

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**  
**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Genética poblacional de dos especies de invertebrados  
marinos en la Reserva Marina de Galápagos**

**Pablo Daniel Quillupangui Jumbo**

**Biología**

Trabajo de titulación presentado como requisito del título de  
Biólogo

Quito, 23 de mayo de 2019

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**  
**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE CALIFICACIÓN**  
**DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Genética poblacional de dos especies de invertebrados marinos en la**  
**Reserva Marina de Galápagos**

**Pablo Daniel Quillupangui Jumbo**

Calificación:

Nombre del profesor, título académico:

Margarita Brandt, PhD.

Firma del profesor:

---

Quito, 23 de mayo de 2019

## 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: Pablo Daniel Quillupangui Jumbo

Código: 00109521

Cédula de identidad: 1725592040

Lugar y fecha: Quito, 23 de mayo de 2019

## DEDICATORIA

*A mi madre, Esperanza Jumbo por su apoyo durante toda mi carrera universitaria.*

## AGRADECIMIENTO

Agradezco incalculablemente a mi directora de tesis Margarita Brandt por darme la oportunidad de participar en este proyecto. Por la paciencia que ha tenido y por ayudarme durante todo el proceso. De igual manera, a Darío Cueva por la ayuda brindada durante el análisis de datos. A D. Griffiths y S. Preziosi, R por la colaboración en el desarrollo de primers para microsatélites. Al Programa de Diversidad Étnica (PDE) por la ayuda brindada durante toda mi carrera, por estar pendiente de mi progreso y por brindarme apoyo en momentos difíciles.

## RESUMEN

El churo blanco (*Hexaplex princeps*) y la zayapa (*Grapsus Grapsus*) son especies de invertebrados marinos con variable intensidad de extracción dentro de la Reserva Marina de Galápagos (RMG). *Hexaplex princeps* actualmente se encuentra en el calendario pesquero de la RMG mientras que *G. grapsus* no, sin embargo se conoce que es capturado como carnada o para consumo local. Ambas especies poseen historias de vida distintas en relación a la duración de su etapa pelágica larval. *Hexaplex princeps* es potencialmente un desarrollador directo, es decir carece de una etapa pelágica larval, mientras que *G. grapsus* posee al menos ocho etapas pelágicas zoeas que duran hasta dos meses como plankton. El objetivo de este estudio fue el de determinar si su extracción está teniendo algún impacto en su diversidad genética, así como el inferir los patrones de conectividad entre distintas poblaciones de la RMG. Esto se logró mediante el uso de marcadores microsatélites diseñados con la plataforma Illumina. Se analizaron 57 y 46 muestras a lo largo de seis localidades usando 6-13 marcadores para *H. princeps* y *G. grapsus*, respectivamente. Se encontró una diversidad genética ligeramente baja para *H. princeps* ( $He=0.47$ ) y moderada para *G. grapsus* ( $He=0.56$ ). En general, los índices *Fst* y *Nei* mostraron poca diferenciación genética entre localidades (0.2-0.39), sin embargo, los análisis de inferencia Bayesiana detectaron estructura poblacional únicamente para *H. princeps*: los linajes de dos localidades se diferenciaron entre sí. Interesantemente, los análisis de componentes principales revelaron que los individuos de *H. princeps* provenientes de sitios con altos afloramientos se agruparon entre sí y se diferenciaron de aquellos de sitios con bajos afloramientos. En general, concluimos que la extracción de estas especies aún no parece tener un impacto importante en su diversidad genética ya que las poblaciones se encuentran conectadas. Sin embargo, dado a que la extracción de *H. princeps* es más intensa, su dispersión larval podría ser limitada, y a que evidenciamos una diversidad genética ligeramente baja y una estructura poblacional, sugerimos ampliar geográfica y temporalmente este estudio y así aportar a los esfuerzos de su conservación en la RMG.

**Palabras clave:** afloramientos, conectividad, dispersión larval, invertebrados marinos, microsatélites

## ABSTRACT

The “Churo blanco” (*Hexaplex princeps*) and “Zayapa” (*Grapsus grapsus*) are two species of marine invertebrates with variable intensity of extraction in the Galapagos Marine Reserve (GMR). *Hexaplex princeps* is currently in the fishing calendar of the GMR, rather than *G. grapsus*, however, it is known to be caught as bait or for local consumption. Both species have a different larval life histories. *Hexaplex princeps* is potentially a direct developer, without a larval pelagic stage, whereas *G. grapsus* has at least eight *zoea* pelagic stages that last up to two months as plankton. The objective of this study was to determine if their extraction have an impact on its genetic diversity, as well as to infer the patterns of connectivity between different populations of the GMR. This was achieved through the use of microsatellite markers designed with the Illumina platform. I analyzed 57-46 samples over six locations using 6-13 markers for *H. princeps* and *G. grapsus*, respectively. A slightly low genetic diversity was found for *H. princeps* ( $H_e = 0.47$ ) and a moderate for *G. grapsus* ( $H_e = 0.56$ ). In general, the *Fst* and *Nei* indices showed little genetic differentiation between localities (0.2-0.39), however, Bayesian inference analyses detected genetic structure only for *H. princeps*: the lineages of two localities differentiated each other. Interestingly, principal component analyzes revealed that *H. princeps* individuals from sites with high upwelling were grouped together and differentiated from those from sites with low upwelling. In general, we conclude that the extraction of these species does not yet seem to have an important impact on their genetic diversity since the populations are connected. However, given that the extraction of *H. princeps* is more intense, its larval dispersion could be limited, and that we showed a slightly lower genetic diversity and a population structure, we suggest to expand this study geographically and temporally, and thus contribute to the efforts of its conservation in the GMR.

**Key words:** upwelling, connectivity, larval dispersal, marine invertebrates, microsatellites

## Tabla de contenido

Derechos de autor .....	3
DEDICATORIA .....	4
AGRADECIMIENTO .....	5
RESUMEN .....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUCCION.....	11
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo general .....	15
3. HIPÓTESIS .....	15
4. MÉTODOS.....	15
4.1. Sitios de estudio y obtención de muestras.....	15
4.2. Extracción y cuantificación de ADN.....	16
4.3. Desarrollo de marcadores microsatélites.....	17
4.4. Selección y evaluación de marcadores microsatélites.....	18
4.5. Amplificación con marcadores microsatélites con fluoróforos.....	19
4.6. Análisis de datos.....	19
4.7. Direccionalidad de Flujo génico.....	20
5. RESULTADOS .....	20
5.1. Diversidad Genética.....	21
5.2. Distancia genética entre poblaciones y estructura genética.....	22
5.3. Endogamia.....	22
5.4. Migración.....	23
6. DISCUSIÓN.....	23
6.1. Diversidad genética.....	23
6.2. Estructura poblacional.....	25
6.3. Endogamia.....	26
7. CONCLUSIONES.....	27
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	28
9. ANEXOS.....	30



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Número de individuos usados por islote y nivel de afloramiento para <i>Hexaplex princeps</i> .....	30
<b>Tabla 2.</b> Número de individuos usados por localidad e isla para <i>Grapsus grapsus</i> .....	30
<b>Tabla 3.</b> Resumen de marcadores microsatélites para <i>Hexaplex princeps</i> .....	31
<b>Tabla 4.</b> Resumen de marcadores microsatélites para <i>Grapsus grapsus</i> . .....	32
<b>Tabla 5.</b> Índices de diversidad genética por locus para <i>Hexaplex princeps</i> .....	33
<b>Tabla 6.</b> Índices de diversidad genética por locus para <i>Grapsus grapsus</i> . .....	33
<b>Tabla 7.</b> Índices de diversidad genética por islote para <i>Hexaplex princeps</i> .....	33
<b>Tabla 8.</b> Índices de diversidad genética por localidad para <i>Grapsus grapsus</i> . .....	34
<b>Tabla 9.</b> Índices de diversidad genética por régimen de afloramiento para <i>Hexaplex princeps</i> . .....	34
<b>Tabla 10.</b> Índices de diversidad genética por isla para <i>Grapsus grapsus</i> . .....	34
<b>Tabla 11.</b> Distancias genéticas (Fst) entre islotes para <i>Hexaplex princeps</i> . .....	34
<b>Tabla 12.</b> Distancias genéticas (Fst) entre localidades para <i>Grapsus grapsus</i> . .....	35
<b>Tabla 13.</b> Distancias genéticas (Fst) entre regímenes de afloramiento para <i>Hexaplex princeps</i> . .....	35
<b>Tabla 14.</b> Distancias genéticas (Fst) entre islas para <i>Grapsus grapsus</i> . .....	35
<b>Tabla 15.</b> Índices de Nei entre islotes para <i>Hexaplex princeps</i> . .....	35
<b>Tabla 16.</b> Índices de Nei entre localidades para <i>Grapsus grapsus</i> . .....	35
<b>Tabla 17.</b> Índices de Nei entre regímenes de afloramiento para <i>Hexaplex princeps</i> . .....	36
<b>Tabla 18.</b> Índices de Nei entre islas para <i>Grapsus grapsus</i> . .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) para <i>Hexaplex princeps</i> por islote...37	37
<b>Figura 2.</b> Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) para <i>Hexaplex princeps</i> por régimen de afloramiento. ....38	38
<b>Figura 3.</b> Análisis de estructura poblacional usando K=2 para a) <i>Hexaplex princeps</i> y b) <i>Grapsus grapsus</i> . ....38	38
<b>Figura 4.</b> Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) para <i>Grapsus grapsus</i> por localidad. ....39	39
<b>Figura 5.</b> Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) para <i>Grapsus grapsus</i> por isla.....39	39
<b>Figura 6.</b> Distribución de la media del coeficiente de endogamia ( $F_{bar}$ ) por locus para <i>Hexaplex princeps</i> . ....40	40
<b>Figura 7.</b> Distribución de la media del coeficiente de endogamia ( $F_{bar}$ ) por locus para <i>Grapsus grapsus</i> . ....40	40
<b>Figura 8.</b> Red de migración de <i>Hexaplex princeps</i> entre islotes.....41	41
<b>Figura 9.</b> Red de migración de <i>Grapsus grapsus</i> por localidad.....41	41
<b>Figura 10.</b> Red de migración de <i>Grapsus grapsus</i> por isla.....42	42

## 1. INTRODUCCION

Los invertebrados marinos bentónicos son uno de los grupos de los que se conoce poco, debido a su amplia diversidad. Se caracterizan por tener ciclos de vida complejos; en su mayoría poseen un estilo de vida pelágico durante su etapa larval, cuya duración varía dependiendo del grupo taxonómico, seguido de un ciclo de vida bentónico en donde se convierten en adultos aptos para la reproducción (Cowen & Sponaugle, 2009). La dispersión de los invertebrados marinos puede estar sujeta a la cantidad de tiempo que permanecen en la columna de agua como larvas o también por la influencia de eventos oceanográficos como las corrientes marinas (Weersing & Toonen, 2009), lo que conlleva a que poblaciones distantes presenten alta conectividad.

La conectividad poblacional puede definirse como la capacidad de intercambio de material genético entre individuos de la misma especie dentro del territorio en el que habitualmente se sitúa (Cowen & Sponaugle, 2009). Conocer como la conectividad se lleva a cabo en las Áreas Protegidas Marinas (APMs) tiene una implicación importante en el manejo y la conservación de poblaciones silvestres que con el tiempo se han visto afectadas por factores humanos como la sobrepesca.

Estudiar los procesos de dispersión y conectividad en especies de invertebrados marinos puede presentar un gran desafío para los investigadores debido a que resulta difícil marcar los diminutos propágulos y seguir sus trayectos de migración. Es por esto que se utilizan diferentes técnicas, como por ejemplo químicas que incluyen diferentes isótopos estables (Shanks, Grantham, & Carr, 2009). Actualmente, la ayuda de marcadores moleculares ha permitido que los estudios de genética de poblaciones sean más exhaustivos y de bajo costo. Entre ellos se destacan los microsatélites, las aloenzimas y el ADN mitocondrial (Thrope, Watts & Sole-Cava, 2000).

Una de las APMs más icónicas del mundo es la Reserva Marina de Galápagos (RMG), la cual comprende un total de cuarenta millas náuticas a partir de la base de las islas en el archipiélago. Fue consolidada como Reserva Marina en 1998 y finalmente declarada Patrimonio Natural de la Humanidad en 2001 por la UNESCO. Este archipiélago se encuentra influenciado por una gran red de corrientes marinas. Por un lado en dirección este-oeste se encuentra la corriente superficial Sur ecuatorial que es alimentada por la corriente Norecuatorial (Norte) y corriente de Humbolt (Sur) que son corrientes cálidas y frías respectivamente. Por otro lado, la subcorriente ecuatorial de Cronwell que es una de las más influyentes debido a su capacidad de esparcir aguas frías que promueven zonas de afloramiento que son fenómenos muy comunes debido al efecto topográfico de la plataforma del archipiélago (Piu-Guime, 2000).

Los recursos marinos dentro de la RMG han prometido ser un ingreso económico y de alimentación importante para el desarrollo de las islas sobre todo durante el siglo XX. Sin embargo, la demanda comercial ha crecido provocando que la pesca se intensifique gradualmente (Schiller, Alava, Grove, Reck, & Pauly, 2015). Uno de los recursos más notables en la historia de la RMG fue el pepino de mar que al ser extraído a partir del año 1994 produjo un cambio importante para la pesca artesanal así como para la especie, debido a que fue sometida a un proceso de extracción demasiado invasivo (Piu-Guime, 2000).

Aunque algunas especies son de alto interés económico, hay otras que no han alcanzado la misma importancia, pero que no pierden valor para los pobladores de las islas. Su captura se encuentra autorizada en el calendario pesquero de la RMG, en donde existen ciertas regulaciones para la mayoría de especies de interés comercial. Por ejemplo, su pesca puede estar disponible durante todo el año, tal es el caso para el pulpo (*Octopus spp*), los churos (*Hexaplex princeps* y *Pleroploca princeps*) y las canchalaguas (*Radsia goodali* y *R. sulcatus*). Sin embargo, no existen regulaciones más específicas para estas especies, como por ejemplo

un tamaño mínimo de captura, una cuota o una temporada de veda (Piu-Guime, 2000). Por otro lado, si existen regulaciones más específicas para otras especies. Por ejemplo la pesca del langostino (*Scyllrudes astori*), se permite desde el 1 de marzo de cada año hasta que empiece la temporada de las langosta roja y verde (*Panulirus penicillatus* y *P. gracilis*), y que dura seis meses generalmente desde Junio hasta Diciembre (Calendario pesquero 2016-2021).

Para este estudio se consideraron dos especies de invertebrados marinos con variable intensidad de extracción dentro de la RMG: *Hexaplex princeps* y *Grapsus grapsus*. *H. princeps* es una especie de molusco principalmente submareal que pertenece a la familia Muricidae. Su distribución va desde el golfo de California hasta Perú. Como se mencionó arriba, *H. princeps*, se encuentra en el calendario pesquero desde 2016, sin embargo su extracción reconocida en la RMG data desde mayo del año 1999, se ha evidenciado que la densidad poblacional de esta especie dentro del archipiélago de Galápagos es mayor en Floreana y menor en Isabela. Además, cuando se encuentra en época de reproducción suele formar pequeños agregados de entre varios individuos colocando sus huevos con forma de capsulas hexagonales (Chiriboga, 2002)

Por otro lado, la Zayapa *Grapsus grapsus*, es una especie de cangrejo marino proveniente de la familia Grapsidae con una amplia distribución que comprende el área tropical del Océano Atlántico y gran parte del área tropical oriental del Océano Pacífico, incluyendo las islas Galápagos (Teschima, Ströher, Firkowski, Pie, & Freire, 2016). Tanto la forma adulta como la juvenil del cangrejo suele encontrarse con regularidad en orillas rocosas. Esta especie no se encuentra en el calendario pesquero, sin embargo, se conoce, anecdóticamente, que los pescadores la han usado y la siguen usando como carnada o como suplemento de alimento durante sus jornadas de pesca (M Brandt, com. Pers).

A parte de presentar variable intensidad de extracción, estas especies de invertebrados marinos poseen historia de vidas muy diferentes. Los moluscos del orden Neogastropoda

poseen una larva plactónica (trocófora), seguida de una etapa larval juvenil (veliger) hasta ser un adulto completamente desarrollado (Saito-quezada et al., 2018). Sin embargo se sabe que una especie hermana, *H. trunculus*, carece de etapa pelágica larval, ya que su estrategia de reproducción comprende el desarrollo directo (Vasconcelos, Gaspar, Joaquim, Matias, & Castro, 2004). Dado que es común que las historias de vida se compartan entre diferentes especies de un mismo género, se podría inicialmente asumir que *H. princeps* también es un desarrollador directo y que podría presentar una dispersión potencialmente limitada.

El desarrollo larval de la familia Grapsidae es poco conocido. El ciclo completo ha sido estudiado a fondo para pocos miembros del género *Meopograpsus* y *Geograpsus lividus*, los cuales poseen un total de ocho etapas zoea y una megalopa, cuya duración en la columna de agua sobrepasa los dos meses (Calcagno, 2015). Se ha reportado que otras especies que se encuentran en estuarios intermareales poseen etapas adicionales durante el estado de zoea, entre estas se encuentran aquellas de las superfamilias Portunoidea, Xanthidea, Calappoidea, Parthenopoidea, Grapsoidea y Ocypodoidea (Cuesta, Guerao, Schubart, & Anger, 2011).

Dado que ambas especies tienen cierta presión de pesca por parte de los pobladores de las islas Galápagos, ya sea de tipo vivencial o comercial, y que poseen variable potencial de dispersión larval debido a sus historias de vida diferentes (bajo potencial para *H. princeps*, alto para *G. grapsus*), estas especies resultan ideales para estudiar el posible impacto que tiene su extracción, al igual que para entender los patrones de conectividad de poblaciones distantes y con eso inferir los patrones de dispersión larval.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Caracterizar la estructura genética de dos especies de invertebrados marinos de Galápagos con historias de vida diferentes y estimar el grado de conectividad entre poblaciones distantes para cada especie.

## 3. HIPÓTESIS

Debido a que *G. grapsus* posee etapas pelágicas larvales (zoea) que le permiten permanecer más tiempo en la columna de agua (intermareal) a diferencia de *H. princeps*, que potencialmente es un desarrollador directo, el grado de conectividad genética va a ser mayor en *G. grapsus* que en *H. princeps*. Por otro lado, dado que la captura de *H. princeps* es mayor que *G. grapsus*, se espera que el primero presente síntomas de pérdida de diversidad genética.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Sitios de estudio y obtención de muestras.

Con los permisos PC-43-14, 014-2014-IC-FAU-DPE-MA, PC-60-15 y MAE-DNB-CM-2016-0041 se colectaron un total de 116 muestras (60 individuos de *H. princeps* y 56 de *G. grapsus*) a lo largo de 6 localidades dentro de RMG en el año 2014 (Tablas 1 y 2). Al ser una especie submareal, las muestras de *H. princeps* fueron colectadas mediante buceo autónomo, mientras que las muestras de *G. grapsus* al ser una especie intermareal, fueron colectadas recorriendo la zona rocosa a pie. El tejido de los individuos fue preservado en etanol al 85% en proporción 3:1 (etanol: tejido).

## 4.2. Extracción y cuantificación de ADN.

El proceso de extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se extrajo y pesó aproximadamente 25 mg de tejido en una balanza analítica y se trituró al tejido con un bisturí hasta conseguir trozos de tejido más pequeños que se introdujeron dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml. Luego, se agregó 180 µl de buffer ATL y 20 µl de proteinasa K. Esta mezcla en conjunto con el tejido fueron colocadas en un termo bloque (Thermo Scientific Drybath Stdrd 1 block 100-120v) a 56°C acompañado de un proceso de agitación ocasional hasta que el tejido se encontrara completamente lisado (aproximadamente 5-6 hrs). Posteriormente, se añadió 200 µl de Buffer AL y se agitaron las muestras en un vórtex, se añadieron 200 µl de etanol (96%) y nuevamente se mezcló usando vórtex.

Luego, se pipeteó la muestra en una columna de centrifugado (DNeasy Mini Spin column + 2ml collection tube), se sometió a 10000 rpm por 1 min en una centrífuga Wisd Wisepin CF-10. Se descartó el tubo de colección con el contenido y la columna fue colocada en un nuevo tubo de colección. Luego, se añadieron 500 µl de buffer AW1, se centrifugó el contenido y al igual que antes se descartó el tubo colector con el contenido y nuevamente la columna de centrifugado fue colocada en un nuevo tubo de colección de 2 ml. Luego, se añadieron 500 ul de buffer AW2 a la columna de centrifugado y se centrifugó el contenido a 13, 500 rpm durante 4.5 min, se descartó el tubo de colección con el contenido y columna de extracción fue colocada en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se eluyó el ADN dentro de la columna mediante la adición de buffer AE en el centro de la membrana de la columna, se incubó por 1 min a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 10.000 rpm.

Con la intención de conseguir una mayor concentración de ADN la elución de ADN se llevó a cabo mediante 2 centrifugaciones, la primera usando solamente 80 µl de buffer AE



y la segunda usando 70  $\mu$ l de buffer AE. Originalmente se solicitaba adicionar 200  $\mu$ l de buffer AE y centrifugar una sola vez. Además, debido a que el modelo de centrífuga tenía una capacidad de rpm limitada, los procesos que requerían 14,000 rpm fueron adaptados a 13,500 rpm. En algunos casos el proceso de centrifugación fue ajustado de 6,000 rpm a 10,000 rpm debido a que durante la centrifugación la columna no permitía atravesar todo el líquido, en esos casos se volvía a centrifugar a 6,000 rpm. Finalmente, las muestras de *G. grapsus* en el paso final de elución con el buffer AE se centrifugaron a 13,500 rpm por 3 min y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo con el fin de recuperar la mayor cantidad de ADN.

### **4.3. Desarrollo de marcadores microsatélites.**

Los marcadores microsatélites para ambas especies fueron diseñados mediante el secuenciamiento del genoma utilizando la plataforma Illumina MiSeq con la construcción de librerías genómicas del kit Nextera. Se utilizó la metodología descrita previamente por Griffiths y sus colaboradores (2016), en la cual se utiliza la plataforma GALAXY para seleccionar diferentes loci microsatélites para que de manera automatizada se pudieran obtener primers para la amplificación de dichos loci.

Se seleccionaron preferentemente aquellos marcadores que contenían motivos entre tres y cinco pares de bases (pb) sobre los marcadores de motivo dinucleótido, debido a que estos últimos pueden presentar problemas durante la lectura de los picos. Se seleccionaron los 30 mejores marcadores candidatos y los primers fueron sintetizados para realizar pruebas de amplificación. Las pruebas de amplificación para aquellos primers cuyos productos tenían bandas inespecíficas consistieron en la aplicación de un gradiente de temperatura. Aquellos marcadores que amplificaron exitosamente, fueron sintetizados con los fluoróforos HEX y 6-FAM (Sigma-Aldrich) para realizar pruebas subsecuentes de amplificación y genotipado.

#### 4.4. Selección y evaluación de marcadores microsatélites.

Se realizaron ensayos con marcadores microsatélites en un gradiente de temperatura desde 47°C hasta 52.5°C, con el fin de conseguir una amplificación óptima de acuerdo al tamaño esperado. Se utilizó un volumen de 25 µl, una concentración de 1x de PCR buffer, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.50 µM de cada primer, 0.20 mM de dNTPs, 0.50 U/rxn (unidades/reacción) de Taq Platinum, y finalmente se aforó con agua de PCR, adicionalmente. Para *G. grapsus* se adicionó 0.05 mM de BSA.

Se llevó a cabo el siguiente protocolo de amplificación en dos termocicladores: el más grande con una capacidad de 96 muestras y el pequeño con una capacidad de 24 muestras. La temperatura inicial fue de 94°C durante 7 min, seguido de 55 ciclos a 72°C, cada ciclo durante 30 s. Luego se ajustó la temperatura de annealing (Ta-°C) dependiendo del marcador (Tablas 3 y 4). Los tamaños esperados posteriores a la amplificación fueron verificados mediante el uso de geles de agarosa con una concentración al 2% m/m para *H. princeps* y 2.5% m/m para *G. grapsus*. Finalmente se utilizó el sistema Enduro™ GDS Documentation System para capturar imágenes de los geles de agarosa.

En algunos casos el protocolo de amplificación tuvo que ser ajustado con las siguientes modificaciones: a) temperatura de annealing: para ciertos marcadores se tuvo que ajustar la temperatura de annealing más de una vez, para que los productos de amplificación vayan mejorando (Tablas 3 y 4); b) ciclos de amplificación: los ciclos de amplificación se ajustaron para que en conjunto con la temperatura de annealing se pudiera obtener más producto de PCR; y c) BSA: la lectura en gel de agarosa al 2.5% en *G. grapsus* mostraba bandas inespecíficas y barridos leves, por lo que se añadió 0.05 mM de BSA en 25 µl de reacción de PCR.

#### 4.5. Amplificación con marcadores microsatélites con fluoróforos.

Los marcadores microsatélites con fluoróforos fueron amplificados bajo la misma temperatura de annealing encontrada para los primers sin fluoróforos. En algunos casos la temperatura tuvo que ser ajustada varias veces debido a que la amplificación no era adecuada.

Para *H. princeps* se realizaron “Multiplex” usando 4-5 marcadores en una sola mix (Tabla 3) y para *G. grapsus* la amplificación se llevó a cabo mediante el uso de “dúplex” exceptuando GAP-5 y GAP-7 que fueron amplificados por si solos (Tabla 4). El emparejamiento de marcadores fue llevado a cabo usando Multiplex Manager v1.2. Los productos amplificados fueron colocados en placas de 96 pocillos, con el fin de disminuir costos para el genotipado. Las placas cargadas con productos amplificados en conjunto con una matriz en excel identificando cada pocillo fueron enviados al Laboratorio de Biología Analítica del Museo Nacional Smithsoniano de Historia Natural en Washington DC. El análisis de los picos se llevó a cabo usando Geneious®.

#### 4.6. Análisis de datos.

Para *H. princeps* se llevaron a cabo dos tipos de análisis: a) por islote y b) por régimen de afloramiento, con tres islotes por cada categoría (Tabla 1). Para *G. grapsus* los análisis fueron realizados igualmente de dos maneras, por localidad, habiendo dos localidades por isla y por islas, habiendo tres de ellas (Tabla 2).

Con el tamaño de los picos obtenidos usando Geneious® se crearon dos matrices distintas para los análisis estadísticos usando R Studio® Version 1.1.463: un formato GenePop y una matriz alélica para R Studio. Para calcular la diversidad genética de ambas especies se obtuvo el número de alelos por locus, las heterocigosidades observadas y esperadas, y la riqueza alélica; para esto se utilizó los paquetes *polysat* (Clark y Jasieniuk,

2011) y *DiveRsity* (Keenan et al., 2013). Además, los alelos privados fueron obtenidos con la ayuda del paquete *proprr* (Kamvar et al., 2014). Para determinar las distancias genéticas se estimaron los índices Weir & Cockerham *Fst* usando el paquete *hierfstat* (Goudet y Thibaut, 2015) y los índices de *Nei* usando el paquete *adegenet* (Jambart, 2008), este último también se utilizó para un análisis de endogamia en las poblaciones. Adicionalmente, se realizó un análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con la ayuda del paquete *ade4* (Dray & Dufour, 2007) y la estructura genética se evaluó usando métodos bayesianos con la ayuda del programa Structure 2.3.4.

#### **4.7. Direccionalidad de Flujo génico.**

El flujo génico en sistemas acuáticos es influenciado por fenómenos físicos, en este estudio el flujo génico de ambas especies se estimó usando el contenido DivMigrate (Sundqvist, Keenan, Zackrisson, Prodöhl, & Kleinhaus, 2016), dentro del paquete estadístico DiveRsity; el cual asume migración asimétrica entre poblaciones, a diferencia de los análisis de diferenciación genética *Fst* y *Nei*.

## **5. RESULTADOS**

Se analizaron un total de 57 muestras para *H. princeps* provenientes de seis localidades por régimen de afloramiento (Tabla 1). Inicialmente en *H. princeps* se habían colectado un total de 60 individuos, sin embargo, la amplificación de una muestra en Guy Fawkes, Rocas Gordon y una en Gardner no dio resultado por lo que se eliminaron del genotipado. Para *G. grapsus* se analizaron 46 muestras para seis localidades en tres islas diferentes (Tabla 2). Originalmente se colectaron 57 muestras, pero este número se redujo por la deficiente amplificación de cinco muestras en Caamaño, dos en Playa de los Perros y cuatro en Rocas

Gordon; se obtuvo un missing data de 13.71% y 12.64% respectivamente. Por otro lado, inicialmente se diseñaron para cada especie 30 pares de primers (Forward y Reverse) sin marcar, los cuales fueron evaluados con una temperatura de annealing de 55°C temperatura sugerida a la que deberían amplificar. De estos, únicamente amplificaron 13 para *H. princeps* y 16 para *G. grapsus*, por lo que fueron seleccionados y solicitados con sus respectivos fluoróforos. De todos los primers marcados se amplificó nuevamente el producto de PCR, los marcadores con fluoróforo para *H. princeps* no amplificaron en su mayoría pese a que se realizó un proceso de gradiente de temperatura desde 40°C hasta 52.5°C en intervalos de 2°C. Finalmente se seleccionaron únicamente seis marcadores para *H. princeps* y 13 marcadores para *G. grapsus*.

### **5.1. Diversidad Genética.**

El valor promedio de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) por locus para *H. princeps* fue 0.56 y moderadamente más alto para *G. grapsus* de 0.64; en ambos casos  $H_e$  es mayor a la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) (Tablas 5 y 6). Por islotes o localidad en cambio *H. princeps* posee una  $H_e$  moderadamente más baja de 0.47 y en *G. grapsus* es igual más baja con un valor de 0.56. Además por islote para *H. princeps*, la  $H_e$  es menor a la  $H_o$  (0.64). En promedio la riqueza alélica no difiere mucho para *H. princeps* y *G. grapsus*, sin embargo los alelos privados en promedio son mayores en *G. grapsus* (Tablas 7 y 8). Para *H. princeps* la  $H_e$  por nivel de afloramiento es igual a 0.52, mientras que la  $H_o$  es moderadamente alta con un valor de 0.65, la riqueza alélica es igual a 5.71 y el número de alelos privados es considerablemente mayor en sitios con alto afloramiento que en sitios con bajo afloramiento, con valores de 17 y 11 respectivamente (Tabla 9). Mientras que *G. grapsus* por isla se ha registrado que Floreana posee una  $H_e$  de 0.62 moderadamente más alta que las otras dos islas (Tabla 10). Sin embargo, en promedio tanto  $H_e$  como  $H_o$  no se diferencian mucho, los valores son de 0.59 y 0.55 respectivamente. De igual manera la riqueza alélica es 4.87, el

número de alelos privados es más grande en Floreana a diferencia de Santa Cruz y San Cristóbal (Tabla 10).

## 5.2. Distancia genética entre poblaciones y estructura genética.

Las distancias genéticas fueron no significativas entre islotes (*H. princeps*) o localidades (*G. grapsus*); los valores *Fst* permanecieron muy bajos para las dos especies (Tablas 11 y 12). Para *H. princeps* se obtuvo un rango de 0.02 – 0.19 por islote, e incluso valores un poco más bajos para *G. grapsus* por localidades de 0.04 – 0.13. Los mismos patrones se repiten por régimen de afloramiento para *H. princeps* (Tabla 13), así como por isla para *G. grapsus* (Tabla 14). De igual manera, los índices de *Nei* se mostraron bajos entre islotes, localidades, regímenes de afloramiento e islas, fluctuando entre 0.04 y 0.39 (Tablas 15-18).

Los análisis de coordenadas principales (PCoA) por islote en *H. princeps* muestran que León Dormido y Rocas Gordon se agrupan entre sí, mientras que el resto no (Figura 1). Interesantemente, cuando se realizan los PCoA por régimen de afloramiento, los individuos provenientes de sitios con altos afloramientos se agrupan entre sí y se distancian de aquellos con bajos afloramientos (Figura 2). Esto es consistente con los análisis Bayesianos de estructura poblacional  $K=2$  (Figura 3a). Por el contrario, para *G. grapsus* no existe una estructura poblacional ni entre localidades (Figura 4), ni entre islas (Figuras 3b y 5).

## 5.3. Endogamia.

La mayoría de valores *F* se encuentra distribuidos entre 0.2-0.3 para *H. princeps* (Figura 6), mientras que para *G. grapsus* éstos están entre 0.1-0.3 (Figura 7). Para *H. princeps* existen pocos valores superiores a 0.5, llegando hasta 0.8; mientras que para *G. grapsus* son aún mucho menos frecuentes, llegando únicamente hasta 0.5 (Figura 6 y 7).

#### **5.4. Migración.**

La red de migración relativa en *H. princeps* es muy fuerte desde Rocas Beagle hasta Champion, así como desde Guy Fawkes hasta Gardner (Figura 8); el resto de intercambios genéticos son moderados, siendo los más bajos entre Guy Fawkes y Rocas Gordon. Para *G. grapsus* los resultados indican una migración regular entre todas las localidades (Figura 9); el valor más alto registrado se encuentra entre Luz del Día en Floreana y Playa de los Perros en Santa Cruz. A nivel de islas el valor más alto se encuentra desde San Cristóbal a Floreana (Figura 10).

### **6. DISCUSIÓN**

#### **6.1. Diversidad genética.**

Los índices de diversidad genética por locus fueron moderadamente altos para *G. grapsus*, siendo seis marcadores para *G. grapsus* y 13 marcadores para *H. princeps* (Tabla 5 y 6); por localidad fueron más altos para *G. grapsus* al igual que el número de alelos privados, sin embargo los valores de riqueza alélica fueron moderadamente altos para *H. princeps* (Tablas 7-8). Por régimen de afloramiento en *H. princeps* la heterocigosidad esperada es moderadamente más alta en sitios de bajo afloramiento, en cambio la riqueza alélica y el número de alelos privados es mayor en altos niveles de afloramiento. Los niveles altos de diversidad genética en zonas de bajo afloramiento pueden estar siendo influenciados por varios procesos, por un lado el desarrollo larval está relacionado con la disponibilidad de nutrientes y la temperatura del agua, lugares con una alta cantidad de nutrientes facilitan el crecimiento y mejoran las condiciones de los propágulos, pero son susceptibles a la

depredación. En cambio en zonas con una baja disponibilidad de nutrientes el desarrollo es más lento, pero los niveles de depredación son más bajos (Cowen & Sponaugle, 2009).

La heterocigosidad esperada es la medida de diversidad genética en una población, toma en cuenta el locus medio de la población asumiendo que el apareamiento entre individuos es completamente al azar, en contraste, la heterocigosidad observada en cambio es el porcentaje de individuos heterocigotos observados que se evidencian dentro de una muestra de la población (Thrope, Watts & Sole-Cava, 2000). En este estudio, la heterocigosidad observada en ambas especies se encuentran en un rango moderado entre 0.47-0.64. *G. grapsus* posee heterocigosidades esperadas moderadamente más altas que *H. princeps* por locus y por localidad (islote) 0.56 y 0.47, respectivamente. El número de marcadores podría haber estado influenciando los datos obtenidos para *H. princeps* puesto que son aproximadamente la mitad que los que fueron usados para *G. grapsus*, esto se debe principalmente a que el trabajo con microsatélites se limita al requerimiento de una gran cantidad de loci microsatélites para conseguir una estimación de índices más confiables (Thrope, Watts y Sole-Cava, 2000).

Sin embargo, pese a haber obtenido este tipo de resultados se estima que *H. princeps* al ser una potencial especie de desarrollo directo sus poblaciones se encuentran limitadas geográficamente, puesto que la dispersión restringida provoca que las poblaciones (stock) sean bajas y vulnerables a la sobrepesca. Los estudios genéticos en gasterópodos son muy escasos, pero se estima que la diferenciación genética existente entre poblaciones está relacionada con la etapa larval (Thorpe, Watts & Sole-Cava, 2000; Weersing & Toonen, 2009). Por ejemplo, *Hexaplex trunculus* es una especie del mar Mediterráneo que posee una demanda comercial activa y debido a que posee un desarrollo directo, su capacidad de esparcimiento es limitada, por lo que su extracción afecta directamente el flujo genético entre poblaciones de distintos sitios (Marzouk, Chenuil, Aurelle, & Said, 2016). Mientras que por



otro lado *G. grapsus* el cual posee un estadio larvario de tipo pelágico que permanece mucho tiempo dentro de la columna de agua funcionando como medio principal de dispersión (Cowen & Sponaugle, 2009). En algunos casos la reducción de heterocigocidad puede estar directamente relacionada con la deriva génica la cual puede estar influenciada por sobreexplotación o también por el efecto Wahlund en el cual la reducción de heterocigotos se da por estructuras subpoblacionales (Saavedra, 2015).

## **6.2. Estructura poblacional.**

En primera instancia se ha podido estimar que para *H. princeps* el modelo de dos linajes explica mejor su estructura poblacional. El PCoA indica que las localidades de Rocas Gordon y León Dormido se diferencian del resto de islotes y de igual manera se puede evidenciar que este patrón se encuentra influenciado por el régimen de afloramiento (Figuras 1 y 2); el análisis de estructura poblacional corrobora esta diferencia entre islotes. Por otro lado, *G. grapsus* cuyo modelo indica un único linaje indica que las poblaciones se encuentran conectadas entre sí tanto por localidad como por isla (Figuras 4 y 5). Se estima que en entornos marinos existe una gran correlación entre el potencial de dispersión y la conectividad poblacional, debido a que la posición que muchos de estos propágulos adquieren en la columna de agua les permite aprovechar ventajas tales como la influencia de corrientes, la disponibilidad de nutrientes y el transporte para la evasión de depredadores, por lo que el movimiento de individuos es exitoso entre poblaciones y subpoblaciones permitiendo que éstas puedan considerarse demográficamente abiertas (Cowen & Sponaugle, 2009; Jones, Srinivasan, & Almany, 2011). Por lo tanto, *H. princeps* al ser una especie de potencial desarrollo directo se estima que su nivel de conectividad se encuentra altamente influenciado por su movilidad, mientras que para *G. grapsus* la columna de agua durante su etapa pelágica influye directamente en la conectividad que podría mantener entre localidades. Los valores *Fst* y *Nei* para ambas especies fueron muy cercanos a cero (Tabla 10-Tabla 18).

Pese a que los valores para *H. princeps* son muy bajos se pudo encontrar una estructura poblacional equivalente a dos linajes dentro del área de estudio, se estima que este fenómeno se debe principalmente a que el ciclo de vida de la especie es limitado en cuanto a dispersión, la conectividad entre individuos en zonas con bajo y alto afloramiento es limitada (Figuras 1 y 3b). Los resultados de *G. grapsus* son consistentes con otros estudios que se han llevado a cabo con especies emparentadas como *Pachygrapsus marmoratus* que posee seis etapas zoea y se mantiene un mes dentro de la columna de agua, fue estudiada en una zona de transición dentro del mar Mediterráneo (estrecho Siculo-Tunisian) que se conoce forma una barrera importante que ha interrumpido el flujo génico de muchas otras poblaciones, no se encontró estructura poblacional y se estima que se debe a la dispersión pasiva de su larva plantónica limitando la formación de subestructura poblacional (Deli et al., 2016).

### **6.3. Endogamia.**

Los eventos de endogamia son muy bajos para *H princeps*, en su mayoría se encuentran entre 0.2 y 0.3 de valor F, aproximadamente menos de cinco individuos se encuentran entre 0.6 y 0.8 de valor F (Figura 6). Por otro lado, la mayoría de individuos en *G. grapsus* se encuentran entre 0.1 y 0.2, mientras que únicamente se encontraron dos individuos entre 0.5 y 0.6 del valor F. La pérdida de diversidad genética y la acumulación de mutaciones suelen ser reacciones comunes en poblaciones pequeñas que se han expuesto a fenómenos de endogamia, este puede disminuir la heterocigocidad de la población reduciendo su fitness. En este estudio los fenómenos de endogamia se mantienen en su mayoría por debajo de 0.5 lo que representa una muy baja probabilidad de endogamia dentro de las localidades o islotes para ambas especies (Neaves et al., 2015).

Los procesos de endogamia se presentan en poblaciones que poseen un tamaño efectivo poblacional muy bajo (Serna-Lagunes & Díaz-Rivera, 2017). *H. princeps* al ser una especie

de potencial desarrollo directo posee territorios reducidos y por tanto la probabilidad de eventos de endogamia es más alta, provocando depresión genética. La demanda comercial del Caracol *H. princeps* podría verse envuelta en procesos de endogamia si las poblaciones enfrentan una fuerte presión extractiva. Por ejemplo, el caracol rosado *Strombus gigas* es una especie con alta demanda en el Caribe, la reducción de su población debida principalmente a la sobrepesca ha reducido su tamaño efectivo poblacional registrado a partir de una desviación significativa en el equilibrio Hardy-Weinberg o a la mezcla de individuos de varias poblaciones (Zamora-Bustillos et al, 2011).

## 7. CONCLUSIONES

Se estima que las especies no presentan una gran influencia por los niveles actuales de captura; los índices de diversidad genética se mantienen moderados. Las distancias genéticas entre localidades para ambas especies son mínimas, los valores *Fst* resultaron bastante bajos e indican que las poblaciones poseen intercambio de individuos, lo suficientemente fuerte como para no caer en fenómenos de endogamia. En *H. princeps* por ejemplo se pudo estimar que pese a que el modelo de dos linajes explica mejor su estructura poblacional no existe una mayor pérdida en su diversidad genética. Sin embargo, se sugiere que se aumente el área de estudio y el número de primers para cada especie, de tal manera que la lectura de picos sea confiable para los análisis posteriores.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Calcagno, J. A. (2015). *BRACHYURA*. (January 2014). *Calendario pesquero 2016 2021*. (2016).
- Clark, L., & Jasieniuk, M. (2011). Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 562–566. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x>
- Cowen, R. K., & Sponaugle, S. (2009). Larval Dispersal and Marine Population Connectivity. *Annual Review of Marine Science*, 1(1), 443–466. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163757>
- Cuesta, J. A., Guerao, G., Schubart, C. D., & Anger, K. (2011). *Morphology and growth of the larval stages of Geograpsus lividus ( Crustacea , Brachyura ), with the descriptions of new larval characters for the Grapsidae and an undescribed setation pattern in extended developments*. 240(July), 225–240. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2010.00482.x>
- Deli, T., Fratini, S., Ragionieri, L., Said, K., Chatti, N., & Schubart, C. D. (2016). Phylogeography of the marbled crab *Pachygrapsus marmoratus* (Decapoda, Grapsidae) along part of the African Mediterranean coast reveals genetic homogeneity across the Siculo-Tunisian Strait versus heterogeneity across the Gibraltar Strait. *Marine Biology Research*, 12(5), 471–487. <https://doi.org/10.1080/17451000.2016.1154972>
- Dray, S., & Dufour, A. B. (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22(4), 1–20.
- Goudet, J., & Thibaut, J. (2015). Hierfstat: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=hierfstat>
- Gelin, A., & Gravez, V. (2002). Las aguas Costeras En: Reserva Marinade Galápagos. *Reserva Marina de Galápagos. Línea Base de La Biodiversidad*, 119–145.
- Gil Saavedra, J. A., & Andrés, J. (2015). *Identificación de microsatélites polimórficos por ampliación cruzada en anadara similes (mollusca: Arcidae) [recurso electrónico]*. 1–18. Retrieved from <http://bibliotecadigital.univalle.edu.c>
- Jambart, T. (2008). Aegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24, 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129o/handle/10893/7973>
- Jones, G., Srinivasan, M., & Almany, G. (2011). Population Connectivity and Conservation of Marine Biodiversity. *Oceanography*, 20(3), 100–111. <https://doi.org/10.5670/oceanog.2007.33>
- Kamvar, Z. ., Tabarima, J. ., & Grünwald, N. . (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *Peer J*, 2, 281.
- Keenan, K., McGinnity, P., Cros, T. ., & Crozier, W. (2013). DiveRsity: An R package for the estimation of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>
- Marzouk, Z., Chenuil, A., Aurelle, D., & Said, K. (2016). *Genetic diversity and population structure of the banded Murex , Hexaplex trunculus ( Linnaeus , 1758 ) across the Siculo-Tunisian Strait Genetic diversity and population structure of the banded Murex , Hexaplex trunculus ( Linnaeus , 1758 ) across the Si*. (July 2017).
- Neaves, L. E., Eales, J., Whitlock, R., Hollingsworth, P. M., Burke, T., & Pullin, A. S. (2015). The fitness consequences of inbreeding in natural populations and their implications for species conservation - A systematic map *Children's Environmental*

- Health. *Environmental Evidence*, 4(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13750-015-0031-x>
- Piu-Guime, M. (2000). La Reserva Marina de Galápagos. *Informe Galápagos 1999-2000*, 8–14.
- Saito-quezada, V. M., Uría-galicia, E., Gómez-márquez, J. L., Bertha, A., Jiménez-badillo, M. D. L., Salgado-ugarte, I. H., ... Posgrado, C. De. (2018). *Reproductive cycle of Hexaplex princeps ( Broderip , 1833 ) from one artisanal fishery at the southern coast of Mexico*. 46(1), 91–103. <https://doi.org/10.3856/vol46-issue1-fulltext-11>
- Schiller, L., Alava, J. J., Grove, J., Reck, G., & Pauly, D. (2015). The demise of Darwin's fishes: Evidence of fishing down and illegal shark finning in the Galápagos Islands. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 25(3), 431–446. <https://doi.org/10.1002/aqc.2458>
- Serna-Lagunes, R., & Díaz-Rivera, P. (2017). Variación genética y conservación de una población de *Crocodylus moreletii* en cautiverio. *Acta Zoológica Mexicana (N.S.)*, 27(3), 547–563. <https://doi.org/10.21829/azm.2011.273773>
- Shanks, A. L., Grantham, B. A., & Carr, M. H. (2009). Propagule Dispersal Distance and the Size and Spacing of Marine Reserves Published by : Ecological Society of America PROPAGULE DISPERSAL DISTANCE AND THE SIZE AND SPACING OF MARINE RESERVES. *America*, 13(1), 159–169.
- Sundqvist, L., Keenan, K., Zackrisson, M., Prodöhl, P., & Kleinhans, D. (2016). Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecology and Evolution*, 6(11), 3461–3475. <https://doi.org/10.1002/ece3.2096>
- Teschima, M. M., Ströher, P. R., Firkowski, C. R., Pie, M. R., & Freire, A. S. (2016). Large-scale connectivity of *Grapsus grapsus* (Decapoda) in the Southwestern Atlantic oceanic islands: integrating genetic and morphometric data. *Marine Ecology*, 37(6), 1360–1372. <https://doi.org/10.1111/maec.12347>
- Thorpe, P. P., Solé-Cava, & Watts, P. C. (2000). Exploited marine invertebrates: genetics and fisheries. *Hidrobiologia*. 420, 165-184.
- Vasconcelos, P., Gaspar, M. b., Joaquim, S., Matias, D., & Castro, M. (2004). Spawning of hexaplex (trunculariopsis) trunculus (gastropoda: muricidae) in the laboratory: Description of spawning behaviour, egg masses, embryonic development, hatchling and juvenile growth rates. *Invertebrate Reproduction and Development*, 46(2–3), 125–138. <https://doi.org/10.1080/07924259.2004.9652616>
- Weersing, K., & Toonen, R. J. (2009). Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, 393, 1–12. <https://doi.org/10.3354/meps08287>
- Zamora-Bustillos et al. (2011). Diversidad genética de dos poblaciones del caracol *Sg* en Yucatan, Mexico con mictosatelite. *Revista de Biología Tropical*, 59(3), 1127–1134.

## 9. ANEXOS

### TABLAS

**Tabla 1.** Número de individuos usados por islote y nivel de afloramiento para *Hexaplex princeps*.

Nivel de afloramiento	Islote	Número de individuos	Coordenadas
Bajo	Rocas Beagle	10	-0.419230, -90.629480
	Guy Fawkes	9	-0.515605, -90.526189
	Champion	10	-1.236933, -90.387480
Alto	Gardner	10	-1.244562, -90.484330
	León Dormido	10	-0.808860, -89.496309
	Rocas Gordon	8	-0.566695, -90.141869

**Tabla 2.** Número de individuos usados por localidad e isla para *Grapsus grapsus*.

Isla	Localidad	Número de individuos	Coordenadas
Santa Cruz	Caamaño	8	-0.749167, -90.300152
	Playa de los Perros	9	-0.748543, -90.248722
Floreana	Luz del Día	6	-1.230444, -90.475629
	Montura	10	-1.237534, -90.481039
San Cristóbal	Rosa Blanca	10	-0.826332, -89.353161
	Tongo Reef	10	-0.900108, -89.612090

**Tabla 3.** Resumen de marcadores microsátélites para *Hexaplex princeps*.

Marcador	Secuencia del primer 5'-3'	GC %	Ta °C	Tm °C	Te (pb)	Motivo	Cola con fluoróforo	Ae	Mix
HEX-13	F: GTCACAGAGGCCCGTTTATGCC	59	52.5	59	200	AT(16)	6FAM	SI	1
	R: TTCATCCCTCATACCTAACCATCCC	48		58					
HEX-16	F: AAAGTCTTCTTGTGGGATGTTGCCG	48	52.5	58	200	AC(44)	HEX	NO	
	R: CAGCTTCTCTGACCAATATCATGCG	48		58					
HEX-4	F: TTTCTTCATGTGTTGTGGGTGACGG	48	52.5	58	275	TC(36)	6FAM	SI	
	R: AAATCAAAGAGAAATGCCCAACCCC	44		56					
HEX-24	F: ACGATAGGGCAATACCTGAAAGTCGC	50	55	60	450	AC(16)	6FAM	NO	
	R: TAGATGGAGCCTTTGGCGAAACCG	54		59					
HEX-27	F: AACCCATGCTCATAGTCATAGAGCG	48	40	58	320	AT(20)	HEX	SI	
	R: ATTATCAACGTGGACTGTGTGACCG	48		58					
HEX-1	F: TTTCTCTGTTATGTTTATGGAGCCC	40	47	54	350	ATT(24)	HEX	SI	
	R: ATTGCTCTTAACTCTCAACAGCC	44		56					
HEX-12	F: TTTAGATTTGTGCGAAATTCACCCC	40	55	54	450	AC(20)	HEX	NO	
	R: AACTAGATGGGAGTTGGGAAC TGCC	52		59					
HEX-22	F: TATGTAACTTGCCCTTATCGCCCC	48	55	58	200	AC(34)	HEX	NO	
	R: TTGACCTCATTGATACCCGTCAGGG	52		59					
HEX-29	F: GGACAGCATATACACCCACACCC	57	46	59	500	AC(20)	6FAM	NO	
	R: TTGATGACAGCTGTATTGTTTTCGC	40		54					
HEX-2	F: CAGTATGTAGGTGAAACAGAAGCCAGGG	50	45	61	450	ATT(30)	6FAM	SI	
	R: TGTGACACAGGCTAACAGACACCCG	56		61					
HEX-7	F: ACTGAAAATGTAGACTATCCAGAGCC	42	50	56	375	AC (24)	HEX	SI	
	R: TGTAATCTTGACACTGACTGAGGG	44		56					
HEX-21	F: GGTGATTTTCTTAATGTTGTCAATTTGGGC	40	50	59	300	AC(16)	6FAM	NO	
	R: TGAGTAAGGAATATGGGGTATGTGGCG	48		60					
HEX-25	F: CACATATGCTTCACTGCGATGTACCC	50	50	60	200	TC(18)	6FAM	SI	
	R: CAGAGAAATGTGCTTGAATTGTTGGG	42		56					

GC: Contenido de Guanina-Citosina, Ta: Temperatura de Annealing; Tm: Temperatura de melting, Ae: Amplificación exitosa; Te: Tamaño esperado.

**Tabla 4.** Resumen de marcadores microsatélites para *Grapsus grapsus*.

Marcador	Secuencia del primer 5'-3'	GC %	Ta °C	Tm °C	Te (pb)	Motivo	Cola con fluoróforo	Ae	Mi
GAP-13	F: CTTACAAACTGTCTGCTTACCGGCG	52	55	59	200	ACTG(36)	6FAM	SI	1
	R: TAATTGTGATAGGTGACTGTCCGGC	48		58					
GAP-14	F: ATCTCCCTCCACCATTCGTCGC	57	55	59	200	TTCC(44)	HEX	NO	1
	R: TTCCTTCCTGCGTCTTTTCCCC	55		57					
GAP-6	F: AGCAAAGTTTGAGAGCCGAGTTGCG	52	55	59	220-250	TTCC(32)	HEX	SI	2
	R: TGCCTCACTTCCTTTACTCCATCCG	52		59					
GAP-24	F: TGCCCTACAGATGTCCACTCAACCC	56	55	61	200-230	TTCC(32)	6FAM	SI	2
	R: GCAGCTTATGGAACACACGAGGGG	58		61					
GAP-15	F: AACCGAGAGAGGTACAAATGAGCC	50	55	57	150	TTCC(32)	6FAM	SI	3
	R: TTTTGTCTTTTGAAGACGCC	43		50					
GAP-25	F: TAGGGTAACGGACCGATAGGCAGGC	60	55	63	200	TCTG(32)	HEX	SI	3
	R: GGAGATCGATTATGGTTTCGCCG	52		57					
GAP-5	F: GGGAACTACTGGAGTACGTGAAGGGG	54	55	61	120	TTCCC(55)	6FAM	SI	4
	R: TTTCTTCGTTTCACTTGTGTCCC	44		56					
GAP-23	F: GAAGATATTGTCCCCTTTGTGGCG	48	55	58	225	AGCC(36)	HEX	SI	5
	R: GGAACCCAGTTAGTCAGTCACTCAGCC	56		63					
GAP-28	F: AGGCACAGACATCACACACCTCCC	58	55	61	320	TTCC(32)	6FAM	NO	5
	R: CCTCCCACGCTCTTTTACATTTAATGGG	46		60					
GAP-3	F: CCTTCGCCGAACAATCTCCG	57	55	56	200-250	TCTCC(50)	HEX	SI	6
	R: CGTGAAGCTTATAGACGCAATGGGG	52		59					
GAP-27	F: TGGTTTTGTGACTTTGACCTCTCCC	48	55	58	150	AGGG(40)	HEX	SI	6
	R: AAGTAACTCATAACAGGTGTCTTGCC	44		58					
GAP-2	F: GCTGGTAAATAAATCCGAGAATTGCG	42	55	56	150-180	TCTCC(55)	HEX	SI	7
	R: CTGAATGGGAAGAAGGAAAAGCCG	50		57					
GAP-29	F: CTCTGCCCATACCTCACCTTTTCCG	56	55	61	375	ACTG (32)	6FAM	SI	7
	R: AAATGTGATATTACGGACGGAGGGC	48		58					
GAP-22	F: CCTTTTCCAAAACACTCTTCTCTCTCCC	45	55	60	200	AGGG(32)	6FAM	SI	8
	R: CCCTCTACAAAGGGGAACAATGGG	54		59					
GAP-30	F: CAACCAGCAGCAACGTGATAGGG	57	50	59	275	TCC(24)	6FAM	SI	8
	R: AAACCAAGCTCAATGTGTACTAATGCG	41		57					
GAP-7	F: CTTTGTCTACTCTCCGGCCTCCC	60	55	63	200-230	AGGG(36)	6FAM	SI	9
	R: AAACGCGATTTTCATGTTTCTTCCC	44		56					

GC: Contenido de Guanina citosina, Ta: Temperatura de Annealing; Tm: Temperatura de melting, Ae: Amplificación exitosa; Te: Tamaño esperado.



**Tabla 5.** Índices de diversidad genética por locus para *Hexaplex princeps*.

Locus	Tamaño obtenido (kb)	No. de alelos por locus	He	Ho
HEX1	349-388	12	0.62	0.40
HEX2	147-153	3	0.51	0.80
HEX4	298-325	4	0.24	0.16
HEX27	155-187	12	0.81	0.68
HEX25	156-189	12	0.66	0.35
HEX13	175-188	4	0.52	0.89
<b>Promedio Total</b>		<b>7.83</b>	<b>0.56</b>	<b>0.55</b>

He: Heterocigosidad esperada, Ho: Heterocigosidad observada.

**Tabla 6.** Índices de diversidad genética por locus para *Grapsus grapsus*.

Locus	Tamaño obtenido (kb)	No. de alelos por locus	He	Ho
GAP24	154-206	5	0.65	0.88
GAP6	185-221	8	0.51	0.54
GAP22	138-166	5	0.31	0.30
GAP2	101-129	8	0.77	0.63
GAP13	125-176	12	0.81	0.73
GAP14	130-182	11	0.86	0.76
GAP15	111-167	9	0.61	0.35
GAP25	130-178	8	0.78	0.68
GAP29	258-266	3	0.23	0.07
GAP30	130-150	10	0.86	0.62
GAP23	215-230	6	0.31	0.25
GAP7	157-207	9	0.75	0.53
GAP30	151-195	14	0.86	0.63
<b>Promedio Total</b>		<b>8.31</b>	<b>0.64</b>	<b>0.53</b>

He: Heterocigosidad esperada, Ho: Heterocigosidad observada.

**Tabla 7.** Índices de diversidad genética por islote para *Hexaplex princeps*.

Islote	No. de alelos	He	Ho	Riqueza alélica	No. de alelos privados
Champion	21	0.48	0.63	2.78	2
Gardner	20	0.47	0.69	3.11	5
Guy Fawkes	19	0.42	0.63	3.22	4
León Dormido	19	0.47	0.63	3.63	0
Rocas Beagle	18	0.41	0.69	4.14	1
Roca sGordon	25	0.56	0.59	3.15	7
<b>Promedio Total</b>	<b>20.33</b>	<b>0.47</b>	<b>0.64</b>	<b>3.34</b>	<b>3.17</b>

He: Heterocigosidad esperada, Ho: Heterocigosidad observada.

**Tabla 8.** Índices de diversidad genética por localidad para *Grapsus grapsus*.

Localidad	No. de alelos	He	Ho	Riqueza alélica	No. de alelos privados
Caamaño	40	0.45	0.52	2.5	5
Playa de los Perros	51	0.58	0.57	3.47	5
Luz del Día	57	0.56	0.55	3.12	6
Montura	63	0.58	0.49	3.02	6
Rosa Blanca	49	0.53	0.55	2.8	3
Tongo reef	67	0.64	0.59	3.56	8
<b>Promedio Total</b>	<b>54.5</b>	<b>0.56</b>	<b>0.55</b>	<b>3.08</b>	<b>5.50</b>

He: Heterocigosidad esperada, Ho: Heterocigosidad observada.

**Tabla 9.** Índices de diversidad genética por régimen de afloramiento para *Hexaplex princeps*.

Nivel de afloramiento	No. de individuos	Numero de alelos por grupo	He	Ho	Riqueza alélica	Proporción de alelos	Alelos privados
Bajo	29	36	0.58	0.65	4.68	56.87	11
Alto	29	30	0.46	0.65	6.74	87.41	17
<b>Promedio Total</b>		<b>33</b>	<b>0.52</b>	<b>0.65</b>	<b>5.71</b>	<b>72.14</b>	<b>14</b>

He: Heterocigosidad esperada, Ho: Heterocigosidad observada.

**Tabla 10.** Índices de diversidad genética por isla para *Grapsus grapsus*.

Islas	Alelos por grupo	He	Ho	Riqueza alélica	Alelos privados
Santa Cruz	64.00	0.57	0.56	4.75	7.00
Floreana	65.00	0.62	0.52	4.80	10.00
San Cristóbal	57.00	0.57	0.56	5.05	7.00
Promedio total	62.00	0.59	0.55	4.87	8.00

He: Heterocigosidad esperada, Ho: Heterocigosidad observada.

**Tabla 11.** Distancias genéticas (*Fst*) entre islotes para *Hexaplex princeps*.

Islotes	Champion	Gardner	Guy Fawkes	León Dormido	Rocas Beagle
Gardner	0.04				
Guy Fawkes	0.03	0.02			
León Dormido	0.18	0.13	0.14		
Rocas Beagle	0.02	0.04	0.03	0.19	
Rocas Gordon	0.15	0.12	0.12	0.08	0.18

**Tabla 12.** Distancias genéticas ( $F_{st}$ ) entre localidades para *Grapsus grapsus*.

Localidades	Caamaño	Luz del Día	Montura	Playa de los Perros	Rosa Blanca
Luz del Día	0.13				
Montura	0.11	0.05			
Playa de los Perros	0.10	0.04	0.07		
Rosa Blanca	0.12	0.60	0.07	0.06	
Tongo Reef	0.09	0.06	0.07	0.04	0.07

**Tabla 13.** Distancias genéticas ( $F_{st}$ ) entre regímenes de afloramiento para *Hexaplex princeps*.

	Alto Afloramiento
Alto Afloramiento	0
Bajo Afloramiento	0.07444581

**Tabla 14.** Distancias genéticas ( $F_{st}$ ) entre islas para *Grapsus grapsus*.

	Floreana	San Cristóbal
San Cristóbal	0.04	
Santa Cruz	0.05	0.03

**Tabla 15.** Índices de  $Nei$  entre islotes para *Hexaplex princeps*.

Islotes	Champion	Gardner	Guy Fawkes	León Dormido	Rocas Beagle
Gardner	0.08				
Guy Fawkes	0.07	0.04			
León Dormido	0.39	0.26	0.30		
Rocas Beagle	0.04	0.06	0.05	0.35	
Rocas Gordon	0.33	0.27	0.28	0.21	0.38

**Tabla 16.** Índices de  $Nei$  entre localidades para *Grapsus grapsus*.

Localidades	Caamaño	Luz del Día	Montura	Playa de los Perros	Rosa Blanca
Luz del Día	0.29				
Montura	0.36	0.14			
Playa de los Perros	0.19	0.15	0.25		
Rosa Blanca	0.27	0.23	0.25	0.24	
Tongo Reef	0.26	0.22	0.25	0.17	0.22

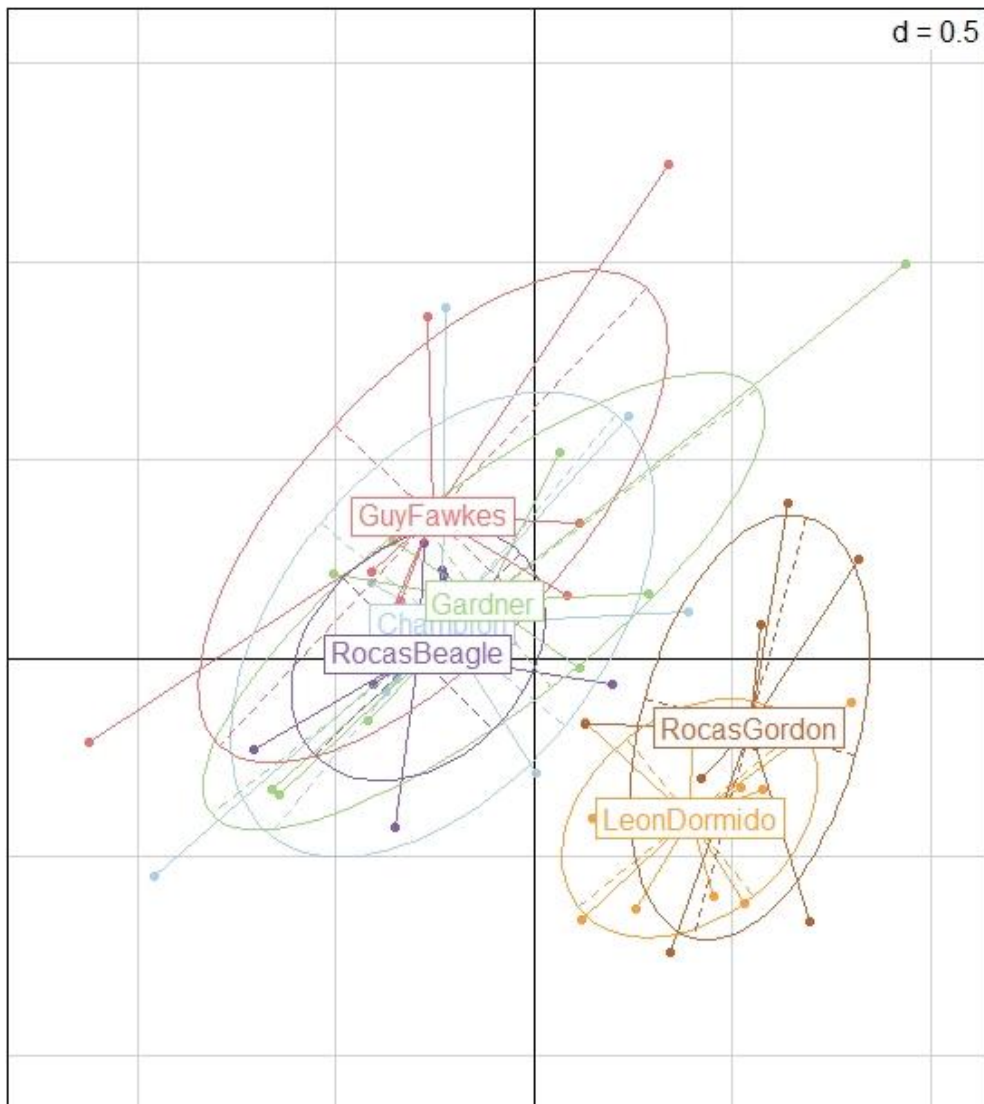
**Tabla 17.** Índices de *Nei* entre regímenes de afloramiento para *Hexaplex princeps*.

	Alto Afloramiento
Alto Afloramiento	0
Bajo Afloramiento	0.1438129

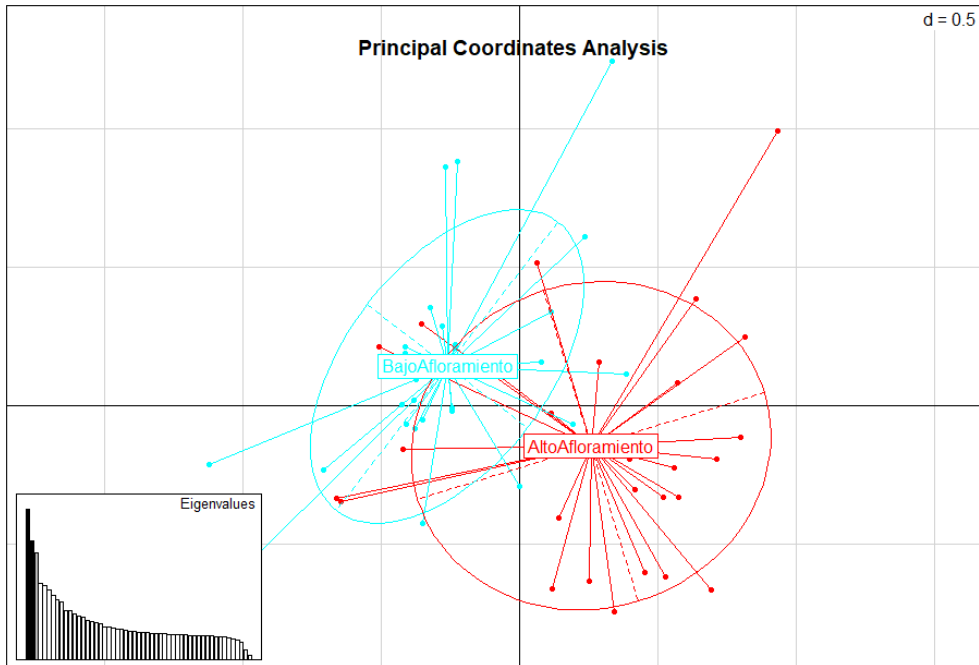
**Tabla 18.** Índices de *Nei* entre islas para *Grapsus grapsus*.

	Floreana	San Cristóbal
San Cristóbal	0.15	
Santa Cruz	0.17	0.13

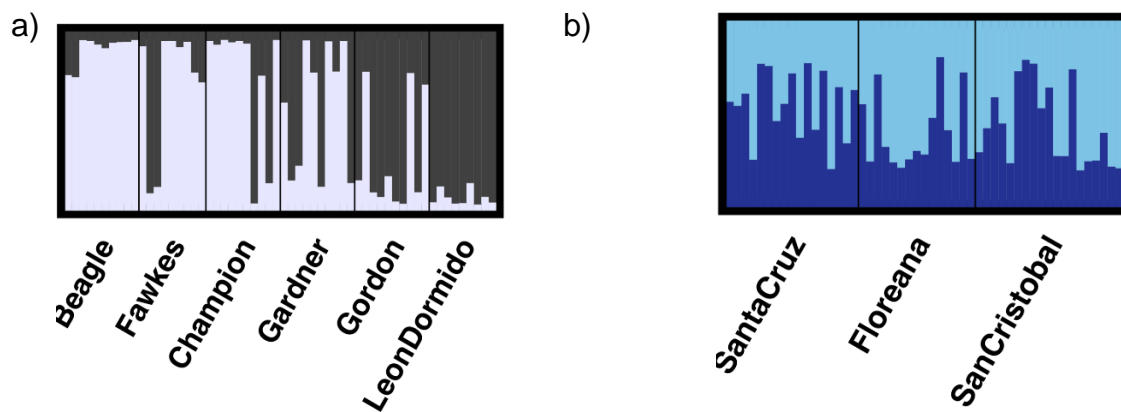
## FIGURAS



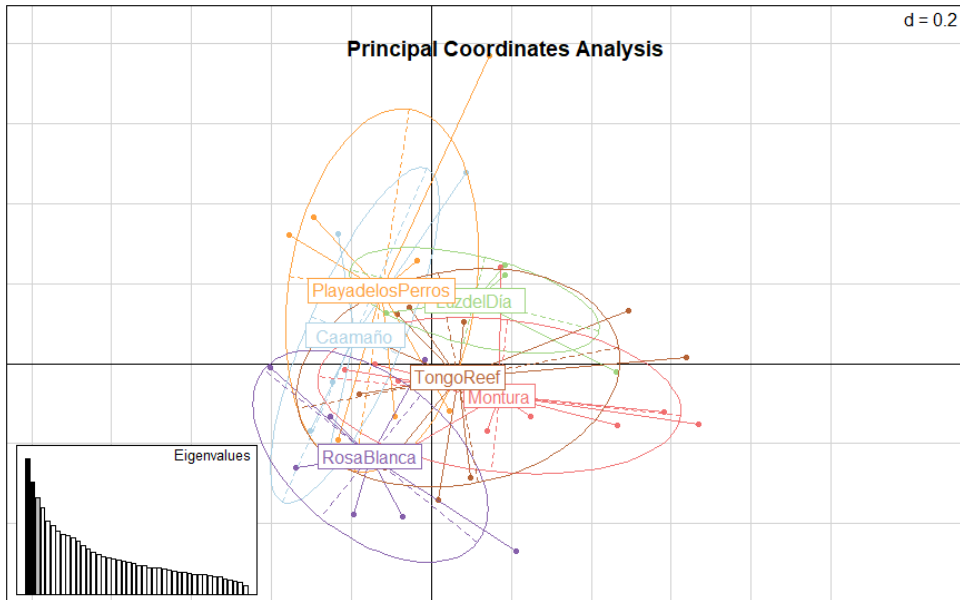
**Figura 1.** Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) para *Hexaplex princeps* por islote.



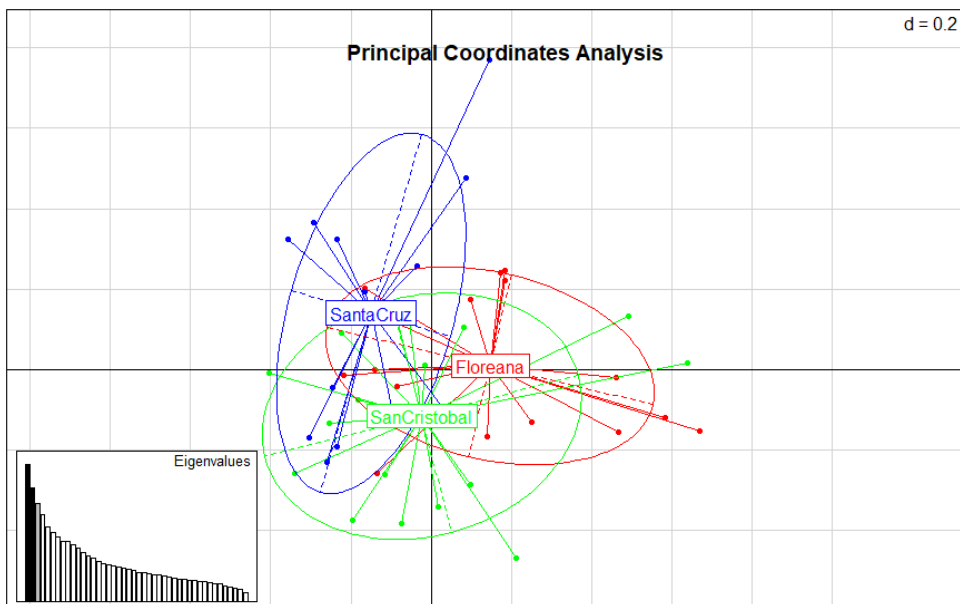
**Figura 2.** Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) para *Hexaplex princeps* por régimen de afloramiento.



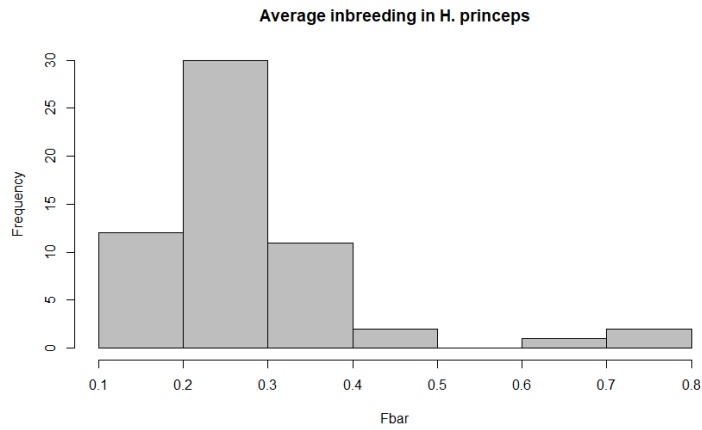
**Figura 3.** Análisis de estructura poblacional usando  $K=2$  para a) *Hexaplex princeps* y b) *Grapsus grapsus*.



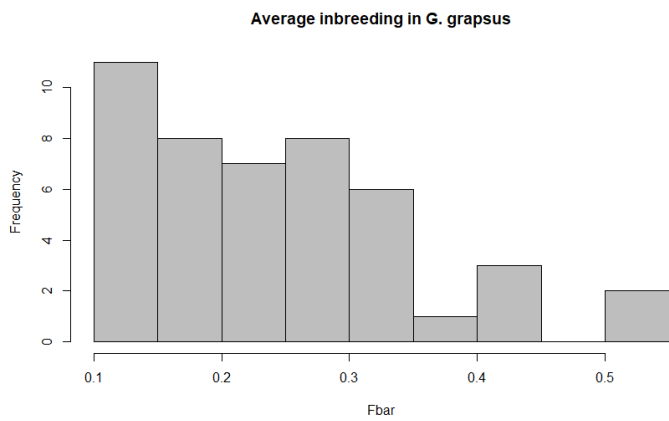
**Figura 4.** Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) para *Grapsus grapsus* por localidad.



**Figura 5.** Análisis de Coordinadas Principales (PCoA) para *Grapsus grapsus* por isla.

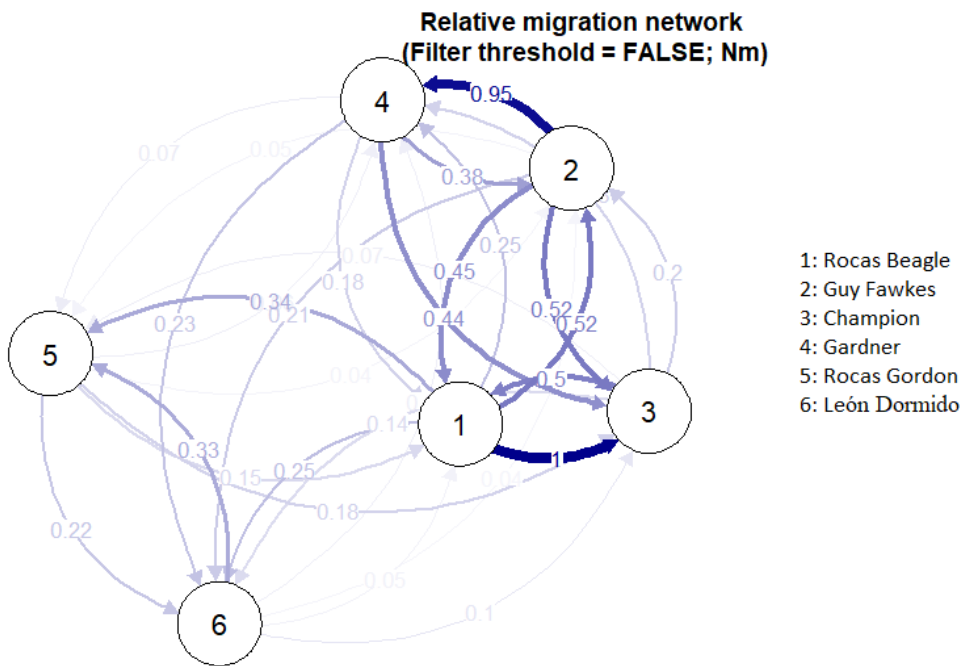


**Figura 6.** Distribución de la media del coeficiente de endogamia ( $F_{bar}$ ) por locus para *Hexaplex princeps*.

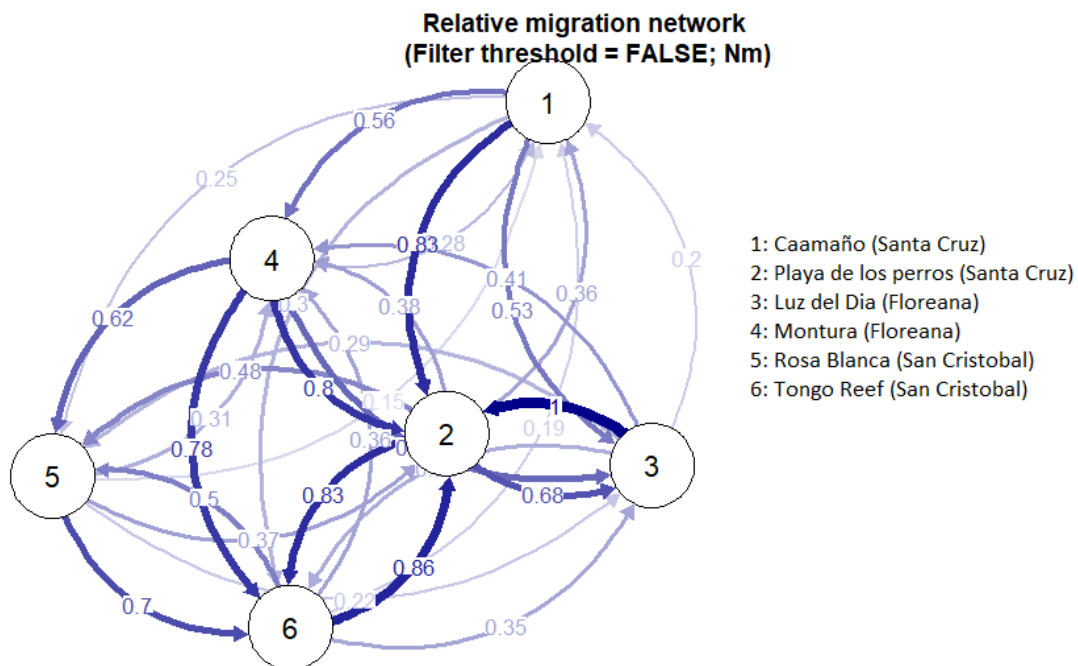


**Figura 7.** Distribución de la media del coeficiente de endogamia ( $F_{bar}$ ) por locus para *Grapsus grapsus*.

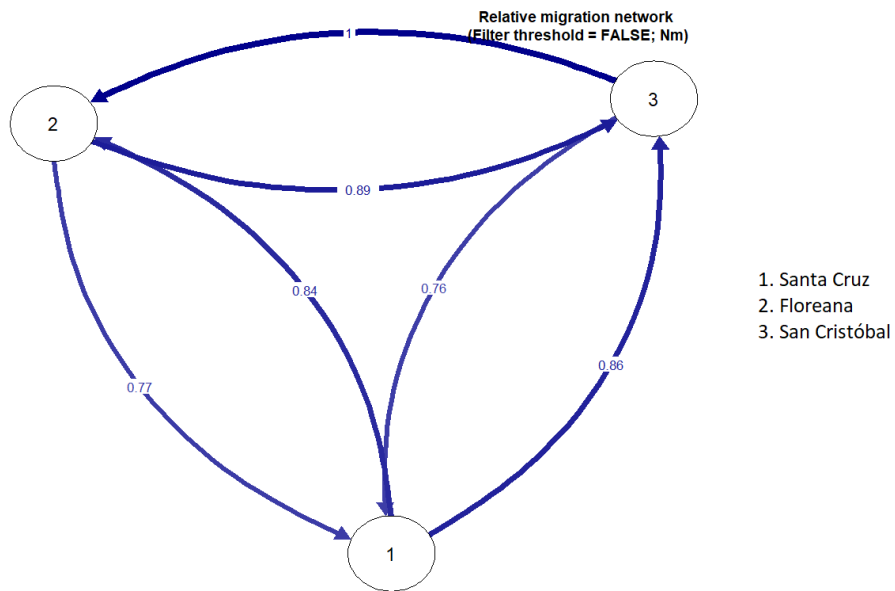




**Figura 8.** Red de migración de *Hexaplex princeps* entre islotes.



**Figura 9.** Red de migración de *Grapsus grapsus* por localidad.



**Figura 10.** Red de migración de *Grapsus grapsus* por isla.