). Se lo puede encontrar desde las costas de México hasta Callao, Perú y en las Islas Galápagos, constituyendo uno de los caracoles más comunes (Hickman, 1999). Presenta una concha

sólida, gruesa y en forma globular con líneas espirales delgadas y planas. Se caracteriza por presentar una coloración negra con puntos o líneas blancas o amarillas-cremosas. Posee el ápice en punta y espira baja (Novoa et al., 2010; Romero, comunicación personal, 2016). Los juveniles son fusiformes y de color blanco con pocas manchas y en su etapa adulta puede llegar a medir 5 centímetros (Hickman, 1999). Esta especie habita en zonas rocosas, desde el supramareal hasta el submareal (Romero, comunicación personal, 2016). De tal manera, durante las mareas bajas se introduce en grietas con el objetivo de reducir el estrés y desecación a causa del calor (West, 1985).

Thais melones es más activo en la oscuridad y forma parte de los principales depredadores en zonas rocosas. Se alimenta de balanos, poliquetos, gasterópodos, bivalvos y chitones y se encuentra atraído por los productos químicos de las especies lastimadas. Además, utiliza diferentes técnicas para perforar a sus presas, todo depende de la morfología de éstas (West, 1985).

En el Ecuador se puede encontrar a esta especie en las provincias de Esmeraldas, Manabí, Santa Elena, El Oro y Galápagos. Es la especie dominante del área y controla a las poblaciones de bivalvos y otros moluscos. En varios de estos lugares, forma parte de los recursos capturados de la pesca artesanal; generalmente la recolección la realizan las mujeres y niños y son de gran importancia económica para las comunidades (Molina et al., 2004; MAE-SNAP-GEF, 2007; Lasso y Escarabay, 2009; Romero, 2012; Cruz 2013).

La información que se tiene de *Thais melones* es muy limitada, no existen registros estadísticos de su consumo en el país, ni datos sobre el impacto que tiene la explotación comercial en este molusco. El único registro de su captura proviene de Galápagos, de un informe del Parque Nacional Galápagos, en donde se cita que durante el 2003 se capturaron 4.4 kg (Molina et al., 2004). Por otro lado, no se ha caracterizado genéticamente a las poblaciones de esta especie, lo cual es básico para poder determinar la

situación en la que se encuentran. Por tal motivo, en este estudio se analiza genéticamente muestras de *Thais melones* provenientes de diferentes provincias de Ecuador.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Caracterizar la composición genética de *Thais melones* de muestras provenientes de la provincia de Galápagos y Ecuador continental, mediante el uso de marcadores moleculares tipo microsatélites.

2.2 Objetivos específicos

- Desarrollar primers para microsatélites que sirvan en el estudio genético de *Thais melones*.
- Determinar si existen diferencias genéticas entre poblaciones de *Thais melones* con alto y bajo impacto humano debido a su explotación.
- Determinar si existe diferencias genéticas entre las poblaciones de *Thais melones* debido a su ubicación geográfica.
- Determinar la conectividad entre las distintas poblaciones de estudio.

3. ÁREA DE ESTUDIO

Ecuador, país considerado como uno de los más biodiversos, tiene una gran variedad de ecosistemas marinos como playas, estuarios, lagunas costeras, bahías, arrecifes, entre otros. Existen 14 áreas protegidas marinas y costeras, de las cuales 3 son reservas marinas, 5 están entre ecosistemas marinos y terrestres y 6, en manglares

(Alvarado et al., 2017). Estas áreas tienen una gran diversidad de especies debido a diferentes factores en los que influyen las masas de agua. Al norte se tienen aguas cálidas y con baja salinidad debido a la corriente de Panamá; al sur, aguas frías y ricas en nutrientes debido a la corriente de Humboldt y se tiene un Frente Ecuatorial que corresponde a una zona de mezclas con gradientes térmicos y salinos (Cruz et al., 2003; Cruz 2013).

Las muestras utilizadas para este estudio provinieron de cuatro provincias del Ecuador: Galápagos, Esmeraldas, Manabí y Santa Elena. En total se recolectaron 118 individuos en 12 localidades. En Galápagos, se colectó en Santa Cruz (Playa de los Perros y Camaño), San Cristóbal (Bahía Naufragio y Rosa Blanca) y Floreana (Montura y Luz de Día); en Esmeraldas, Playa Escondida y Estero de Plátano, ambos sitios se encuentran dentro de la Reserva Marina Galera San Francisco; en Manabí, La Tiñosa, La Playita y Machalilla (los dos últimos se encuentran dentro del Parque Nacional Machalilla) y en Santa Elena, La Entrada (Figura 1).

Ahora bien, para evaluar la explotación en esta especie se clasificó a los sitios según se cercanía a los centros poblados, en alto y bajo impacto. Esto se realizó para las localidades de Galápagos y Esmeraldas. En Esmeraldas, Estero de Plátano es la playa del pueblo y a pesar de estar dentro de una reserva marina, se permite la recolección en la zona intermareales. En cambio, en Playa Escondida la gente frecuenta muy poco el lugar. Para las provincias de Manabí y Santa Elena, la categorización también se basó en criterios obtenidos de las observaciones de Brandt y Vinuesa (comunicación personal, 2016) en base a seis años de recolección de churos con pobladores de las playas, que incluían afluencia de personas y recursos capturados. Por lo tanto, La Entrada tiene un alto impacto humano, debido a que se encuentra en el pueblo; La Playita, bajo impacto ya que los pescadores colectan principalmente peces y pulpos, además el acceso es restringido y La Tiñosa y Machalilla, se clasificaron como medio impacto porque aunque se encuentran

cerca de los centros poblados, no se ve gente en la zona intermareal. Estas dos últimas localidades no se tomaron en consideración para los análisis genéticos que pretenden evaluar los efectos de la explotación humana, debido a su clasificación, ya que el potencial impacto humano representaba valores intermedios, y el objetivo principal era comparar los extremos (alto y bajo). Los análisis moleculares y estadísticos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ).

4. JUSTIFICACIÓN

Sin lugar a dudas, los ecosistemas marinos se encuentran impactados por las actividades humanas. De manera general, se puede decir que las zonas más perturbadas son las que se encuentran cerca de las líneas costeras, siendo los sistemas intermareales los más afectados, ya que las especies son muy sensibles a las perturbaciones ambientales, enfermedades, contaminación y sobrepesca (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2007; Vinuesa et al., 2014). Como consecuencia a las actividades antropogénicas se ha encontrado que ciertas poblaciones de *Thais melones* ubicadas en Esmeraldas, Manabí, Santa Elena y Galápagos han sido afectadas por el uso de tributilestano (TBT). El TBT se lo utiliza como anti-incrustantes en estructuras marinas y embarcaciones para evitar que las especies se adhieran a las paredes. Como resultado al uso de este contaminante, se reportó que en las poblaciones de *Thais melones*, las hembras desarrollaron órganos sexuales masculinos, fenómeno conocido como imposex (Rodríguez et al., 2016). Dependiendo del grado de imposex, las hembras pueden sufrir de esterilidad y posteriormente, morir. De tal manera, esto podría conllevar a la reducción de los tamaños poblacionales y causar una reducción en la diversidad genética.

Por otro lado, se conoce que esta especie es capturada con fines comerciales para la alimentación de los habitantes de las zonas costeras (MAE-SNAP-GEF, 2007; Romero,

2012) constituyendo una fuente importante de proteína. La información que se tiene sobre su historia y biología es muy limitada, no se encuentran estudios sobre la caracterización genética de este recurso, ni sobre la conectividad de las poblaciones de Ecuador continental y Galápagos. Es importante realizar estudios en esta especie para poder determinar la evolución de las poblaciones, la diversidad genética y la conectividad, ya que se sabe que a mayor variabilidad genética, mejor será la capacidad para poder adaptarse a distintas condiciones ambientales y si las poblaciones se encuentran conectadas existirá un mayor intercambio de individuos y flujo génico, respondiendo mejor a las perturbaciones ambientales. En cambio, si se tiene poca diversidad la probabilidad de que la especie permanezca a largo plazo en el ambiente disminuye (Kuo y Janzen, 2004; Cowen et al., 2007). Los resultados de esta investigación serán de ayuda para conocer la composición genética y estructura poblacional de la especie. Además, ver el grado de conectividad de las poblaciones de *Thais melones* ayudará a analizar planes de manejo y conservación.

5. MATERIALES

5.1 Colección de muestras

- Etanol 85%
- Tubos colectores
- Bisturí

5.2 Extracción de ADN

- Kit DNeasy Blood y Tissue (QIAGEN) de 250 muestras
- Tubos Eppendorf de 1.5mL
- Etanol al 96%
- Cajas Petri

- Bisturí
- Vortex (IKA)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- Balanza analítica (Sartorius LA 230 S)
- Incubadora con agitación (Barnstead)

5.3 Cuantificación de ADN

- NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)
- Buffer AE (QIAGEN, Tris-Cl, EDTA)
- Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO)

5.4 Desarrollo de primers

- Kit Nextera DNA Preparation (Illumina)
- Plataforma web Galaxy-Golem
- ADN de *Thais melones*

5.5 Amplificación de regiones microsatélites SSR mediante PCR

- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- Agua destilada UltraPure™ (GIBCO)
- MgCl₂ 50mM (Invitrogen)
- dNTP's 10 mM (Invitrogen)
- Platinum™ Taq DNA Polymerase 5U/μL (Invitrogen)
- Platinum ® PCR SuperMix (Invitrogen)
- 16 Pares de primers SSR (Tabla 2)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- T Personal Thermocycler (Biometra)

- Tubos eppendorf de 0.2 ml
- Bovine serum albumin (BSA, 1mg/mL)
- ADN de *Thais melones*

5.6 Electroforesis en geles de agarosa

- UltraPure™ Agarose (Invitrogen)
- TBE 1X (Tris base -Acido Borico- EDTA)
- SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Ladder DNA 100 bp (Invitrogen)
- Fuente de Poder EPS -300 X (C.B.S Scientific)
- Cámara de electroforesis horizontal MGU-502T (C.B.S Scientific)
- Fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD)

5.7 Toma de datos y análisis genéticos

- GeneMapper® V. 3.0 (Applied Biosystems)
- Software Arlequín version 3.5. (Excoffier et al., 2005)
- Software Structure (Pritchard et al., 2000)
- DARwin 6 (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006)
- GenAlex (Peakall, 2012)
- FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007)
- GenePop (Raymond y Rousset, 1995)
- Bottleneck 1.2.02 (Cornuet y Luikart, 1997)
- BayesAss 3 (Wilson y Rannala, 2003)

6. MÉTODOS

6.1 Obtención de muestras

Se colectaron un total de 118 muestras de *Thais melones* en 12 localidades de 4 provincias del Ecuador: Esmeraldas, Manabí, Santa Elena y Galápagos entre los años del 2014 y 2016 (Tabla 1). La recolección se llevó a cabo por estudiantes de la Universidad San Francisco de Quito. En Galápagos, se seleccionaron 10 individuos al azar de la zona intermareal rocosa, los cuales fueron colocados en etanol al 85%. Posteriormente, en el laboratorio del Galápagos Science Center (GSC), se extrajo tejido de las muestras y se lo colocó en tubos individuales con etanol al 85%.

Por otro lado, para recolectar las muestras del continente de igual manera se seleccionaron 9-10 individuos al azar. Del opérculo se extrajo un pedazo de tejido y se lo colocó directamente en tubos con etanol al 85%. Finalmente, se transportaron todas las muestras al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ y se las mantuvo a -20°C, hasta su utilización. Se realizaron las colectas y la exportación de las muestras bajo los permisos PC-43-14, N°014-2014-IC-FAU-DPE-MA, PC-60-15, MAE-DNB-CM-2016-0041 y MAE-DNB-CM-2016-0046.

6.2 Extracción de ADN y cuantificación

Se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo del kit DNeasy® Blood y Tissue (QIAGEN). Primero, se tomó aproximadamente 20 mg de muestra y se lo cortó hasta tener pedazos muy finos de tejido. Esto se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5mL y se agregó 180 µL de Buffer ATL junto a 20 µL de proteinasa K. Se procedió a incubar a 56°C con agitación por un máximo de 4 horas o hasta que el tejido estuviera lisado completamente. Luego, se agregó 200 µL de etanol al 96% y se mezcló por medio de

vórtex. El sobrenadante se transfirió a una mini columna de agitación DNeasy (DNeasy Mini spin column) y se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm. Posteriormente, se transfirió la columna a un nuevo tubo colector y se agregó 500 µL de Buffer AW1, se volvió a centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm y se colocó la columna en un nuevo tubo colector. Seguido, se agregó 500 µL de Buffer AW2 y se centrifugó por 3 minutos a 14,000 rpm. Finalmente, se transfirió la columna a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5mL y se colocó 200 µL de Buffer AE para eluir al ADN. Se dejó reposar por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Se almacenó el ADN a -20°C hasta ser usado. La cuantificación de ADN se realizó por medio de espectrofotometría utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

6.3 Desarrollo de primers

Se realizó un proceso de secuenciamiento aleatorio para obtener secuencias repetidas en tándem que sirvan en el desarrollo de primers viables para la especie a estudiar. Se construyeron bibliotecas de extremos emparejados de ADN por medio del kit Nextera DNA Preparation de Illumina, usando los protocolos del fabricante. Por medio de la plataforma web Galaxy-Golem, a cargo de la Universidad de Manchester, se usaron las herramientas FASTQC: ReadQC tool v.0.51 (Andrews, S.F.), TRIMMOMATIC v.0.30 (Bolger et al., 2014) y PAL_finder v.0.02 (Rozen y Skalersky, 2000; Cock et al., 2009; Masella et al., 2012; Castoe et al., 2012) para ver la calidad de las secuencias, limpiarlas y buscar primers candidatos que se encuentren flanqueantes a los microsatélites. Se tomó en consideración que los motivos cuenten como mínimo con 3 nucleótidos de longitud y con al menos 8 unidades de repetición. Finalmente, se seleccionaron 27 loci con microsatélites

perfectos, cuyos motivos eran tetra y pentanucleótidos y que contaban con primers (forward y reverse) que solo sucedían una vez en toda la secuencia.

6.4 Selección y evaluación de primers

Para probar los 27 primers candidatos para microsatélites, se tomaron cinco muestras de ADN aleatorias de los individuos utilizados en este estudio y se procedió a realizar las amplificaciones. Se utilizó la enzima polimerasa proveniente de Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen) para las reacciones de PCR, considerando un volumen final de 10 µL. Las reacciones estaban compuestas de 9 µL PCR SuperMIX, 0.2 µM de primer forward, 0.2µM de primer reverse y 0.6 µL ADN (la concentración variaba de 40.08 a 58.38 ng/µL). Las condiciones para las amplificaciones, en base al protocolo de Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen), fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 29 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación por 30 segundos (la temperatura depende de cada par de primer), extensión a 72°C por 30 segundos y extensión final a 72°C por 10 minutos.

Posteriormente, para analizar los productos de PCR obtenidos se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñidos con 3 µL de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen). Se cargó, en el gel, 2µL de Bluejuice junto 3 µL de amplicón y 3 µL del marcador de peso molecular. Se realizó la corrida a 100 voltios por 30 minutos y se reveló el gel en el fotodocumentador Biorad Gel Doc XR.

6.5 Amplificación con primers marcados con fluoróforos

Por medio de Multiplex Manager (Hollele y Geerts, 2009) se agruparon los 16 primers seleccionados para realizar dúplex, los cuales fueron marcados con los fluoróforos

6-FAM y HEX (Tabla 2). Se utilizó la enzima Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen) y se consideró un volumen final de 20 µL. Las reacciones estaban compuestas de Buffer PCR 1X (Invitrogen), 1.65 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0.22 mM de dNTPs (Invitrogen), 0.2 µM de cada primer, 1 unidad de Taq Polimerasa Platinum (Invitrogen) y 0.6 µL de ADN. El perfil en el termociclador se mantuvo constante a lo utilizado en la fase de selección de primers con la excepción de la temperatura de hibridación, la cual se tuvo que volver a estandarizar.

El producto obtenido se colocó en cajas cubiertas con aluminio para evitar la exposición a luz. De este se ocupó 5 µL para realizar electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 100 voltios por 30 minutos y comprobar la presencia de bandas en las 117 muestras. El producto restante se guardó a -20°C.

Para mandar a secuenciar los productos de PCR de 116 individuos (se eliminó un individuo debido a que no amplificó en 10 loci de los 16 analizados) se utilizaron placas de 96 pocillos, en las cuales se cargaron 10 µL de los productos de amplificación. Se las tapó y envolvió en papel plástico y sobre éste, papel aluminio. Se enviaron las muestras al Laboratorio de Biología Analítica del Museo Nacional de Historia Natural en Washington, Estados Unidos, para el genotipado de las muestras por medio de secuenciador automático ABI PRISM 310.

6.6 Toma de datos y Análisis estadísticos

A partir del tamaño de los picos obtenidos (del genotipado) por medio del software GeneMapper® V. 3.0 (Applied Biosystems), se realizó una matriz alélica y con esta se realizaron los análisis. Los análisis se realizaron considerando a las dos regiones: Galápagos y Ecuador continental; seis ubicaciones geográficas: Santa Cristóbal, Santa

Cruz, Floreana, Norte, Centro y Sur; las doce localidades y las poblaciones según el potencial impacto humano. Se determinó la diversidad genética calculando el número de alelos por locus, número promedio de alelos por locus, el número de loci polimórficos, la heterocigocidad observada y esperada y el índice de Shannon. Todo esto se realizó por medio del complemento para Excel GenAlEx. 6.502 (Peakall, 2012). Por otro lado, para determinar la variación entre poblaciones e individuos se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA) y además se determinó el equilibrio de Hardy-Weinberg. Ambos análisis se hicieron por medio del software Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier et al., 1992). Se calculó la proporción de alelos nulos por medio de FreeNa (1000 replicaciones, Chapuis y Estoup, 2007) y el ligamiento por medio de GenePop (Raymond y Rousset, 1995). Para evaluar la diferenciación genética entre poblaciones, se utilizó el estadístico F_{st} (Weir y Cockerham, 1984) obtenido luego de la corrección por presencia de alelos nulos con el uso de FreeNa.

Posteriormente, se analizó la estructura genética por medio de métodos de asignación bayesiana a través del software Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Para esto, se tomaron en consideración los marcadores en equilibrio y que no estaban ligados. Se realizaron dos análisis, en el primero no se tomó en consideración el lugar de proveniencia de las muestras y en el segundo, se introdujo la información de las localidades. Para ambos se probaron valores de K (“ K = número supuesto de poblaciones”) de 1 a 5, con 15 iteraciones, 100,000 pasos de burning y 1,000,000 pasos de cálculo de Markov Chain Monte Carlo. El número de poblaciones óptimo se obtuvo mediante el método de Evanno (Evanno et al., 2005) procesado en el programa en línea Structure Harvester (Earl y von Holdt, 2012).

Por medio del software DARwin 6 (Perrier y Jacquemoud-Collet, 2006) se elaboró una matriz de distancia con el método de Simple Matching y con un total de 30,000

bootstraps. A partir de esta matriz se creó un análisis de componentes principales (PCoA) con métodos factoriales para determinar las relaciones genéticas de las poblaciones.

Finalmente, se usó BayesAss 3 (Wilson y Rannala, 2003) para determinar las tasas de migración. Se realizaron 4 corridas independientes, variando el valor semilla (10, 1000, 5000, 104656) para ver la consistencia de los resultados. Seguido, se determinó si las poblaciones habían pasado por un cuello de botella en un pasado reciente por medio Bottleneck 1.2.02 (Cornuet y Luikart, 1997), utilizando 10,000 iteraciones y la prueba estadística de Wilcoxon con los modelos mutacionales TPM (*Two phase model*; 70% de SMM) y SMM (*Stepwise mutational model*).

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de ADN y cuantificación

Se extrajo ADN de 118 muestras de *Thais melones* obteniéndose concentraciones que variaban de 1.5 ng/ μ L a 335.7 ng/ μ L. Los valores para las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, que demuestran la pureza del ADN, iban en rangos de 1.7-3.6 y 0.4-7.9, respectivamente. La muestra con concentración de 1.5 ng/ μ L de ADN se descartó para el resto del estudio. En cuanto a la integridad del ADN, se observaron bandas de alto peso molecular y sin fragmentación en geles de agarosa al 1.5%.

7.2 Selección y evaluación de primers

De los 27 pares de primers desarrollados para esta especie, se obtuvieron productos de amplificación con 16 primers, en los cinco individuos probados al azar. Con los primers restantes, no se logró amplificación alguna o si sucedía se observaban más bandas de las esperadas, lo que hacía que se eliminen para el estudio. Estos 16 primers se marcaron con

fluoróforos y se agruparon en parejas para realizar las reacciones de PCR con todos los individuos (Tabla 2).

7.3 Amplificación de regiones microsatélites con primers marcados con fluorescencia

Se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1.5% para comprobar la amplificación de los 8 dúplex en las 117 muestras. Existieron muestras con las que no se logró obtener productos, por lo que se les agregó BSA (1mg/ml) para aumentar eficiencia de la reacción y así conseguir amplificación. De tal manera, se logró obtener amplicones en las 117 muestras, pero se eliminó una muestra debido a que solo se logró amplificar con 10 de los 16 primers utilizados. Por otro lado, con la lectura de los electroferogramas se logró determinar el tamaño de los alelos en 13 loci. En los loci restantes no se tenía una clara imagen de los alelos reales debido a la aparición de picos artificiales en la mayor parte de las muestras, por lo cual fueron descartados para las siguientes etapas. Además, se eliminaron dos individuos debido a que no se lograron leer con exactitud los electroferogramas en 9 de los 11 loci. Por lo tanto, se realizaron los análisis restantes con 13 loci y 114 individuos.

7.4 Análisis de loci en equilibrio de Hardy-Weinberg, desequilibrio de ligamiento y frecuencia de alelos nulos

Al considerar las regiones, Galápagos y Ecuador continental, se encontraron 9 loci desviados significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg ($P < 0.0157$, Tabla 3), dos loci ligados (THM-10 y THM-12, $P < 0.010$) y la frecuencia de alelos nulos varió de 0.003 a 0.336 (Tabla 6). El nivel de significancia se modificó según la corrección de Benjamini y Yekutieli (2001). Por otro lado, al hacer los análisis en base a las 6 ubicaciones geográficas

(isla o latitud) se encontró que 8 de los 13 loci analizados se desviaron significativamente ($P < 0.0157$, Tabla 4) y dos loci se encontraban ligados (THM-11 y THM-12, $P < 0.010$). La frecuencia de alelos nulos varió de 0.011 a 0.373 (Tabla 7).

Por último, al considerar las poblaciones con alto y bajo potencial impacto humano, se encontró que 9 loci estaban desviados significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.0157$, Tabla 5) y 2 loci estaban ligados (THM-13 y THM-24, $P < 0.010$). La frecuencia de alelos nulos varió de 0.008 a 0.373 (Tabla 8).

7.5 Diversidad genética

Se obtuvo un total de 330 alelos para las 114 muestras en los 13 loci analizados. El número promedio de alelos por locus fue 23.15. Los 13 loci fueron polimórficos, el menos informativo fue el THM-7 con 9 alelos y el más informativo fue el THM-11 con 41 alelos. Ahora, al analizar las poblaciones según la región los valores de número promedio de alelos, índice de Shannon y heterocigocidad fueron similares (Tabla 9). Además, indican una alta diversidad teniéndose como promedio 18.6 alelos por locus, 2.41 en índice de Shannon, heterocigocidad observada de 0.65 y 0.86 en heterocigocidad esperada.

Por otro lado, al considerar las clasificaciones según impacto humano el promedio de alelos fue 18.54 para las de alto impacto y 17.46 para las de bajo impacto. El porcentaje de loci polimórficos fue de 100% para ambas clasificaciones. Además, el promedio de alelos privados fue 4.77 para las poblaciones con alto impacto y 3.69 para las poblaciones con bajo impacto. En cuanto al índice de Shannon, éste indicó una alta variabilidad entre los individuos. Para la población en general se obtuvo un valor de 2.5, para las poblaciones según impacto, alto y bajo, fue de 2.42 y 2.36, respectivamente (Tabla 11). Finalmente, la heterocigocidad observada difirió significativamente de la esperada ($P < 0.001$) tanto por regiones, como por impacto humano, siendo la primera menor que la segunda.

7.6 Diferenciación genética

A partir de las matrices de valores de F_{st} se compararon las distancias genéticas de las poblaciones considerando los distintos agrupamientos. Para la distancia genética de Weir (F_{st}) entre Ecuador continental y Galápagos se obtuvo un valor de 0.0017 (Tabla 13), para las seis ubicaciones geográficas se obtuvieron valores menores a 0.02 (Tabla 14) demostrando poca distancia genética entre las mismas.

En cuanto al análisis de AMOVA se realizaron agrupaciones a diferentes niveles, siendo el mayor Ecuador continental y Galápagos, seguido de las 6 ubicaciones geográficas y por último, las 12 localidades de muestreo. Se encontró variación significativa dentro de los individuos (74.6%) y entre los individuos dentro de las poblaciones (25.1%, Tabla 16). Lo mismo ocurrió al considerar las poblaciones de alto y bajo impacto humano, en donde el 79.1% de variación se dio dentro de los individuos y el 20,9% entre los individuos (Tabla 17).

7.7 Estructura poblacional

Para determinar la estructura poblacional se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) y un análisis de inferencia bayesiana. Los resultados del PCoA fueron consistentes con los obtenidos en los demás análisis. Se pudo ver que no existían agrupamientos claros entre los individuos, más bien se dio una distribución aleatoria (Figura 2). Todos los individuos procedentes de las diferentes ubicaciones geográficas se encontraban en todos los cuadrantes. Igualmente, si se considera las zonas con alto y bajo impacto humano, también se vio una distribución al azar de los individuos en todos los cuadrantes, no hubo agrupaciones en base a las clasificaciones (Figura 3).

Por otro lado, en cuanto a la estructura poblacional según el método bayesiano de Evano et al. (2005), se encontró que, tanto en el primero como en el segundo análisis, el valor óptimo de K era 2, (Tabla 17), y, mientras que en base al valor de $\ln P(K)$ otorgado

por el programa Structure, el mejor valor de K era 1 (Figura 4). La proveniencia de las muestras no dio información al modelo, el valor r obtenido en todas las corridas fue mayor a 1. No existe una estructura poblacional y esto concuerda con los resultados obtenidos en el PCoA, los individuos se agruparon en una sola población.

7.8 Cuellos de botella

Los resultados de los análisis de cuello de botella en un pasado reciente difirieron según la prueba estadística y el modelo utilizado. Al tomar en cuenta las regiones, ninguna ha pasado por un cuello de botella reciente, en base a los modelos mutacionales (Tabla 18). En cambio, si se toma la agrupación según las 6 ubicaciones geográficas se obtuvo que San Cristóbal y Santa Cruz presentaban exceso de heterocigocidad desviándose del equilibrio de mutación y deriva, con el modelo TPM. Estos resultados difieren al considerar el modelo más conservador SMM, en donde todas las poblaciones se encontraban en equilibrio mutación-deriva (Tabla 19).

7.9 Migración

Según los resultados de BayesAss se encontró que existe direccionalidad en el flujo de migración, siendo éste de Galápagos a Ecuador continental (Tabla 21). Ahora bien, al tomar en consideración los dos sitios por cada isla o latitud, no se encontró direccionalidad en la migración. Entre un 80 y 90% de los individuos son autoreclutas y del 10 al 20% migrantes (Tablas 22-26).

8. DISCUSIÓN

Al realizar estudios genéticos es importante contar con ADN de buena calidad (pureza e integridad) porque la amplificación se ve influenciada por la presencia de inhibidores provenientes de la muestra o de los reactivos utilizados, afectando la eficiencia

del proceso (Pereira et al., 2011). En este trabajo, el ADN que se extrajo no siempre cumplía este criterio. Aunque se tenían bandas de alto peso molecular y sin fragmentación, no se lograba tener buena pureza en ciertas muestras. Esto se reflejaba en los valores para las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230, que iban en rangos de 1.7-3.6 y 0.4-7.9, respectivamente. Si las muestras están por debajo de 1.8 en la relación 260/280 probablemente se deba a la presencia de contaminantes como fenoles y proteínas (Leonard, 2016) y si se encuentran por debajo de 2.0, en la relación 260/230, probablemente a contaminantes como residuos de fenol (proveniente del proceso de extracción), residuos de guanidina (usado en columnas, Thermo Scientific, S.F.), compuestos aromáticos, iones, entre otros. Por lo tanto, el protocolo de extracción no fue completamente eficiente y los problemas encontrados se pudieron dar por errores humanos y por la muestra en sí. Se conoce que la extracción de ADN en moluscos se dificulta debido a que se secretan sustancias como mucopolisacáridos y proteínas polifenólicas que se purifican junto al ADN y actúan como inhibidores, interfiriendo en las reacciones PCR (Pereira et al., 2011). No obstante, el uso del BSA permitió eliminar la acción de los inhibidores en aquellas muestras problemáticas, y así el ADN extraído sirvió para poder realizar las reacciones PCR y así continuar con el resto de la investigación.

En este estudio se desarrollaron 27 pares de primers, de los cuales solo se seleccionaron 16 para las fases de análisis debido a que los primers restantes presentaron inespecificidades, que muy probablemente se eliminaban al optimizar el proceso de PCR. Además, luego del genotipado se eliminaron dos loci y dos muestras debido a la dificultad en la lectura de los electroferogramas. Lograr una lectura precisa se complicó debido a la existencia de artefactos, alelos nulos, adenilación incompleta en el extremo 3', entre otros (Flores-Rentería y Krohn, 2013). Los artefactos se refieren a picos artificiales que se generan en las fases de amplificación o detección alélica. En este trabajo se encontraron:

bandas de repetición por el deslizamiento de la polimerasa en la amplificación, aumentando o disminuyendo una unidad, *pull-up* debido a un exceso del producto amplificado provocando saturación en el canal de detección y *spikes* que son picos con morfología de alelo real, pero de anchura menor y se repite en varios canales de fluorescencia (Ministerio de justicia, S.F.).

Por otro lado, se encontraron varios loci desviados del equilibrio de Hardy-Weinberg (Tablas 3-5) probablemente debido al muestreo, a factores biológicos, con las violaciones de los supuestos (se da selección, mezcla entre poblaciones, apareamiento no aleatorio) o por aparición de alelos nulos y el efecto Wahlund. Este último se puede observar a través de los loci, mientras que los alelos nulos son específicos de cada locus (Flores-Rentería y Krohn, 2013). En esta investigación, se encontró migración y una alta frecuencia de alelos nulos en varios loci (Tablas 6-8), lo que posiblemente sean las principales causas de las desviaciones. De igual manera, en estudios genéticos realizados en *Thais clavigera* (Hwang et al., 2009) y *Thais chocolata* (Gallardo-Escarte et al., S.F.), se encontraron desviaciones en el equilibrio Hardy-Weinberg atribuidos a la presencia de alelos nulos o al efecto Wahlund.

Los alelos nulos son alelos de un cierto locus que no amplifican en las reacciones PCR y causan que los heterocigotos sean considerados como homocigotos o que no exista amplificación alguna de un locus en ciertos individuos (Selkoe y Toonen, 2006). Los alelos nulos se pueden originar debido a mutaciones en el sitio de unión del primer, la competencia en la PCR en donde los alelos de menor tamaño se amplifican con mayor eficiencia en comparación a los más grandes (debido a baja concentración y calidad de ADN), y condiciones no ideales durante las reacciones PCR. Los moluscos constituyen uno de los grupos con alta frecuencia de alelos nulos y su presencia podría alterar los

resultados de los análisis genéticos como diferenciación, asignación poblacional y análisis parentales (Chapius y Estoup, 2007; Carlsson, 2008).

Los resultados de estas pruebas en esta investigación no se vieron afectados por el uso de loci con alta frecuencia de alelos nulos debido a que al no existir estructura poblacional los valores F_{st} no estuvieron sesgados, es decir fueron imparciales (Chapius y Estoup, 2007). En las pruebas de asignación, los alelos nulos reducen ligeramente la correcta asignación de individuos, pero esto probablemente no alterará el resultado global. La exactitud en las pruebas de asignación se verá más afectada por incremento en el grado de diferenciación y el número de loci empleados (Carlsson, 2008).

En cuanto a los análisis genéticos, se encontró que la variabilidad genética en los loci de los individuos analizados fue alta. Todos los loci fueron polimórficos y el número de alelos por locus varió de 9 a 41. Al considerar las agrupaciones geográficas se encontró que el promedio de alelos fue similar en la mayoría de las poblaciones, exceptuando las latitudes del Centro y del Sur, las cuales presentaron menor y mayor promedio de alelos (Tabla 10), respectivamente. Sin embargo, cabe recalcar que en estas poblaciones el número de individuos analizados fue distinto (Centro con 9 y Sur con 27) y por lo tanto, fue menor y mayor la cantidad de alelos que se pudieron encontrar. Por otro lado, el índice de Shannon indicó alta variabilidad entre los individuos y la heterocigocidad promedio esperada fue similar en todas las poblaciones, siendo en general de 0.831. La diversidad genética encontrada en este estudio fue mayor a lo reportado en un estudio en *Thais chocolata* ($H_e = 0.79$, número promedio de alelos por locus = 12), en donde evaluaron a 80 individuos para la caracterización de 12 nuevos microsatélites (Gallardo-Escarte et al., S.F.).

Se obtuvieron resultados similares al comparar las poblaciones con alto y bajo impacto humano. Se tuvo una alta variabilidad reflejada en el la heterocigocidad esperada,

número de alelos e índice de Shannon (Tabla 11), sin existir diferencias significativas entre la variación de los promedios entre ambas poblaciones ($P > 0.05$). La alta variabilidad encontrada podría responder a factores biológicos de la especie, por ejemplo las especies con alta fecundidad que liberan un gran número de huevos o juveniles al ambiente, tienden a mostrar mayor diversidad genética que las especies que producen menor cantidad de descendencia de un tamaño mayor (Ellegren y Galtier, 2016). *Thais melones* presenta una alta fecundidad (West, 1985) y en base a lo expuesto se predice que tenga una alta variabilidad. Por otro lado, se ha visto que también influye el tipo de desarrollo larval de la especie. En varios análisis genéticos realizados en gasterópodos con larva pelágica y sin larva pelágica, se ha encontrado una disminución de la diversidad genética en las especies con las larvas no pelágica. En un estudio realizado en *Hexaplex trunculus* (que tiene desarrollo directo) se ha encontrado baja variabilidad genética (González-Tizón et al., 2008).

Por otro lado, aunque genéticamente no se haya encontrado señales de los efectos de la explotación de la especie, fenotípicamente si han existidos cambios. En un estudio realizado en las mismas localidades de Santa Cruz, San Cristóbal y Esmeraldas, se ha encontrado que para Santa Cruz y Esmeraldas existe diferencias significativas en los tamaños de los individuos entre zonas con alto y bajo impacto humano, siendo mayor el tamaño en zonas con baja impacto (Ruffin y Brandt, en prep.; Vinueza y Brandt, datos no publicados). Por otro lado, aunque en San Cristóbal no se encontraron diferencias significativas en el tamaño del caracol, si existe la tendencia de que la población de bajo impacto presente tamaños mas grandes. Probablemente no existen señales en la diversidad genética, debido a que por factores de la historia natural, se tiende a tener mayor diversidad en este tipo de especies (como se explicó anteriormente). También, la explotación no es tan intensiva o las diferencias en los tamaños son consecuencias recientes a la explotación y

puede demorar un tiempo hasta que la fecundidad y variabilidad genética respondan a estos cambios. Por otro lado, debido al flujo génico entre las poblaciones, cualquier pérdida de alelos que se de, se puede recuperar. Sin embargo, a pesar de haber encontrado una alta variabilidad en las poblaciones de estudio, no se las debe dejar de monitorear ya que podrían estar presentando problemas graves debido a perturbaciones ambientales, sin mostrar indicios de su diversidad genética (Romiguier, et al., 2014).

En cuanto a las diferencias genéticas, los resultados mostraron que las distancias genéticas fueron mínimas entre las agrupaciones geográficas ($F_{st} < 0.02$) y entre las poblaciones con alto y bajo impacto humano ($F_{st} = 0.0003$). Estos resultados se equiparan con los de AMOVA, en donde no se observó variación en los distintos niveles de agrupación de poblaciones probados, sino dentro y entre individuos (Tabla 16). Equivalentemente, con los análisis de PCoA y Structure se encontró la ausencia de estructura genética (Figuras 2-4).

El modelo usado en el programa Structure asume que los loci se encuentran en equilibrio de Hardy Weinberg y de ligamiento, por lo tanto solo se emplearon 4 loci en el análisis y aunque fue un número bajo, no se encontró ningún indicio de estructura poblacional. Además, se utilizó la información del sitio de muestreo para ayudar al modelo, ya que ésta es útil cuando se tiene un bajo número de loci y muestras insuficientes que no representan las poblaciones (Putman y Carbone, 2014). El valor r obtenido fue mayor a 1, lo que implica que la información proporcionada fue poco informativa, siendo irrelevante para el modelo; no existía relación entre los lugares y la ascendencia. Además los valores de α obtenidos también fueron mayores a 1, lo que indica que la mayoría de los individuos se encontraban mezclados (Porrás-Hurtado et al., 2013).

En cuanto a la detección de grupos genéticos (K), se determinó con el método de Evanno et al. (2005), que el mejor valor era $K=2$, pero como se ve en la Figura 2 $K=1$ es el

resultado más apropiado para este caso debido a que obtuvo el mayor valor en el logaritmo de la probabilidad de K ($\ln(K)$). Además, el método de Evanno et al. (2005) no es útil para detectar a un solo grupo genético y las proporciones de asignación de cada individuo fueron simétricas, lo que indica que no existía estructura poblacional (Porras-Hurtado et al., 2013).

La poca diferenciación genética y escasa estructura puede ser explicada por la existencia de pocas barreras que impiden el flujo génico (Çiftci y Okumus, 2002), por el poco tiempo de separación o por la duración de la etapa larvaria de la especie. Este último factor se ha usado como una estimación de la capacidad de dispersión e intercambio entre poblaciones (Olivia, 2012). No existen registros sobre la duración de la etapa larvaria de *Thais melones*, pero se conoce que la especie cercana *Thais chocolata* tiene un tiempo de desarrollo larval de 4 meses (Romero et al., 2004) y *Thais clavigera*, de dos meses, lo que le da la el potencial de desplazarse largas distancias, con ayuda de las corrientes marinas, y mantener la conectividad entre las poblaciones geográficas de este estudio (Cowen et al., 2006; Xue et al., 2014). Guo et al. (2015) mencionan que la larga etapa larval de *Thais clavigera* puede facilitar el flujo genético entre poblaciones separadas 3700 km, ocasionado que exista baja estructura genética entre las mismas. Además, la escasa estructura poblacional hallada en esta investigación concuerda con lo encontrado en otros estudios de especies de moluscos que poseen un largo desarrollo larvario, alta diversidad genética y bajos niveles de diferenciación (Gardner et al., 2012; Olivia, 2012; Xue et al., 2014; Gu et al., 2015). Se debe considerar que no solo se puede predecir la estructura genética con el desarrollo de la etapa larvaria ya que hay factores que también influyen como el comportamiento larvario, requerimientos ecológicos y patrones de las corrientes (Piggott et al., 2008).

El flujo génico encontrado en este estudio mostró una direccionalidad asimétrica, de Galápagos a Ecuador continental (Tabla 21). Al analizar estos resultados con las corrientes que pasan entre Ecuador continental y Galápagos se ve que hay discrepancias, ya que se esperaría un flujo en sentido este a oeste y lo que se obtuvo, evidencia un flujo en sentido contrario. Se debe considerar que existen limitaciones con la prueba, ya que cuando se tiene una baja diferenciación ($F_{st} < 0.05$) es más difícil para el programa encontrar los resultados correctos. Por lo tanto, se deben realizar diferentes corridas, cambiando las condiciones iniciales, para ver si existe consistencia entre los resultados y escoger los valores que presenten menor desviación (Faubet et al., 2007). Aunque ciertamente se puede dar que los resultados de tasas de migración no sean exactos, se puede notar una direccionalidad asimétrica del flujo de migración, que fue consistente en todas las corridas independientes que se realizaron. Esta direccionalidad podría estar relacionada a los cambios que ocurren en las corrientes debido a la influencia del fenómeno del Niño en la región. En este caso, los vientos alisios que provienen del sureste se debilitan y por lo tanto las aguas superficiales ya no son empujadas por los vientos del este al oeste, por lo que el flujo de las mismas se podría invertir (INOCAR, S.F). Con esto, probablemente el flujo hacia el oeste disminuirá y prevalecerá aquel en dirección oeste-este existiendo consecuencias en la dirección e intensidad de dispersión larval (Kim et al. 2007).

En cuanto a los análisis de cuellos de botella, se ve que variaron según las pruebas utilizadas y el modelo de mutación asumido, logrando resultados no concluyentes. Además, se ve diferencias según las agrupaciones realizadas. Si se consideran las regiones, no se detectan cuellos de botella en un pasado reciente (Tabla 18), pero si se corren los análisis a una menor escala, considerando las islas o latitudes, sí hay señales de cuellos de botella (dependiendo del modelo mutacional, Tabla 19). Probablemente, a nivel de

regiones no se detecta debido a que se están agrupando diferentes poblaciones y aquellas poblaciones que no han pasado por un cuello de botella, enmascaran las señales de las que sí. Por otro lado, si se toma en cuenta los modelos de mutación, el más apropiado sería el TPM debido a que es un modelo más realista, se basa en la teoría de coalescencia y es un intermedio entre los modelos IAM (*Infinite alleles model*) y SMM (Di Rienzo et al, 1994). En el modelo SMM en cada mutación se genera un nuevo alelo, en donde se agrega o elimina una unidad de repetición. Este modelo se acopla más a los microsatélites, pero no en todos los casos (Putman y Carbone, 2014). Bajo un punto de vista más conservador se podrían tomar los resultados bajo este modelo y decir que ninguna población ha pasado por un cuello de botella reciente. Asimismo, se debe tener precaución al interpretar estos resultados, ya que se recomienda que el tamaño de las poblaciones sea de 15 a 40 individuos, para tener un alto poder estadístico (Piry et al., 1999).

9. CONCLUSIONES

- Se desarrollaron 27 primers para microsatélites, de los cuales 13 sirvieron en el estudio genético de las poblaciones de *Thais melones*.
- Existe un nivel alto de diversidad genética en los loci y poblaciones estudiadas de *Thais melones*, reflejado en la heterocigocidad, número de alelos promedio por locus e índice de Shannon. El mayor porcentaje de variabilidad se da dentro (74%) y entre los individuos (25%).
- No existe estructura genética. Hay conectividad entre las distintas poblaciones de estudio, probablemente debido a la existencia de una fase larval de larga duración. Los análisis de PCoA e inferencia bayesiana muestran escasa estructura poblacional. Todos los individuos estudiados se agrupan en una sola población.
- No existen diferencias genéticas entre las poblaciones de *Thais melones* con alto y bajo impacto humano debido a su explotación. Probablemente debido a la alta inmigración las poblaciones con alto impacto humano se recuperan.
- No existe diferencias genéticas entre las poblaciones de *Thais melones* debido a su ubicación geográfica.

10. RECOMENDACIONES

- Optimizar las condiciones de PCR para lograr amplificación con los loci descartados; además de realizar repeticiones de los experimentos para validar los resultados y determinar el porcentaje de error.
- Volver a realizar reacciones de PCR para los loci que mostraron alta frecuencia de alelos nulos. Si es que la frecuencia sigue siendo igual, secuenciar un mínimo de muestras para diferenciar entre los individuos que son verdaderamente homocigotos de los que son homocigotos por alelos nulos, para así modificar la secuencia del primer y la amplificación.
- Aumentar el número de individuos por población geográfica para tener un número de muestras equitativo e incrementar el poder estadístico de las pruebas genéticas.
- Realizar simulaciones con los datos obtenidos en esta investigación (niveles de diferenciación y frecuencias de alelos) para saber el número apropiado de loci e individuos por población, que permitan alcanzar un adecuado poder estadístico en futuras investigaciones.
- Realizar estudios de dinámica poblacional de *Thais melones* para tener información que permita comparar e interpretar los resultados de análisis genéticos.
- Realizar estudios de captura de *Thais melones* y de afluencia humana en los sitios de estudio para tener una mejor idea de la intensidad de su explotación.

11. REFERENCIAS

- Abdul-Muneer, P. M. (2014). Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies. *Genetics Research International*. doi: 10.1155/2014/691759
- Alvarado, J., Aburto-Oropeza, O., Abad, R., Barraza, E., Brandt, M., Cantera, J., ... Maté, J. (2017). Coral Reef Conservation in the Eastern Tropical Pacific. En Glynn et al. (eds.). *Coral Reefs of the World* 8. doi: 10.1007/978-94-017-7499-4_21
- Andrews, C. (2010). The Hardy-Weinberg Principle. *Nature Education Knowledge*, 3(10), 65.
- Andrews, S. (S.F). FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. *Barbara Bioinformatics*. Recuperado de <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Benjamini, Y. y Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *The Annals of Statistics*, 29(4), 1165-1188.
- Bolger, A., Lohse, M. y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Carlsson, J. (2008). Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. *Journal of Heredity*, 99(6), 616–623. doi:10.1093/jhered/esn048
- Castoe, T., Poole, A. de Koning, A., Jones, K., Tomback, D., Oyler-McCance, S., ... Smith, N. (2012). Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. *PLoS ONE*, 7 (2), e30953. doi:10.1371/journal.pone.0030953
- Chapius, M.P y Estoup, A. (2007). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3), 621-631.
- Çiftç, Y. y Okumus, İ. (2002). Fish Population Genetics and Applications of Molecular Markers to Fisheries and Aquaculture: I- Basic Principles of Fish Population Genetics. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2, 145-155.
- Cock, P., Antao, T., Chang, J., Chapman, B., Cox, C., Dalke, A., Friedberg, I, Hamelryck, T., Kauff, F., Wilczynski, B. et al. (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 25(11),1422–1423. doi:10.1093/bioinformatics/btp163
- Cornuet, J.M. y Luikart G. (1997). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144, 2001-2014.

- Cowen, R. y Sponaugle, S. (2009). Larval Dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science*, 1, 443-466.
- Cowen, R., Gawarkiewicz, G., Pineda, J., Thorrold, S. y Werner, F. (2007). *Oceanography*, 3(20), 14-21.
- Cowen, R., Paris, C. y Srinivasan, A. (2006). Scaling of connectivity in marine populations. *Science*, 311, 522-527. doi: 10.1126/science.1122039
- Cruz, M. (2013). Especies de moluscos submareales e intermareales y macrofauna bentónica de la Bahía de Manta, Ecuador. *Acta Oceanográfica del Pacífico*, 18(1), 101-115.
- Cruz, M., Gabor, N., Mora, E., Jiménez, R. y Mair, J. (2003). The known and unknown about marine biodiversity in Ecuador (continental and insular). *Gayana*, 67(2), 232-260.
- Di Rienzo, A., Peterson, A., Garza, J., Valdes, A., Slatkin, M. y Freimer, B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceeding of National Academy of Sciences USA*, 91, 3166-3170.
- Earl, Dent A. y vonHoldt, B. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361 doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Eguiarte, L., Aguirre, Jonás A., Jardón, L., Aguirre, E. y Souza, V. (2013). Genómica de Poblaciones: Nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la Genómica, y nada en Genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16(1), 42-56.
- Ellegren, H. y Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 7(17), 422-433. doi:10.1038/nrg.2016.58
- Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*, 14, 2611-2620.
- Excoffier, L. y Lischer, H. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Faubet, P., Waples, R. y Gaggiotti, O. (2007). Evaluating the performance of a multilocus Bayesian method for the estimation of migration rates. *Molecular Ecology*, 16, 1149-1166. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03218.x
- Flores-Rentería, L. y Krohn, A. (2013). Scoring microsatellite loci. En Kantartzi, S. (Ed.), *Microsatellites: Methods and Protocols*, 319-336. [Versión de Springer]. doi: 10.1007/978-1-62703-389-3_21

- Gallardo-Escarte, C., Valenzuela-Bustamante, M. y Haye, P. (S.F.). Isolation and characterization of 12 new microsatellite loci for Chilean rock shell *Thais chocolata* (Gastropoda: Muricidae). *Molecular Ecology Resources*. Recuperado desde <http://tomato.biol.trinity.edu/manuscripts/11-3/mer-10-0492.pdf>
- García, A. y Reguero, M. (2004). *Catálogo Ilustrado de Moluscos Gasterópodos del Golfo de México y Mar Caribe*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gardner, J., Bell, J., Constable, H., Hanna, D., Ritchie, P. y Zuccarello, G. (2012). Multi-species coastal marine connectivity: a literature review with recommendations for further research. *New Zealand Aquatic Environment and Biodiversity Report No. 58*.
- Gawarkiewicz, G., Monismith, S. y Largier, J. (2007). Observing Larval transport processes affecting population connectivity. Progress and challenges. *Oceanography*, 3(20), 40-53.
- González-Tizón, A., Fernández-Moreno, M., Vasconcelos, P., Gaspar, M. y Martínez-Lage, A. (2008). Genetic diversity in fishery-exploited populations of the banded murex (*Hexaplex trunculus*) from the southern Iberian Peninsula. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. doi:10.1016/j.jembe.2008.06.013
- Gu, Q., Husemann, M., Ding, B., Luo, Z. y Xiong, X. (2015). Population genetic structure of *Bellamyia aeruginosa* (Mollusca: Gastropoda: Viviparidae) in China: weak divergence across large geographic distances. *Ecology and Evolution*, 5 (21), 4906–4919.
- Guo, X., Zhao, D., Jung, D., Li, Q., Kong, L., Ni, G., ... Park, J. (2015). Phylogeography of the Rock Shell *Thais clavigera* (Mollusca): Evidence for Long- Distance Dispersal in the Northwestern Pacific. *PLoS ONE*, 10(7), e0129715. doi:10.1371/journal.pone.0129715
- Hickman, C. (1999). *A field guide to marine molluscs of Galápagos: an illustrated guidebook to the common intertidal and shallow-water snails, bivalves, and chitons of the Galápagos islands*. Lexington: Sugar Spring Press.
- Holleley, C. y Geerts, P. (2009). Multiplex Manager 1.0: a crossplatform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques*, 46(7), 511-517.
- Hwang, G., Mysung, C., Park, S., Song, S. y Maclean, N. (2009). Isolation and characterization of microsatellite loci from rock shell, *Thais clavigera*. *Permanent Genetic Resources Note*, 1227-1229.
- INOCAR. (S.F.). El Niño: generalidades. *Instituto Oceanográfico de la Armada*. Recuperado de http://www.inocar.mil.ec/modelamiento/elnino/nino_generalidades.php

- Kim, H., Kimura, S., Shinoda, A., Kitagawa, T., Sasai, Y. y Sasaki, H. (2007). Effect of *el niño* on migration and larval transport of the japanese eel (*Anguilla japonica*). *ICES Journal of Marine Science*, 64(7), 1387-1395.
- Kumar, P., Gupta, V., Misra, A., Modi, D. y Pandey, B. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2(4), 141-162.
- Kuo, C. y Janzen, F. (2004). Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*). *Conservation Genetics*, 5, 425-437.
- Lasso, S. y Escarabay, T. (2009). Ficha Informativa de los Humedales de Ramsar (FIR) Sitio Ramsar Parque Nacional Machalilla (Zona Marina). *Sistema Único de Información Ambiental. Ministerio del Ambiente*. Recuperado de [http://suia.ambiente.gob.ec/documents/783967/889253/Ficha+Ramsar+Parque+Nacional+Machalilla+\(Zona+Marina\).pdf/c80ebaca-dc58-41a7-8694-ba61bf3d2721](http://suia.ambiente.gob.ec/documents/783967/889253/Ficha+Ramsar+Parque+Nacional+Machalilla+(Zona+Marina).pdf/c80ebaca-dc58-41a7-8694-ba61bf3d2721)
- Leonard, D.(2016). *Molecular Pathology in Clinical Practice*. Estados Unidos: Springer.
- Li, Y., Korol, A., Fahima, T., Beiles, A. y Nevo, E. (2002). Microsatellite Evolution Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11, 2453–2465.
- MAE-SNAP-GEF. (2007). Sistema de monitoreo de la biodiversidad del Parque nacional Machalilla (PNM). Proyecto SNAP-GEF-MINISTERIO DEL AMBIENTE. Versión final.
- Masella, A., Bartram, A., Truszkowski, J., Brown, D. y Neufeld, J. (2012). PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 31. doi:10.1186/1471-2105-13-31
- Ministerio de Justicia (S.F). Anexo II: glosario de términos. Comisión nacional para el uso forense del ADN. *Portal Administración de justicia. España*. Recuperado de https://www.administraciondejusticia.gob.es/paj/PA_WebApp_SGNTJ_NPAJ/descarga/Glosario_Recomendaciones_Tecnicas_Perfiles_Mezcla_STRs.pdf?idFile=96899b42-5174-4c81-bace-ae529c0f0732
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2007). *Actualización del Diagnóstico del Parque Nacional Machalilla: elementos prioritarios de la diversidad biológica y cultural*. Proyecto GEF: Ecuador Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP-GEF). Quito.
- Molina, L., Chasiluisa, C., Murillo, J., Moreno, J., Nicolaidis, F., Barreno, J., Vera, M. y Bautil, B. (2004). Pesca blanca y pesquerías que duran todo el año, 2003. En: *Evaluación de las pesquerías en la Reserva Marina de Galápagos. Informe Compendio 2003*. Fundación Charles Darwin y Dirección Parque Nacional Galápagos, Santa Cruz, Galápagos, Ecuador.
- Morton, B. (Ed.).(1998). *The Marine Biology of the South China Sea III*. Hong Kong: Hong Kong University Press.

- Myra, A. (1971). *Sea Shells of Tropical West America: Marine Mollusks from Baja California to Peru*. Stanford: Stanford University Press.
- Novoa, J., Hooker, Y. y García, A. (2010). *Isla Foca, Guía de Fauna Silvestre*. Primera Edición. Naturaleza y Cultura Internacional - CONCYTEC. Piura-Perú.
- Okasha, S. (2015). Population Genetics. *The Stanford Encyclopedia of Philosophy*. Edward N. Zalta (ed.). Recuperado de <http://plato.stanford.edu/archives/fall2015/entries/population-genetics/>.
- Olivia, C. (2012). *Speciation, Connectivity and Self-Recruitment Among Mollusc Populations from Isolated Oceanic Islands*. (Tesis de doctorado, Universidad de Wellington). Recuperado de <http://researcharchive.vuw.ac.nz/xmlui/bitstream/handle/10063/2090/thesis.pdf?sequence=3>
- Orengo, D. (2002). *Fundamentos de Biología Molecular*. Barcelona: Editorial UOC.
- Palumbi, S. (2003). Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, 13(1), S146-S158.
- Peakall R. y Smouse, P. (2012). GenA1Ex 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
- Pereira, J., Chaves, R., Bastos, E., Leitão, A. y Guedes-Pinto, H. (2011). An Efficient Method for Genomic DNA Extraction from Different Molluscs Species. *Internal Journal of Molecular Sciences*. 12, 8086-8095. doi:10.3390/ijms12118086
- Perrier, X. y Jacquemoud-Collet, J.P. (2006). DARwin software <http://darwin.cirad.fr/>
- Piggott, M., Banks, S., Tung, P. y Beheregaray, L. (2008). Genetic evidence for different scales of connectivity in a marine mollusc. *Marine ecology progress series*, 365, 127-136. doi: 10.3354/meps07478
- Piry, S., Luikart, G. y Cornuet, J-M.(1999). Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *The Journal of Heredity*, 90(4), 502-503.
- Porras-Hurtado, L., Ruiz, Y., Santos, C., Phillips, C., Carracedo, A. y Lareu, M. (2013). An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. *Frontiers in Genetics*, 4, 1-98. doi: 10.3389/fgene.2013.00098
- Pritchard, J., Stephens, M. y Donnelly, P. (2000). *Essentials of conservation biology*. 4 ed. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc., Publishers.

- Putman, A. y Carbone, I. (2014). Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecology and Evolution*, 4(22), 4399–4428. doi: 10.1002/ece3.1305
- Ramanatha, V. y Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68, 1–19.
- Raymond M. y Rousset F.(1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenisms. *Heredity*, 86, 248-249.
- Rodríguez, R., Arroya, M., Freitas, D. y Braga, I. (2016). Tributyltin impacts in Galapagos Islands and Ecuadorian shore: Marine protected areas under threat. *Marine Policy*, 69, 24-31.
- Romero, M., Gallardo C. y Bellolio, G. (2004). Egg laying and embryonic-larval development in the snail *Thais* (Stramonita) *chocolata* (Duclos, 1832) with observations on its evolutionary relationships within the Muricidae. *Marine Biology*, 145, 681-692. doi: 10.1007/s00227-004-1368-9
- Romero, V. (2012). *Plan de negocios para la implementación de la ruta ecoturística comunitaria “Ruta del chola pescador”*. Universidad Internacional del Ecuador. Ecuador.
- Romiguier, J., Gayral, P., Ballenghien, M., Bernard, A., Cahaias, V., Chenuil, A., ... Galtier, N. (2014). Comparative population genomics in animals uncovers the determinants of genetic diversity. *Nature*. 515,261–263. doi:10.1038/nature13685
- Rozen, S. y Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.*, 132,365-386.
- Selkoe, K. y Toonen, R. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9,615-629.
- Templeton, A. (2006). *Population genetics and microevolutionary theory*. Estados Unidos: Wiley-Liss.
- Thermo Scientific. (S.F.). Assessment of Nucleic Acid Purity. T042-TECHNICAL BULLETIN. *NanoDrop*. Recuperado de <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
- Vinueza, L., Menge, B., Ruiz, D. y Palacios, D. (2014). Oceanographic and climatic variation drive top-down/bottom-up coupling in the Galápagos intertidal meta-ecosystem. *Ecological Monographs*, 84(3), 411–434.
- Weir, B. y Cockerham, C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370.
- West, L. (1985). *Prey Selection by the Tropical Snail Thais Melones: a study of the effects of interindividual variation and foraging experience on growth and gonad*

development. (Tesis de doctorado, Universidad Estatal de Oregón). Recuperado de <http://ir.library.oregonstate.edu/xmlui/bitstream/handle/1957/40770/WestLani1986.pdf?sequence=1>

- Wilson, G. y Rannala, B. (2003). Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, 163, 1177-1191.
- Xue, D., Wang, H., Zhang, T., Liu. (2014). Population Genetic Structure and Demographic History of *Atrina pectinata* Based on Mitochondrial DNA and Microsatellite Markers. *PLoS ONE*, 9(4), e95436. doi:10.1371/journal.pone.0095436
- Zobebe, G. y Negra, O. (2008). *Conchas y caracolas del mundo*. Bellaterra: Lynx Ediciones.

12. TABLAS

Tabla 1. Número de individuos de *Thais melones* colectados para el presente estudio, según la localidad en cada provincia. Además, se indica el potencial impacto humano en base a la cercanía de las localidades a las zonas pobladas.

Región	Isla (Galápagos) o Latitud (Continente)	Localidad	Potencial Impacto Humano	Número de muestras colectadas
Galápagos	San Cristóbal	Bahía Naufragio	Alto	10
		Rosa Blanca	Bajo	10
	Santa Cruz	Playa de los Perros	Alto	10
		Caamaño	Bajo	10
	Floreana	Montura	Alto	10
		Luz del día	Bajo	10
Ecuador continental	Norte	Estero de Plátano	Alto	10
		Playa Escondida	Bajo	9
	Centro	La Tiñosa	Medio	9
	Sur	La Entrada	Alto	10
		Machalilla	Medio	10
		La Playita	Bajo	10

Tabla 2. Primers desarrollados y seleccionados para el estudio genético de las poblaciones de *Thais melones* provenientes de Galápagos y Ecuador continental.

Locus	Secuencia (5'-3')	Motivo repetido	Fluoróforo	T (°C)	No. de alelos	Tamaño de alelos (pb)
THM-22	F: CAAACCAATCGATCAAACCAACCG	TTGG(32)	6-FAM	60	33	125-390
	R: CCCACTCTGCTCATTTCGATCCC					
THM-6	F: CCTGTCTGCATTGTGTTTCGTTTCCC	AGTGT(40)	HEX	60	24	101-234
	R: CAACACAAGACAACACGTCACGGC					
THM-7	F: CATTAAACCTGCCCTGTTCACCG	TGTGC(40)	6-FAM	64	9	138-186
	R: GCCGTGATGTGTCTTGTACTGTGGC					
THM-8	F: TGTGACAAGATAAGCTAAGTGATCAGGG	AGTGT(65)	HEX	64	12	131-185
	R: TGAGAAATCTGTCGTGACAGTAAGCG					
THM-9	F: TGGTAGCCTTCTGTAAGTGCTGTGGG	AATAC(55)	6-FAM	60	30	124-274
	R: GAAAAGCAGCCCAAAGTCCAGGC					
THM-19	F: AAACAAAGACCGATCATTCTGCC	TGCC(32)	HEX	60	14	126-178
	R: TCTGACGCTCTGTTGGTCTGCC					
THM-11	F: ACGCGATTTCTTAGGGAGAACAGCC	AATAC(50)	6-FAM	60	41	155-552
	R: AATGCTGTCTCTGATCACTGGCCC					
THM-12	F: GTGTTTGGGGTTCGTGTAGTGGG	TGTGG(65)	HEX	60	35	105-440
	R: GACACTTTACATGGTATACTCTTCAACGC					
THM-13	F: ACCATAAATCTGTCCCAGCAGAGCC	TCTG(52)	6-FAM	64	19	130-202
	R: ATGTGGGATCCTCAGATCGTGGC					
THM-10	F: AAATCTGTTGCTGTCAAGCTCTCCC	ATACC(40)	6-FAM	62	12	178-244
	R: CGACATACCATACTGTACCATAACAGACCC					
THM-21	F: AAGTACAATGACTTTATTTCCCTCCAGCCC	TCTG(32)	HEX	62	29	105-229
	R: GTCTTTGTACCTGTATATCTCTGCCACCCC					
THM-3	F: CCATACCACATCAGTCCACATAATGCC	TGTGG(50)	6-FAM	62	24	143-428
	R: CTGTCAGTAACAATCTGTGCGTGGC					
THM-24	F: TTTTCTTATGTCCAGCCCTCTGGG	ATCT(72)	HEX	62	34	120-240
	R: TCGTGTCTGATTGTCTACCTGCC					
THM-25	F: CGTCAGTCTGTTTCCTGTTTGCC	TCTG(36)	6-FAM	60	14	140-198
	R: AAAATCAGCAGATCAAGGGGC					

T: temperatura de hibridación.

Tabla 3. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg para las regiones de Galápagos y Ecuador continental, en *Thais melones*.

Región		Locus												
		THM-22	THM-7	THM-8	THM-11	THM-12	THM-19	THM-10	THM-13	THM-3	THM-24	THM-25	THM-6	THM-9
Galápagos	Ho	0.292	0.603	0.907	0.678	0.564	0.603	0.914	0.810	0.678	0.545	0.828	0.238	0.558
	He	0.955	0.633	0.871	0.959	0.907	0.879	0.829	0.918	0.910	0.960	0.847	0.884	0.786
	Valor p	0.000	0.750	0.728	0.000	0.000	0.000	0.250	0.009	0.000	0.000	0.446	0.000	0.000
Ecuador continental	Ho	0.468	0.709	0.920	0.667	0.633	0.593	0.836	0.873	0.655	0.709	0.787	0.282	0.558
	He	0.957	0.637	0.875	0.962	0.900	0.887	0.823	0.931	0.878	0.953	0.845	0.937	0.672
	Valor p	0.000	0.258	0.152	0.000	0.000	0.000	0.438	0.196	0.000	0.000	0.811	0.000	0.364

Ho: heterocigocidad observada; He: heterocigocidad esperada; valor p de significancia estadística (nivel de significancia 0.0157).

Tabla 4. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg considerando las seis ubicaciones geográficas, en *Thais melones*.

Ubicación geográfica		Locus												
		THM-22	THM-7	THM-8	THM-11	THM-12	THM-19	THM-10	THM-13	THM-3	THM-24	THM-25	THM-6	THM-9
San Cristóbal	Ho	0.308	0.650	0.950	0.650	0.389	0.400	0.900	0.789	0.850	0.611	0.850	0.235	0.636
	He	0.954	0.641	0.858	0.944	0.890	0.796	0.817	0.926	0.931	0.952	0.868	0.900	0.706
	Valor p	0.000	0.859	0.571	0.002	0.000	0.001	0.333	0.017	0.133	0.000	0.260	0.000	0.383
Santa Cruz	Ho	0.188	0.667	0.933	0.632	0.500	0.722	0.889	0.789	0.632	0.471	0.778	0.364	0.571
	He	0.933	0.695	0.897	0.962	0.871	0.871	0.810	0.926	0.898	0.955	0.837	0.870	0.778
	Valor p	0.000	0.140	0.762	0.000	0.000	0.008	0.253	0.042	0.007	0.000	0.331	0.000	0.043
Floreana	Ho	0.368	0.500	0.842	0.750	0.789	0.700	0.950	0.850	0.550	0.550	0.850	0.143	0.500
	He	0.942	0.586	0.868	0.945	0.923	0.912	0.847	0.908	0.891	0.969	0.803	0.786	0.840
	Valor p	0.000	0.131	0.808	0.008	0.002	0.035	0.542	0.444	0.000	0.000	0.876	0.000	0.000
Norte	Ho	0.438	0.632	1.000	0.647	0.588	0.684	0.684	1.000	0.684	0.632	0.842	0.417	0.467
	He	0.925	0.683	0.867	0.963	0.857	0.839	0.808	0.933	0.875	0.957	0.889	0.909	0.515
	Valor p	0.000	0.871	0.557	0.000	0.021	0.023	0.239	0.964	0.003	0.000	0.706	0.000	0.649
Centro	Ho	0.375	0.889	0.778	0.750	0.667	0.444	0.889	0.556	0.556	0.889	1.000	0.286	0.833
	He	0.942	0.699	0.843	0.925	0.889	0.902	0.771	0.876	0.863	0.948	1.000	0.934	0.818
	Valor p	0.000	0.737	0.428	0.029	0.216	0.001	0.458	0.020	0.040	0.491	1.000	0.000	0.469
Sur	Ho	0.522	0.704	0.920	0.654	0.652	0.577	0.926	0.889	0.667	0.704	0.741	0.200	0.545
	He	0.950	0.588	0.887	0.957	0.919	0.888	0.855	0.927	0.901	0.941	0.825	0.927	0.722
	Valor p	0.000	0.045	0.145	0.000	0.000	0.002	0.372	0.392	0.001	0.000	0.751	0.000	0.151

Ho: heterocigicidad observada; He: heterocigicidad esperada; valor p de significancia estadística (nivel de significancia 0.0157).

Tabla 5. Análisis del equilibrio de Hardy-Weinberg para las poblaciones, según su potencial impacto humano, en *Thais melones*.

Nivel de impacto humano		Locus												
		THM-22	THM-7	THM-8	THM-11	THM-12	THM-19	THM-10	THM-13	THM-3	THM-24	THM-25	THM-6	THM-9
Alto	Ho	0.310	0.612	0.955	0.660	0.512	0.592	0.878	0.896	0.714	0.612	0.854	0.355	0.512
	He	0.954	0.653	0.885	0.962	0.897	0.866	0.828	0.924	0.907	0.959	0.861	0.909	0.683
	Valor p	0.000	0.170	0.791	0.000	0.000	0.001	0.173	0.216	0.004	0.000	0.589	0.000	0.022
Bajo	Ho	0.447	0.681	0.907	0.667	0.644	0.638	0.872	0.813	0.667	0.614	0.792	0.184	0.516
	He	0.952	0.636	0.850	0.959	0.915	0.884	0.824	0.920	0.904	0.950	0.852	0.902	0.760
	Valor p	0.000	0.841	0.370	0.000	0.000	0.001	0.198	0.012	0.000	0.000	0.362	0.000	0.005

Ho: heterocigicidad observada; He heterocigicidad esperada; Valor p de significancia estadística (nivel de significancia 0.0157).

Tabla 6. Frecuencia de alelos nulos para las regiones de Galápagos y Ecuador continental de *Thais melones*.

Región	Locus												
	THM-22	THM-7	THM-8	THM-11	THM-12	THM-19	THM-10	THM-13	THM-3	THM-24	THM-25	THM-6	THM-9
Galápagos	0.336	0.003	0.000	0.141	0.181	0.145	0.000	0.054	0.120	0.208	0.000	0.341	0.127
Ecuador continental	0.247	0.000	0.000	0.150	0.133	0.153	0.009	0.023	0.108	0.120	0.015	0.334	0.108

Tabla 7. Frecuencia de alelos nulos considerando las seis ubicaciones geográficas de *Thais melones*.

Ubicación geográfica	Locus												
	THM-22	THM-7	THM-8	THM-11	THM-12	THM-19	THM-10	THM-13	THM-3	THM-24	THM-25	THM-6	THM-9
San Cristóbal	0.319	0.000	0.000	0.142	0.257	0.220	0.000	0.058	0.051	0.165	0.000	0.341	0.049
Santa Cruz	0.377	0.000	0.000	0.163	0.191	0.058	0.011	0.062	0.136	0.239	0.000	0.258	0.102
Floreana	0.287	0.041	0.000	0.086	0.066	0.110	0.000	0.028	0.163	0.208	0.000	0.352	0.170
Norte	0.242	0.000	0.000	0.151	0.132	0.056	0.051	0.000	0.088	0.154	0.000	0.244	0.061
Centro	0.213	0.000	0.000	0.151	0.122	0.158	0.000	0.000	0.103	0.109	0.038	0.370	0.127
Sur	0.271	0.000	0.000	0.054	0.096	0.231	0.000	0.138	0.149	0.000	0.000	0.317	0.000

Tabla 8. Frecuencia de alelos nulos para las dos poblaciones, según potencial impacto humano, de *Thais melones*.

Nivel de impacto humano	Locus												
	THM-22	THM-7	THM-8	THM-11	THM-12	THM-19	THM-10	THM-13	THM-3	THM-24	THM-25	THM-6	THM-9
Alto	0.326	0.008	0.000	0.154	0.201	0.147	0.000	0.014	0.099	0.173	0.000	0.288	0.113
Bajo	0.254	0.000	0.000	0.145	0.140	0.120	0.000	0.049	0.117	0.165	0.022	0.373	0.136

Tabla 9. Medidas de diversidad genética para las regiones de Galápagos y Ecuador continental de *Thais melones* utilizando 13 loci microsatelitales

Región		N	Na	Ne	I	No. Pa	Ho	He	F
Galápagos	Media	54.231	18.385	10.177	2.410	4.308	0.632	0.864	0.257
	ES	1.665	2.194	1.643	0.159	0.923	0.058	0.024	0.072
Ecuador continental	Media	50.385	18.846	10.299	2.413	4.769	0.668	0.857	0.206
	ES	1.452	2.178	1.676	0.159	0.975	0.058	0.028	0.064

N: número promedio de muestras; Na: número promedio de alelos; Ne: número promedio de alelos efectivos; I: índice de Shannon; No.pa: número de alelos privados; Ho: heterocigocidad observada; He: heterocigocidad esperada; F: índice de fijación; ES: Error estándar.

Tabla 10. Medidas de diversidad genética para las seis ubicaciones geográficas de *Thais melones* utilizando 13 loci microsatelitales.

Ubicación geográfica		N	Na	Ne	I	No. Pa	Ho	He	F
San Cristóbal	Media	18.154	11.462	7.857	2.128	1.154	0.632	0.836	0.230
	ES	0.815	1.060	1.014	0.130	0.317	0.066	0.027	0.083
Santa Cruz	Media	16.923	11.846	7.818	2.151	0.923	0.626	0.843	0.248
	ES	0.655	1.208	1.043	0.122	0.329	0.058	0.020	0.074
Floreana	Media	19.154	12.692	8.216	2.174	1.308	0.642	0.840	0.233
	ES	0.465	1.521	1.186	0.151	0.286	0.064	0.027	0.076
Norte	Media	17.385	12.000	7.681	2.118	1.308	0.670	0.823	0.177
	ES	0.605	1.144	1.119	0.137	0.365	0.052	0.033	0.059
Centro	Media	7.846	7.615	5.756	1.797	0.231	0.685	0.791	0.082
	ES	0.629	0.772	0.619	0.128	0.122	0.062	0.031	0.123
Sur	Media	25.154	14.538	8.934	2.280	2.308	0.669	0.851	0.198
	ES	0.659	1.500	1.145	0.145	0.559	0.054	0.029	0.072

N: número promedio de muestras; Na: número promedio de alelos; Ne: número promedio de alelos efectivos; I: índice de Shannon; No.pa: número de alelos privados; Ho: heterocigocidad observada; He: heterocigocidad esperada; F: índice de fijación; ES: Error estándar.

Tabla 11. Medidas de diversidad genética para las 10 poblaciones (según su potencial impacto humano) de *Thais melones* utilizando 13 loci microsatélites.

Población	Potencial impacto humano		N	Na	Ne	I	No.Pa	Ho	He	F
Bahía Naufragio	Alto	Media	9.462	8.538	6.015	1.876	0.538	0.641	0.799	0.189
		ES	0.312	0.798	0.679	0.116	0.268	0.070	0.028	0.086
Rosa Blanca	Bajo	Media	8.692	7.923	5.969	1.852	0.231	0.610	0.805	0.228
		ES	0.634	0.645	0.539	0.107	0.166	0.071	0.026	0.094
Playa de los Perros	Alto	Media	9.077	8.615	6.104	1.897	0.692	0.677	0.802	0.150
		ES	0.459	0.721	0.730	0.106	0.308	0.068	0.028	0.083
Caamaño	Bajo	Media	7.846	7.462	5.614	1.806	0.231	0.580	0.801	0.264
		ES	0.337	0.685	0.556	0.097	0.166	0.057	0.019	0.081
Montura	Alto	Media	9.462	9.154	6.786	1.972	0.462	0.642	0.820	0.212
		ES	0.312	0.912	0.841	0.122	0.183	0.065	0.025	0.080
Luz de Día	Bajo	Media	9.692	8.692	6.424	1.908	0.769	0.645	0.809	0.211
		ES	0.175	0.923	0.705	0.135	0.201	0.073	0.030	0.086
Estero del Plátano	Alto	Media	8.154	8.000	6.093	1.860	0.538	0.653	0.800	0.179
		ES	0.296	0.630	0.659	0.111	0.268	0.061	0.030	0.072
Playa Escondida	Bajo	Media	9.231	8.692	5.996	1.875	0.692	0.679	0.790	0.128
		ES	0.361	0.711	0.740	0.120	0.263	0.055	0.036	0.067
La Entrada	Alto	Media	9.154	8.923	6.340	1.946	0.923	0.636	0.818	0.226
		ES	0.373	0.729	0.648	0.101	0.288	0.064	0.022	0.074
La Playita	Bajo	Media	8.538	8.385	6.812	1.930	0.538	0.735	0.818	0.070
		ES	0.215	0.747	0.704	0.127	0.268	0.065	0.031	0.105

N: número promedio de muestras; Na: número promedio de alelos; Ne: número promedio de alelos efectivos; I: índice de Shannon; No.pa: número de alelos privados; Ho: heterociguidad observada; He: heterociguidad esperada; F: índice de fijación, ES: Error estándar.

Tabla 12. Medidas de diversidad genética para las dos clasificaciones (según su potencial impacto humano) de *Thais melones* utilizando 13 loci microsatelitales.

Nivel de Impacto Humano		N	Na	Ne	I	No. Pa	Ho	He	F
Alto	Media	45.308	18.538	10.083	2.415	4.769	0.651	0.859	0.233
	ES	1.447	2.027	1.637	0.150	0.928	0.057	0.027	0.068
Bajo	Media	44.000	17.462	9.647	2.362	3.692	0.649	0.860	0.232
	ES	1.463	2.156	1.428	0.158	0.936	0.053	0.025	0.070

N: número promedio de muestras; Na: número promedio de alelos; Ne: número promedio de alelos efectivos; I: índice de Shannon; No.pa: número de alelos privados; Ho: heterocigocidad observada; He: heterocigocidad esperada; F: índice de fijación. Machalilla y La Tiñosa no fueron considerados para estos análisis debido a su nivel intermedio de impacto humano.

Tabla 13. Matriz de distancia genética de Weir (Fst) entre las regiones de Galápagos y Ecuador continental, en *Thais melones*.

	Galápagos	Ecuador continental
Galápagos	0.0000	
Ecuador continental	0.0017	0.0000

Tabla 14. Matriz de distancia genética de Weir (Fst) entre las 6 ubicaciones geográficas de *Thais melones*.

	San Cristóbal	Santa Cruz	Floreana	Norte	Centro	Sur
Santa Cruz	0.00429	0.00000				
Floreana	0.00348	0.00223	0.00000			
Norte	-0.00344	0.00428	0.01047	0.00000		
Centro	0.00388	0.00118	0.00791	0.00705	0.00000	
Sur	0.00093	0.00460	0.00048	-0.00010	0.00279	0.00000

Tabla 15. Matriz de distancia genética de Weir (Fst) entre 10 poblaciones (según su potencial impacto humano) de *Thais melones*.

	Bahía Naufragio (alto impacto)	Rosa Blanca (bajo impacto)	Playa de los Perros (alto impacto)	Caamaño (bajo impacto)	Montura (alto impacto)	Luz del Día (bajo impacto)	Estero de Plátano (alto impacto)	Playa Escondida (bajo impacto)	La Entrada (alto impacto)
Rosa Blanca	0.0051	0.0000							
Playa de los Perros	0.0053	-0.0043	0.0000						
Caamaño	0.0329	0.0088	0.0178	0.0000					
Montura	0.0019	-0.0057	-0.0037	0.0125	0.0000				
Luz del Día	0.0155	-0.0056	0.0077	0.0017	-0.0101	0.0000			
Estero de Plátano	0.0063	-0.0088	-0.0069	0.0199	0.0032	0.0061	0.0000		
Playa Escondida	-0.0099	-0.0022	-0.0057	0.0257	0.0019	0.0121	-0.0056	0.0000	
La Entrada	0.0101	-0.0017	0.0010	0.0111	-0.0101	-0.0072	-0.0082	0.0041	0.0000
La Playita	-0.0023	-0.0069	-0.0037	0.0239	-0.0047	0.0026	0.0039	-0.0051	-0.0063

Tabla 16. Análisis de varianza molecular de individuos de *Thais melones* agrupados en distintos niveles. siendo el menor las 12 localidades de muestreo y el mayor Galápagos y Ecuador continental. Se muestran promedios de estadísticos F junto a la significancia estadística.

Niveles/ Fuente de variación	Entre grupos				Entre poblaciones dentro de grupos				Entre individuos dentro de poblaciones				Dentro de individuos			
	S.C	C.V	% v.	FCT (P)	S.C	C.V	% v.	FSC (P)	S.C	C.V	% v.	FIS (P)	S.C	C.V	% v.	FIT (P)
1 región (12 poblaciones)	-	-	-	-	80.317	0.01575	0.277	0.003(0.000)	647.590	1.425	25.149	0.252(0.00)	450.50	4.226	74.573	0.254(0.000)
6 regiones: isla o latitud	38.05	0.014	0.241	0.002(0.241)	42.263	0.004	0.064	0.001(0.397)	647.590	1.425	25.142	0.252(0.00)	450.50	4.226	74.553	0.254(0.000)
2 regiones: Ecuador continental vs Galápagos	7.678	0.002	0.040	0.000(0.391)	72.440	0.014	0.251	0.003(0.197)	647.590	1.425	25.142	0.252(0.00)	450.50	4.226	74.553	0.254(0.000)

S.C: suma de cuadrados; C.V: componentes de varianza; % v: porcentaje de variación; valor p de significancia estadística (nivel de significancia 0.05).

Tabla 17. Valores para la estimación de K óptima por medio del método de Evanno et al. (2005) a partir de los datos obtenidos en Structure Harvester de los individuos de *Thais melones*.

K	Repeticiones	Media LnP(K)	DesEst LnP(K)	Ln'(K)	[Ln''(K)]	Delta K
1	15	-1640.74	0.4926	-	-	-
2	15	-1653.35	865.83	-126.07	831.33	0.96
3	15	-1657.65	192.95	-429.33	120.67	0.06
4	15	-1663.15	199.19	-550.00	732.67	0.37
5	15	-1675.97	263.69	-128.27	-	-

K: número de agrupaciones; Media LnP(K): promedio del logaritmo natural de la probabilidad de los datos, dado un valor de K; DesEsta LnP(K): desviación estándar del logaritmo natural de la probabilidad de los datos, dado un valor de K; Ln'(K): derivada de primer orden de la probabilidad de los datos, dado un valor K; [Ln''(K)]: derivada de segundo orden de la probabilidad estimada de los datos, dado un valor K; Delta K: tasa de cambio del logaritmo de la probabilidad de los datos.

Tabla 18. Análisis de Probabilidad de exceso de heterocigocidad en base a la prueba de estadística de Wilcoxon y según diferentes modelos mutacionales para las regiones de Galápagos y Ecuador continental de *Thais melones*.

Región	Probabilidad de exceso de heterocigocidad	
	TPM	SMM
Galápagos	0.179	0.894
Ecuador continental	0.410	0.920

TPM: *Two phase model*. SMM: *Stepwise mutational model*. Nivel de significancia 0.05. si $p < 0.05$ la poblaciones no se encuentran en equilibrio de mutación y deriva, han pasado por un cuello de botella en el pasado reciente.

Tabla 19. Análisis de Probabilidad de exceso de heterocigocidad en base a la prueba estadística de Wilcoxon y según diferentes modelos mutacionales para las seis ubicaciones geográficas de *Thais melones*.

Ubicación geográfica	Probabilidad de exceso de heterocigocidad	
	TPM	SMM
San Cristóbal	0.021	0.486
Santa Cruz	0.017	0.515
Floreana	0.285	0.689
Norte	0.266	0.266
Sur	0.235	0.661

TPM: *Two phase model*. SMM: *Stepwise mutational model*. Nivel de significancia 0.05. si $p < 0.05$ la poblaciones no se encuentran en equilibrio de mutación y deriva. han pasado por un cuello de botella en el pasado reciente.

Tabla 20. Análisis de Probabilidad de exceso de heterocigocidad en base a la prueba estadística de Wilcoxon y según diferentes modelos mutacionales para las dos poblaciones (en base a su potencial impacto humano) de *Thais melones*.

Potencial impacto humano	Probabilidad de exceso de heterocigocidad	
	TPM	SMM
Alto	0.425	0.974
Bajo	0.212	0.999

TPM: *Two phase model*. SMM: *Stepwise mutational model*. Nivel de significancia 0.05. si $p < 0.05$ la poblaciones no se encuentran en equilibrio de mutación y deriva, han pasado por un cuello de botella en el pasado reciente.

Tabla 21. Estimación de tasas de migración entre las regiones de Ecuador continental y Galápagos, en *Thais melones*.

Origen	Destino	
	Galápagos	Continente
Galápagos	0.9946	0.3274
Continente	0.0054	0.6726

Tabla 22. Estimación de tasas de migración entre las 2 poblaciones de San Cristóbal, en *Thais melones*.

Origen	Destino	
	Bahía Naufragio	Rosa Blanca
Bahía Naufragio	0.843	0.2082
Rosa Blanca	0.157	0.7918

Tabla 23. Estimación de tasas de migración entre las 2 poblaciones de Santa Cruz, en *Thais melones*.

Origen	Destino	
	Playa de los Perros	Caamaño
Playa de los Perros	0.8961	0.1245
Caamaño	0.1039	0.8755

Tabla 24. Estimación de tasas de migración entre las 2 poblaciones de Floreana, en *Thais melones*.

Origen	Destino	
	Montura	Luz del Día
Montura	0.8322	0.1505
Luz de Día	0.1678	0.8495

Tabla 25. Estimación de tasas de migración entre las 2 poblaciones de Esmeraldas, en *Thais melones*.

Origen	Destino	
	Estero de Plátano	Playa Escondida
Estero de Plátano	0.7915	0.1398
Playa Escondida	0.2085	0.8602

Tabla 26. Estimación de tasas de migración entre las poblaciones de la playita y La Entrada ,en *Thais melones*.

Origen	Destino	
	La Entrada	La Playita
La Entrada	0.8885	0,1843
La Playita	0,1115	0,8157

13. FIGURAS



Figura 1. Mapa de las 12 localidades de estudio. Los puntos rojos indican los sitios muestreados. Arriba: Islas Galápagos. Abajo: Ecuador continental.

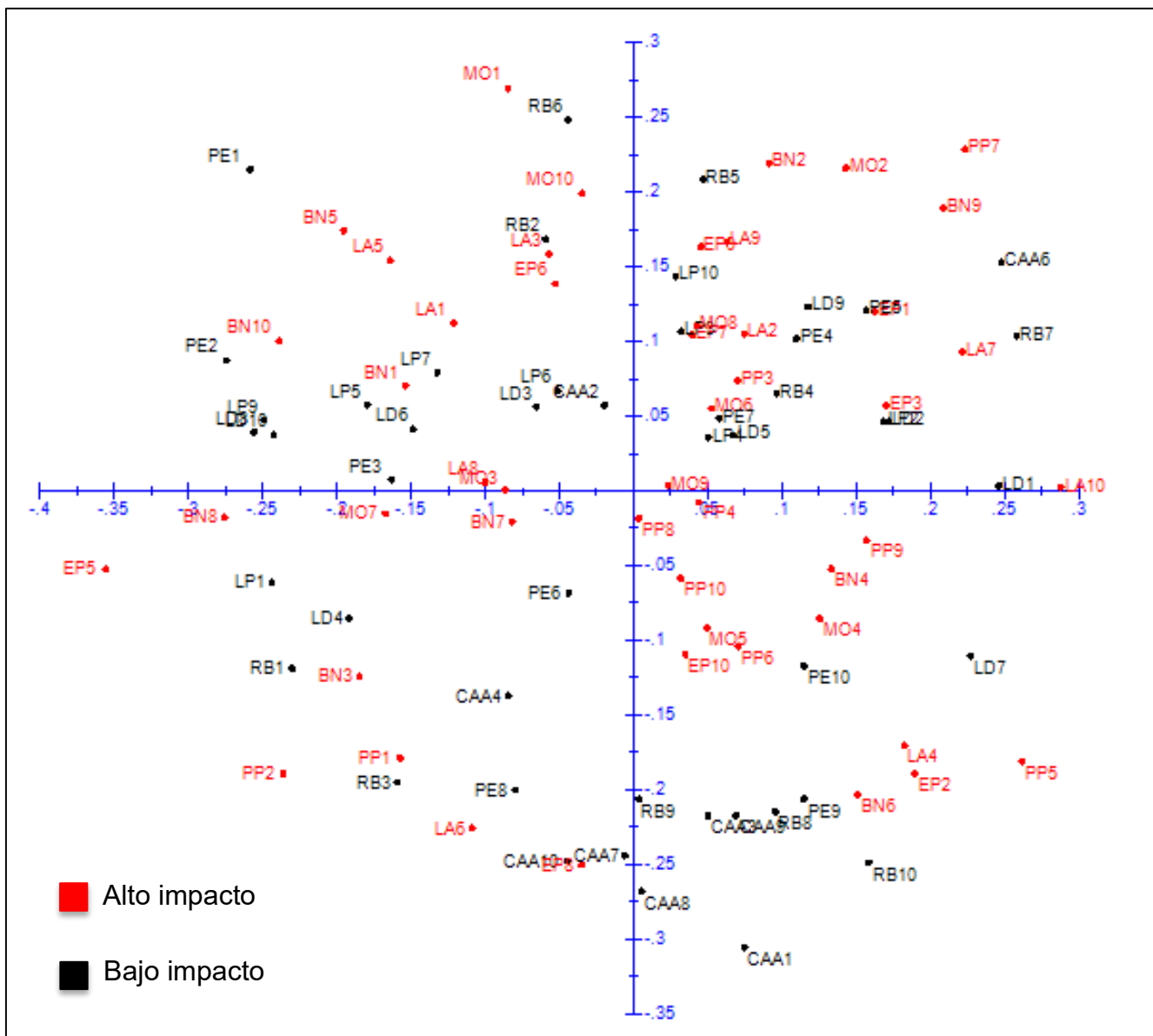


Figura 3 . Análisis de coordenadas principales (PCoA) en dos dimensiones, correspondiente a muestras de *Thais melones*. Se obtuvo de la matriz de disimilitud elaborada con 97 individuos y 13 loci. Las poblaciones se identifican de la siguiente manera: alto impacto humano (rojo) y bajo impacto humano (negro). Los individuos se encuentran dispersos en todos los cuadrantes, no existen agrupamientos según las poblaciones.

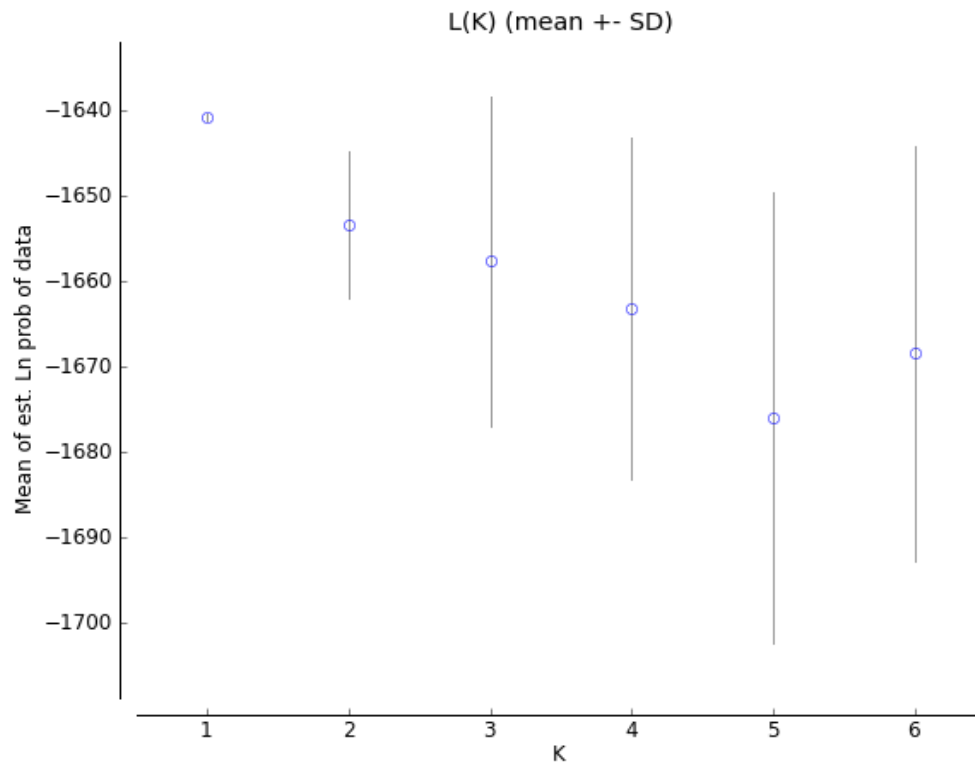
L(K)

Figura 3. Media de L(K) y varianza por cada valor K de a partir de los datos obtenidos en Structure Harvester de los individuos de *Thais melones*.