

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO  
USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Análisis de la diversidad genética en tres especies de  
canchalaguas en Ecuador continental e insular**

**Cynthia Alexandra Gordon Villegas**

**Biología**

Trabajo de integración curricular presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Licenciada en Biología

Quito, 23 de diciembre de 2019

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**  
**COLEGIO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y**  
**AMBIENTALES**

**HOJA DE CALIFICACIÓN**  
**DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

**Análisis de la diversidad genética en tres especies de canchalaguas en Ecuador continental e insular**

**Cynthia Alexandra Gordon Villegas**

**Calificación:**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Margarita Brandt, Ph.D.**

**Firma del profesor:**

\_\_\_\_\_

Quito, 23 de diciembre 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: Cynthia Alexandra Gordon Villegas

Código: 00111815

Cédula de identidad: 1716556921

Lugar y fecha: Quito 23, diciembre de 2019

## AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto de investigación no hubiera sido posible sin el apoyo de varias instituciones y personas a lo largo del proyecto.

A mi familia, especialmente a mi mamá Teresa Villegas y mi abuelita Mami Toili quienes siempre me ha apoyado de forma incondicional; al colegio mas bonito de la USFQ, COCIBA, donde el ambiente no pudo ser mejor para el aprendizaje, a todos los profesores que contribuyeron en mi crecimiento académico y personal, y donde conocí a personas maravillosas con quienes compartimos muchas experiencias que nos unieron de tal forma hasta llamarlos familia. De forma especial a Camila Gallardo y Josué Picho quienes me acompañaron durante este proceso y no permitieron que dude de mi misma en ningún momento. A todas las personas que de una u otra forma estuvieron presentes en este estudio Fernanda Flores, Sara Flores, Javier Torres, Kimberly Erazo, Stefanie Aguiar y todos los que me acompañaron en este recorrido.

Agradezco a Richard Preziosi y Sarah Griffiths de Mancherter Metropolitan University por el diseño de primers, su apore fue fundamental; a Steve Canty del Smithsonian Marine Station por su apoyo en el secuenciamiento de muestras; a Antonio León-Reyes por facilitar el uso de las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos junto con sus asistentes Noelia Barriga y Darío Ramírez quienes siempre estuvieron dispuestos a aclarar dudas; a Jaime Chaves por su enseñanza en el manejo de programas en el análisis de datos.

También quiero agradecer a las instituciones que financiaron esta investigación, principalmente a USFQ Collaboration Grants y a Galápagos Science Center; a Laboratorio de Biología Analítica del Museo Natural del Smithsonian; al Ministerio del Ambiente y al Parque Nacional Galápagos por otorgar 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 para la recolecta y movilización de las muestras.

Finalmente quiero agradecer de forma especial a Darío Cueva por su apoyo incondicional a lo largo de la investigación, el trabajo de investigación no hubiera sido lo mismo sin su apoyo. También quiero agradecer a mi tutora de tesis, Margarita Brandt quien supo confiar en mi para formar parte de este maravilloso proyecto. No existen palabras para expresar mi total agradecimiento por toda la enseñanza, la paciencia y las correcciones; la forma en la que transmite la pasión por la biología y la investigación, gracias Maggy.

## RESUMEN

Los quitones son invertebrados marinos de la clase Polyplacophora, presentes en todos los océanos del mundo. En el Archipiélago de Galápagos se han reportado 19 especies, de las cuales *Radsia goodallii* y *Radsia sulcatus* son endémicas y capturadas por pescadores artesanales por su gran tamaño. Por otro lado, en Ecuador continental, se ha reportado cinco especies, de las cuales *Chiton stokesii* es la más abundante; sin embargo, no existe evidencia de su explotación. En el presente estudio se analizó la diversidad y estructura genética de estas tres especies de quitones mediante el uso de marcadores moleculares microsátélites. Treinta y cinco marcadores fueron diseñados específicamente para *R. goodallii* utilizando información de su genoma mediante secuenciación en la plataforma Illumina. Luego de descartar los menos informativos, 21 fueron transferidos a las otras dos especies, marcados con fluoróforos y evaluados en 142 individuos de las tres especies a lo largo de 12 localidades; de 12-13 marcadores funcionaron para los análisis genéticos. Reflejados a través de la heterocigosidad, los análisis de diversidad genética mostraron niveles moderados (0.25-0.62), tanto para las especies explotadas (*R. goodallii*, *R. sulcatus*), como para *C. stokesii*; se detectó una sutil diferencia entre la heterocigosidad esperada con la observada, con valores más altos en la primera en todas las localidades (a excepción de Machalilla para *C. stokesii*). Por otro lado, se encontró poca estructura genética para las tres especies, con la excepción de *R. goodallii* para la localidad de Caamaño en Santa Cruz, en donde la mayoría de sus individuos mostraron admixture. Para ninguna de las tres especies de quitones los análisis de migración mostraron un patrón definido de flujo génico relacionado a las corrientes marinas o a la ubicación geográfica. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren una alta conectividad entre todas las localidades, la cual es crucial, especialmente para especies que son explotadas por el ser humano.

**Palabras clave:** canchalaguas, diversidad genética, microsátélites, pesca artesanal, estructura genética, conectividad, Ecuador.

## ABSTRACT

Chitons are marine invertebrates of the Polyplacophora class, present in all the oceans around the world. In the Galápagos Archipelago 19 species have been reported, of which *Radsia goodallii* and *Radsia sulcatus* are endemic and caught by artisanal fishermen because of their large size. On the other hand, in continental Ecuador, five species have been reported, of which *Chiton stokesii* is the most abundant; however, there is no evidence of its exploitation. In the present study, diversity and genetic structure of these three species of chitons was analyzed through the use of microsatellite molecular markers. Thirty-five markers were designed specifically for *R. goodallii* using genome information by sequencing on the Illumina platform. After discarding the least informative, 21 were transferred to the other two species, labeled with fluorophores and evaluated in 142 individuals of the three species across 12 locations; of which 12-13 markers worked for genetic analysis. Reflected through heterozygosity, genetic diversity analysis showed moderate levels (0.25-0.62), both for exploited species (*R. goodallii*, *R. sulcatus*), and for *C. stokesii*; a subtle difference was detected between the expected heterozygosity and the observed, with higher values in the first one in all locations (with the exception of Machalilla for *C. stokesii*). On the other hand, little genetic structure was found for the three species, with the exception of *R. goodallii* for the locality of Caamaño in Santa Cruz, where most of their individuals showed admixture. For none of the three species of chitons, migration analyzes showed a defined pattern of gene flow related to ocean currents or geographic location. Taken together, these results suggest high connectivity between all locations, which is crucial, especially for species that are exploited by humans.

**Key words:** canchalaguas, genetic diversity, microsatellites, artisanal fishing, genetic structure, connectivity, Ecuador.

**TABLA DE CONTENIDO**

<u>DERECHOS DE AUTOR</u> .....	3.
<u>AGRADECIMIENTOS</u> .....	4.
<u>RESUMEN</u> .....	5.
<u>ABSTRACT</u> .....	6.
<u>INTRODUCCIÓN</u> .....	10.
<u>OBJETIVOS</u> .....	15.
<u>MÉTODOS</u> .....	16.
<u>RESULTADOS</u> .....	21.
<u>DISCUSIÓN</u> .....	26.
<u>CONCLUSIÓN</u> .....	32.
<u>REFERENCIAS</u> .....	34.
<u>ANEXOS: TABLAS</u> .....	41.
<u>ANEXOS: FIGURAS</u> .....	53.

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de individuos de <i>R. goodallii</i> y de <i>R. sulcatus</i> colectados en las Islas Galápagos por isla, localidad y potencial impacto humano.....	41.
Tabla 2. Número de individuos de <i>C. stokesii</i> colectados en el continente, por ubicación geográfica, provincia y localidad.....	42.
Tabla 3. Primers diseñados y empleados para los análisis de las tres especies de canchalaguas.....	43.
Tabla 4. Valores – P linkage disequilibrium por loci para <i>R. goodallii</i> con 16 marcadores microsatélites.....	46.
Tabla 5. Valores – P linkage disequilibrium por loci para <i>R. sulcatus</i> con 16 marcadores microsatélites.....	46.
Tabla 6. Valores – P linkage disequilibrium por loci para <i>C. stokesii</i> con 12 marcadores microsatélites.....	47.
Tabla 7. Frecuencias de alelos nulos por localidad para <i>R. goodallii</i> .....	47.
Tabla 8. Frecuencias de alelos nulos por localidad para <i>R. sulcatus</i> .....	47.
Tabla 9. Frecuencias de alelos nulos por localidad para <i>C. stokesii</i> .....	47.
Tabla 10. Análisis de Equilibrio Hardy – Weinberg por localidad para <i>R. goodallii</i> .....	48.
Tabla 11. Análisis de Equilibrio Hardy – Weinberg por impacto humano para <i>R. goodallii</i> .....	48.
Tabla 12. Análisis de Equilibrio Hardy – Weinberg por localidad para <i>R. sulcatus</i> .....	48.
Tabla 13. Análisis de Equilibrio Hardy – Weinberg por impacto humano para <i>R. sulcatus</i> .....	48.
Tabla 14. Análisis de Equilibrio Hardy – Weinberg por localidad para <i>C. stokesii</i> .....	48.
Tabla 15. Número de alelos por locus para las tres especies de canchalaguas.....	49.
Tabla 16. Índice de diversidad genética por localidad para las tres especies de canchalaguas.....	50.
Tabla 17. Índice de diversidad genética por impacto humano para las dos especies de canchalaguas de Galápagos.....	51.
Tabla 18. Matriz de distancias genéticas por localidad de <i>R. goodallii</i> .....	51.
Tabla 19. Matriz de distancias genéticas por localidad de <i>R. sulcatus</i> .....	51.
Tabla 20. Matriz de distancias genéticas por localidad de <i>C. stokesii</i> .....	52.



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. PcoA por a) localidad y b) impacto humano de <i>R. goodallii</i> .....	53.
Figura 2. PcoA por a) localidad y b) impacto humano de <i>R. sulcatus</i> .....	54.
Figura 3. PcoA por localidad de <i>C. stokesii</i> .....	55.
Figura 4. Análisis de estructura poblacional usando $K = 2$ para <i>R. goodallii</i> por a) localidad y b) impacto humano.....	55.
Figura 5. Análisis de estructura poblacional usando $K = 2$ para <i>R. sulcatus</i> por a) localidad y b) impacto humano.....	56.
Figura 6. Análisis de estructura poblacional usando $K = 3$ para <i>C. stokesii</i> por localidad.....	56.
Figura 7. Distribución de la media del coeficiente de endogamia ( $F_{bar}$ ) en los individuos de <i>R. goodallii</i> por a) localidad y por b) impacto humano.....	57.
Figura 8. Distribución de la media del coeficiente de endogamia ( $F_{bar}$ ) en los individuos de <i>R. sulcatus</i> por a) localidad y por b) impacto humano.....	58.
Figura 9. Distribución de la media del coeficiente de endogamia ( $F_{bar}$ ) en los individuos de <i>C. stokesii</i> por localidad.....	59.
Figura 10. Red de migración organizada por localidad de <i>R. goodallii</i> , con un threshold de 0.4. Rojo oscuro representa alta migración. Caamaño (1), Luz del Día (2), Montura (3), Playa de los Perros (4), Rosa Blanca (5) y Tongo Reef (6).....	60.
Figura 11. Red de migración organizada por localidad de <i>R. sulcatus</i> , con un threshold de 0.4. Rojo oscuro representa alta migración. Luz del Día (1), Playa de los Perros (2), Rosa Blanca (3) y Tongo Reef (4).....	60.
Figura 12. Red de migración organizada por localidad de <i>Chiton stokesii</i> , con un threshold de 0.4. Rojo oscuro representa alta migración. Estero del Plátano (1), La Entrada (2), Playa Escondida (3), La Tiñosa (4), Machalilla (5) y La Playita (6).....	61.

## INTRODUCCIÓN

La biodiversidad del planeta se encuentra en un decrecimiento rápido y constante, el cual está relacionada de forma directa o indirecta con actividades antropogénicas. El entendimiento de las consecuencias ecológicas de la biodiversidad es uno de los más grandes retos en la biología. La diversidad genética, uno de los componentes claves de la biodiversidad y que se define como la aparición natural de diferencias genéticas entre individuos de una misma especie; es importante para procesos ecológicos, como la productividad, la recuperación de poblaciones, la competencia interespecífica, la estructura poblacional y el flujo de energía y de nutrientes (Hughes et al., 2008). Estas variaciones son las que proporcionan flexibilidad a las poblaciones permitiéndolas sobrevivir en circunstancias de cambios ambientales (Hartl et al., 1997). Los cambios genéticos heredados en una población de organismos de una misma especie se dan por procesos de recombinación, flujo génico, mutaciones, entre otros. Por esta razón, los patrones de apareamiento de las especies son fundamentales. El apareamiento no aleatorio puede darse de dos formas, por medio de la endogamia (inbreeding), cuando los individuos con genotipos similares son más afines a aparearse entre ellos que con individuos con genotipos diferentes, y de la exogamia (outbreeding), cuando se incrementa la probabilidad que individuos con genotipos particulares se apareen con individuos con otros genotipos particulares. La endogamia puede conducir a la reducción de la variación genética, mientras que la exogamia al incremento de la variación genética.

Por otro lado, en algunos casos puede producirse fluctuaciones aleatorias en el número de alelos en las poblaciones. Estos cambios se conocen como deriva génica, los cuales pueden incrementar o reducir la diversidad genética de una población. Generalmente, la deriva génica se da en poblaciones pequeñas, en donde los alelos con baja frecuencia tienden a perderse. Una vez iniciada, la deriva génica continuará hasta

que el alelo involucrado se pierda en la población o sea el único alelo presente en un locus particular de un gen en toda la población; ambas posibilidades significan la reducción de la diversidad genética poblacional. La deriva génica se da comúnmente después de que una población atraviesa por un cuello de botella, lo cual se produce cuando un número significativo de individuos de la población muere o cuando no se produce reproducción entre los individuos, dando como resultado un decrecimiento drástico del tamaño poblacional. La deriva génica puede resultar en la pérdida de alelos raros, ocasionando la disminución del número de genes (Hartl et al., 1997).

La diversidad producida a nivel molecular en los individuos es lo que les permite responder a diversos cambios en sus hábitats originales, o a recolonizar nuevos hábitats (Eguiarte et al., 2013). Dado que la diversidad genética es un componente principal de la evolución adaptativa, la pérdida de ésta ocasiona la reducción de la probabilidad de supervivencia de una población (Kuo & Janzen, 2004). La variación genética se mide de dos formas principales: heterocigosidad y diversidad alélica. La pérdida de la variación genética puede reducir la productividad de las poblaciones explotadas a causa de la disminución individual de fitness en un corto tiempo, afectando principalmente la heterocigosidad (Allendorf et al., 2008). Por otro lado, la pérdida de la diversidad alélica podría presentar efectos nocivos en poblaciones marinas grandes, en donde se produce pérdida de la heterocigosidad a causa de la captura (Allendorf et al., 2008).

De esta manera, la diversidad genética tiene consecuencias ecológicas importantes a nivel poblacional, de comunidades y de ecosistemas, y en algunos casos los efectos son comparables en magnitud con efectos de la diversidad de especies (Hughes et al., 2008). Normalmente, las poblaciones pequeñas son más susceptibles a verse afectadas por la pérdida de variación genética, ya que presentan pocos individuos en las poblaciones y pequeñas reservas de diversidad genética, por lo que no presentan diferencias

significativas entre individuos y por lo tanto sus respuestas a dichos cambios ambientales suelen ser homogéneas. A pesar de esto, la pérdida de diversidad genética también puede darse en poblaciones grandes ya que el tamaño de la población efectiva es normalmente mucho más pequeño que el tamaño total de la población (Frankham, 2003).

Un gran número de especies se ha extinguido, mientras que muchas otras presentan tamaños poblacionales reducidos que las ponen en riesgo. Entre los principales factores que contribuyen para la extinción de especies se encuentra la pérdida de hábitat, introducción de especies, sobreexplotación y contaminación; estos factores se encuentran principalmente relacionados al crecimiento poblacional de los seres humanos (Frankham, 2003). Asimismo, la pérdida de la diversidad genética de especies se ha dado por varias causas como, explotación, pérdida de hábitat, competencia con especies invasoras, cambio climático, contaminación o por enfermedades, ocasionando la extinción global, regional o local. Uno de los ejemplos más claros de la extinción de especies por explotación fue el caso del molusco *Haliotis sorenseni*, extinguido a nivel mundial (Dulvy et al., 2003). Otros casos similares fueron la extinción local de *Hippopus hippopus* a causa de sobreexplotación, el caso de *Lottia alveus*, donde se produjo una extinción global a causa de pérdida de todos sus hábitats, y, en el caso de *Rissoa membranacea* se generó una extinción local por pérdida de algunos de sus hábitats. Finalmente, el caso de extinción local de *Mytilus trossulus* fue ocasionada por especies invasoras (Dulvy et al., 2003).

Las poblaciones que presentan tamaños reducidos a causa de la caza, pesca, captura u otros factores podrían también reducir el número de migraciones y ocasionar pérdida de variación genética (Allendorf et al., 2008). La distribución de los individuos es por lo tanto una de las vías por la cual la variación genética puede ser preservada en grandes poblaciones. Por ejemplo, una población con amplia distribución geográfica

raramente presenta la misma composición genética a causa de las condiciones ambientales, sea por diferencia de altitud, densidad de presencia humana, temperatura o recursos alimenticios disponibles. De manera que los individuos podrían presentar distintas frecuencias alélicas de acuerdo con su ubicación geográfica. Si los individuos son reconectados y continúan apareándose, el resultado de la mezcla genética podría contribuir en incrementar la variación genética. Sin embargo, si el rango de distribución se amplía lo suficiente para que el entrecruzamiento de los individuos ubicados geográficamente aislados sea menos probable, podría resultar en dos poblaciones aisladas genéticamente (Willi & Hoffmann, 2009).

La conectividad se puede describir como el nivel en el que se encuentran entrelazadas las poblaciones, lo que puede darse por intercambio de huevos, de larvas, de juveniles o de adultos (Palumbi, 2003). La conectividad se da por la dispersión de los individuos, los cuales presentan una dispersión más efectiva en las primeras formas de vida (Gawarkiewicz et al., 2007). Por esta razón, la conectividad es un elemento clave para mantener un índice de variabilidad genético alto y de esta forma determinar su estructura poblacional. La genética de poblaciones es por lo tanto un estudio que explica la distribución y variación de frecuencias alélicas como resultado de la mediación de factores evolutivos, cambios que se dan a lo largo del tiempo y cambio de hábitats, es decir las consecuencias de la evolución y la adaptación poblacional (Eguiarte et al., 2013).

El principal objetivo de este estudio fue el de determinar la genética poblacional de las canchalaguas *Chiton stokesii*, *Radsia sulcatus* y *Radsia goodallii*. Las canchalaguas son invertebrados marinos de la clase Polyplacophora, se encuentran en todos los océanos del mundo, se conoce aproximadamente 930 especies vivientes, y su registro fósil presenta aproximadamente 430 especies extintas (Ibáñez et al., 2016). Las canchalaguas viven principalmente en las rocas, hábitats intermareales y zonas submarinas. Éstas

cumplen un papel importante en los ecosistemas marinos, especialmente en las zonas intermareales ya que realizan herbivoría, siendo éste un proceso ecológico fundamental para la distribución espacial de algas en zonas submareales e intermareales (Vinueza et al., 2014). A su vez, las canchalaguas cumplen con el rol de eliminación de algas efímeras y el mantenimiento de roca desnuda; y son también consideradas indicadores biológicos de contaminación (Aguilera, 2011).

En Ecuador continental se reportan cinco especies de canchalaguas: *Stenoplax boogii* (Reyes-Gómez et al., 2017), *Acanthochitona hirudiniformis*, *Chiton stokesii*, *Ischnochiton dispar* y *Stenoplax limaciformis* (Ibáñez et al., 2016); mientras que en Galápagos se han reportado 19 especies, de las cuales siete son endémicas (Finet et al., 2016). Las canchalaguas se presentan en Galápagos como fuentes importantes de consumo proteico (Murillo, 2009) y su pesca se encuentra incluida desde el 2016 en el Acuerdo Ministerial de Pesca Nro 108 y la resolución Nro 62 del Artículo Tres de Pesca en Galápagos (Ministerio del Ambiente, 2016). Específicamente para *R. goodallii* y *R. sulcatus*, ambas endémicas de Galápagos, la pesca está permitida durante todo el año; se permite transportar dos libras por persona para consumo doméstico (Ministerio del Ambiente, 2016). Tanto *R. goodallii* como *R. sulcatus* han sido capturadas por los pescadores artesanales por su gran tamaño y abundancia (Murillo, 2009). *R. goodallii* es conocida localmente como “canchalagua lisa” y *R. sulcatus* como “canchalagua tallada” (Murillo, 2009). La pesca artesanal de canchalaguas en el archipiélago Galápagos ha comenzado a presentar mayor interés comercial, por lo que en la actualidad, tanto en San Cristóbal como en Santa Cruz, es posible encontrar establecimientos que ofrecen platos típicos de la región preparados con ellas (Herrera et al., 2003, Vintimilla 2019).

Al ser las canchalaguas una fuente de consumo proteico (Murillo, 2009) y de comercialización (Vintimilla, 2019) es necesario determinar si su diversidad genética se

ha visto reducida por su explotación. Esta información ayudará a entender si las poblaciones explotadas se encuentran vulnerables y por ende si su uso se presenta como sustentable. Los resultados obtenidos permitirán tener un mayor conocimiento sobre la estructura genética de *R. goodallii* y *R. sulcatus*, así como determinar la conectividad entre poblaciones distantes. Por otro lado, se desconoce si la especie continental *Chiton stokesii* es colectada para consumo local, pero al ser una especie similar a las otras dos canchalaguas resulta interesante determinar su estructura genética, así como inferir su conectividad a lo largo de diferentes localidades. El conocimiento de la variabilidad genética de las canchalaguas en Ecuador puede ser empleado para la evaluación de la capacidad de respuesta de las mismas ante cambios ambientales, impactos de la actividad pesquera, impactos de pérdida de recursos genéticos y también para la creación de planes estratégicos de conservación de poblaciones marinas (Piñero, 2008).

## **OBJETIVOS**

### **- Objetivo general**

Caracterizar la composición genética de las canchalaguas en Galápagos y en Ecuador continental empleando el secuenciamiento de siguiente generación con marcadores microsatelitales.

### **- Objetivos específicos**

Determinar si existe estructura genética entre diferentes localidades o por impacto humano.

- Inferir patrones de migración de los individuos entre diferentes localidades o impacto humano.

## MÉTODOS

### Áreas de estudio:

Ecuador es considerado uno de los países más megadiversos a nivel mundial. Consta con 14 áreas protegidas marinas y costeras, entre estas, reservas marinas, manglares y ecosistemas terrestres y marinos (Alvarado et al., 2017). Uno de los factores que influencia la diversidad marina es su oceanografía. En Ecuador, en el norte las aguas son cálidas y con baja salinidad debido a la corriente de Panamá. En el sur frías y con alta concentración de nutrientes debido a la corriente de Humboldt; mientras que en el centro del país se genera una mezcla de gradientes salinos y térmicos (Cruz, 2013). Las muestras analizadas en el presente estudio provinieron de cuatro provincias: Santa Elena, Manabí, Esmeraldas y Galápagos. Debido a que las especies de canchalagua en Galápagos son pescadas, las localidades de esa provincia fueron clasificadas por potencial impacto humano. Esto se lo hizo en relación a su cercanía a centros poblados, asumiendo que la accesibilidad a las localidades tendría un mayor impacto por parte de las personas que las capturan. De esta manera, Playa de los Perros en Santa Cruz, Montura en Floreana, y Tongo Reef en San Cristóbal fueron clasificadas como zonas de alto impacto humano, mientras que Caamaño en Santa Cruz, Luz del Día en Floreana y Rosa Blanca en San Cristóbal, de bajo (Tabla 1). Por el contrario, las localidades de colecta en el continente (solo para *C. stokesii*) no fueron clasificadas de la misma manera (Tabla 2), ya que se desconoce si esta especie es actualmente explotada.

### De campo:

A lo largo de los años 2014, 2015 y 2016 se recolectaron un total de 142 muestras de canchalaguas en la zona intermareal rocosa (62 de *R. goodallii*, 36 de *R. sulcatus* y 44 de *C. stokesii*), en 12 localidades en Galápagos y Ecuador continental (Tablas 1 y 2). La



recolecta de muestras se realizó con estudiantes de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ). En Galápagos, se buscó recolectar al azar 10 individuos por localidad, los cuales fueron colocados en etanol al 85%. Después, en el laboratorio del Galápagos Science Center (GSC), se extrajo el tejido y se colocó las muestras en tubos eppendorf con etanol al 85%. En el continente se seleccionó de 8-10 individuos al azar, se extrajo tejido y se colocó en tubos con etanol al 85%. Se transportaron las muestras al Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la USFQ donde se las mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La recolecta y la movilización de muestras se realizó 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.

#### **De laboratorio:**

##### **Extracción de ADN y cuantificación**

La extracción de ADN se hizo siguiendo los protocolos del kit DNeasy® Blood y Tissue (QIAGEN). Primero se tomó 20 mg de tejido y se lo cortó en pequeños pedazos. El tejido fragmentado se colocó en un tubo eppendorf de 1,5mL y se añadió 180  $\mu\text{L}$  de Buffer ATL con 20  $\mu\text{L}$  de proteinasa K. Se incubó a  $56^{\circ}\text{C}$ , con agitación de máximo 4 hrs o hasta que el tejido se encuentre lisado. A continuación, se agregó 200  $\mu\text{L}$  de etanol al 96% y se mezcló por vortex. El sobrenadante obtenido fue transferido a una columna de agitación DNeasy (DNeasy Mini spin column) que se centrifugó por 1 min a 8000 rpm. A continuación, se transfirió la columna a un nuevo tubo colector con 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW1, se centrifugó por 1 min a 8000 rpm, y se colocó la columna en un tubo colector nuevo. Posteriormente se agregó 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW2 y se centrifugó a 14000 rpm por 3 min. Finalmente, en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 mL se colocó la columna con 200  $\mu\text{L}$  de Buffer AE para diluir el ADN. Por 1 min se dejó reposar y se centrifugó por 1 min a 8000 rpm. El ADN se almacenó a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para la

cuantificación de ADN a partir de espectrofotometría se utilizó NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

### **Desarrollo de primers**

Para el desarrollo de los primers primero se realizó el proceso de secuenciamiento aleatorio para *Radsia goodallii*, para poder obtener secuencias repetidas en forma de tándem, las cuales podrían ser usadas para el desarrollo de primers viables para las tres especies de canchalaguas. A partir del kit Nextera DNA Preparation de Illumina se diseñó bibliotecas de extremos emparejados de ADN siguiendo los protocolos del fabricante. Con la plataforma web Galaxy-Golem, a cargo de la Universidad de Manchester, se utilizó las herramientas FASTQC: ReadQC tool v.051 (Andrews, S.F), TRIMMOMATIC v.0.30 (Bolger et al., 2014) y PAL\_finder v.0.02 (Rozen & Skalersky, 2000; Cock et al., 2009; Masella et al., 2012; Castoe et al., 2012), con lo que se observó la calidad de las secuencias, se las limpió y se buscó primers candidatos que se encontraban flanqueantes a los microsatélites. Se consideró motivos que presenten por lo menos dos nucleótidos de longitud y por lo menos ocho unidades de repetición. Finalmente se seleccionó 20 loci con microsatélites para *Radsia goodallii*, que presentaban motivos de dos, tres y cuatro nucleótidos que presentaban primers (Forward y Reverse) que solo se daban una vez en toda la secuencia. Estos primers fueron transferidos hacia las otras dos especies de canchalaguas, es decir para *Radsia sulcatus* y *Chiton stokesii*.

### **Evaluación de primers**

Para evaluar los 20 primers, se seleccionó al azar cinco muestras de ADN y se prosiguió a realizar las amplificaciones. Para la amplificación se empleó la enzima polimerasa de Platinum ® PCR SuperMix (Invitrogen) para las reacciones de PCR con un volumen de 10 µL. Las reacciones se encontraban conformadas por 9 µL de PCR SuperMIX, 0,2 µM de primer reverse, 0,2 µM de primer forward y 1,0 µL de ADN. Para

la amplificación se siguió el protocolo de Platinum<sup>®</sup> PCR SuperMix (Invitrogen), en donde la desnaturalización inicial se daba a 94°C por 2 min, 29 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, posteriormente la hibridación por 30 s, extensión a 72°C por 30 s y finalmente la extensión final a 72 °C por 10 min. Finalmente, para obtener los resultados se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con 3 µL de SYBR<sup>®</sup> Safe DNA gel stain (Invitrogen). En el gel se cargó 2µL de Bluejuice con 3 µL de amplicón y 3 µL del marcador del peso molecular. La corrida se dio a 100 V por 30 min y el gel revelado se realizó en foto-documentador Biorad Gel Doc XR.

### **Amplificación con primers marcados con fluoróforos**

Por medio de Multiplex Manager (Hollele y Geerts, 2009), 18 primers fueron agrupados en grupos de dos, y dos primers se evaluaron en reacciones independientes; éstos fueron marcados con los fluoróforos 6-FAM y HEX (Tabla 3). Se empleó la enzima Platinum<sup>TM</sup> Taq DNA Polymerase (Invitrogen) con volumen final de 10 µL. Las reacciones estaban conformadas por 2.0 µL de ADN, 0.60 unidades de Taq polimerasa Platinum (Invitrogen), 0.20 mM de dNTPs, 0.50 µM de cada primer, 1.50 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 1X de Buffer PCR (Invitrogen). Se colocó las muestras en el termociclador, manteniendo el perfil empleado en la selección de primers, exceptuando la temperatura de hibridación, la cual se tuvo que estandarizar nuevamente. Los productos obtenidos fueron colocados en cajas cubiertas con papel aluminio para evitar la exposición a la luz. De la muestra obtenida se utilizó 5 µL para realizar electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 100 V por 30 min, con lo que se comprobó la presencia de 142 muestras; el producto restante se lo guardo a -20°C. Para la secuenciación de productos de PCR se utilizaron placas de 96 pocillos cada una, en estas se agregó 10 µL del producto de la amplificación, se cerró las cajas y se las envolvió con papel plástico y papel aluminio. Las muestras se enviaron al Laboratorio de Biología Analítica del Museo Nacional

Smithsoniano de Historia Natural en Washington DC, Estados Unidos, para genotipar las muestras a través del secuenciador automático ABI PRISM 310.

### **Análisis de datos**

Tanto para *R. goodallii* como para *R. sulcatus* se llevó a cabo dos tipos de análisis: por localidad y por impacto humano (Tabla 1); mientras que para *C. stokesii* los análisis fueron realizados únicamente por localidad (Tabla 2).

### **Análisis de desequilibrio de ligamiento, frecuencia de alelos nulos y equilibrio Hardy-Weinberg (HW).**

A partir de la lectura de picos obtenidos con Gneious® se generó dos matrices: formato GenPop y una matriz alélica para R Studio, para los análisis estadísticos en R Studio® Versión 1.1.463. Para determinar el porcentaje de alelos nulos se utilizó el programa FreeNA (10000 replicaciones, Chapuis y Estoup, 2007), y el cálculo de marcadores ligados con GenPop (Raymond y Rousset, 1995). Mientras que para los análisis de equilibrio Hardy-Weinberg se utilizó el paquete *DiveRsity* (Keenan et al., 2013).

### **Diversidad y estructura genética**

Para el cálculo de diversidad genética de las tres especies se obtuvo heterocigosidad observada y esperada, número de alelos por locus y riqueza alélica a partir de los paquetes *DiveRsity* (Keenan et al., 2013) y *polysat* (Clark y Jasieniuk, 2011). Con el paquete *proprr* (Kamvar et al., 2014) se obtuvo alelos privados. Para la determinación de distancias genéticas se estimó los índices de Weir & Cockerham  $F_{st}$  con el paquete *hierfstat* (Goudet y Thibaut, 2015). También se realizó análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con el paquete *ade4* (Dray & Dufour, 2007) para visualizar relatividad o diferencias entre poblaciones (Goudet y Jombart, 2015). La estructura genética fue evaluada con métodos bayesianos con el programa *Structure* V2.3.4 con un

programa de clustering (K) de acuerdo con la composición de sus genotipos multilocus (Falush et al., 2003).

### **Endogamia**

Con el paquete de R *adegenet* se calculó el coeficiente de endogamia (F) para cada individuo a partir del cálculo de la razón de su probabilidad, donde F representa la probabilidad de que un individuo herede alelos idénticos a su ancestro. Los valores de F menores a 0.5 indican bajas probabilidades de eventos endogámicos (Jombart y Ahmed, 2011).

### **Migración**

Se creó una red de migración utilizando la información genética con métodos diferenciados, con el paquete *diveRsity* (Keenan et al., 2013) de R. Estos análisis muestran la probabilidad de un flujo génico entre poblaciones utilizando una matriz de distancia.

## **RESULTADOS**

### **Análisis de desequilibrio de ligamiento, frecuencia de alelos nulos y equilibrio Hardy-Weinberg (HW).**

Veinte microsatélites fueron probados en 142 individuos, 62 de *R. goodallii*, 36 de *R. sulcatus* y 44 de *C. stokesii*. Por el proceso de puntuación (scoring process) en *R. goodallii* se eliminaron cuatro microsatélites (Goo15, Goo17, Goo18 y Goo25), ya que parecían ser monomórficos por lo tanto menos informativos, quedando un total de 16 microsatélites. Siguiendo el mismo fundamento, para *R. sulcatus* se eliminaron cuatro microsatélites (Goo1, Goo17, Goo24 y Goo25) quedando con un total de 16 microsatélites. De igual manera, para *C. stokesii* se eliminó ocho microsatélites (Goo19, Goo29, Goo15, Goo27, Goo17, Goo18, Goo24, Goo25) quedando con un total de 12 microsatélites. Adicional a esto, para *R. goodallii*, tres pares de loci se encontraron

ligados en los análisis realizados por localidad: Goo19 & Goo8, Goo1 & Goo28, Goo10 & Goo28 (Tabla 4). Por esta razón y por la cantidad de porcentaje de alelos nulos (Tabla 7), Goo28 y Goo19 fueron adicionalmente eliminados, quedando con un total de 14 microsatélites en los análisis estadísticos de *R. goodallii* y presentando un 8.76% de missing data. Adicionalmente, nueve loci se encontraron fuera del equilibrio H-W cuando los análisis fueron hechos por localidad (Tabla 10) y diez por impacto humano (Tabla 11). Por otro lado, para *R. sulcatus*, cinco pares de loci se encontraron ligados con los análisis realizados por localidad: Goo19 & Goo8, Goo19 & Goo7, Goo19 & Goo3, Goo7 & Goo3 y Goo28 & Goo3 (Tabla 5). Por esta razón y por la cantidad de porcentaje de alelos nulos (Tabla 8), Goo28, Goo19 y Goo28 fueron adicionalmente eliminados, quedando un total de 13 microsatélites para los análisis estadísticos de *R. sulcatus* y presentando un 8.371% de missing data. Adicionalmente cinco loci se encontraron fuera del equilibrio H-W cuando los análisis fueron hechos por localidad (Tabla 12) y seis por impacto humano (Tabla 13). Finalmente, para *C. stokesii* no se encontraron locis ligados en los análisis por localidad (Tabla 6); tampoco hubo porcentajes de alelos nulos elevados (Tabla 9). Los loci para esta especie presentaron un porcentaje de missing data de 12.98% y cinco loci se encontraron fuera del equilibrio H-W (Tabla 14).

### **Diversidad Genética**

***Radsia goodallii*.** Se encontró 150 alelos en 14 loci (Tabla 15), con una proporción de alelos bastante variable, tanto por localidad (17.86 en Rosa Blanca y 70.31 en Caamaño, Tabla 16), como por impacto humano, (70.82 en alto y 82.01 en bajo, Tabla 17). El promedio de alelos por locus fue de 10.71 siendo G0024 el más polimórfico con 28 alelos (Tabla 15). Los análisis de heterocigocidad muestran valores moderados para todas las localidades; además, los valores de heterocigocidad observada fueron menores a la esperada para todas las localidades (Tabla 16). Por otro lado, las heterocigocidades

(esperadas y observadas) fueron menores en las localidades de alto impacto humano, así como las observadas menores que las esperadas (Tabla 17). En el caso de riqueza alélica, los valores fueron bajos para Rosa Blanca (0.77), pero bastante uniformes para el resto de las localidades (Tabla 16); éstas no se diferenciaron mucho por impacto humano (Tabla 17). En el caso de los alelos privados, la localidad de Caamaño se diferenció del resto, mostrando 15 alelos privados, mientras las otras localidades tuvieron todos valores menores a 10 (Tabla 16); en el caso de los análisis hechos por impacto humano, las localidades de bajo impacto mostraron un valor más alto (Tabla 17).

***Radsia sulcatus***. Se encontró un total de 103 alelos en 13 loci (Tabla 15), con una proporción de alelos bastante uniforme a lo largo de todas las localidades (Tabla 16), así como por impacto humano (Tabla 17). El promedio de alelos por locus fue 7.92 siendo Ch4 y Goo12 los alelos más polimórficos con 12 cada uno (Tabla 15). Al igual que para *R. goodallii*, los análisis de heterocigocidad para *R. sulcatus* muestran valores moderados para todas las localidades; además, ningún valor de heterocigocidad observada supera a los de la esperada (Tabla 16). Por otro lado, las heterocigocidades (esperadas y observadas) fueron menores en las localidades de alto impacto humano, así como las observadas menores que las esperadas para este contraste (Tabla 17). Con respecto a los alelos privados, se muestran valores de 3 en Rosa Blanca y 12 en Playa de los Perros (Tabla 16); a diferencia de *R. goodalli*, el número de alelos privados para *R. sulcatus* en localidades con alto impacto humano fue mayor que en aquellas de bajo (Tabla 17). Finalmente, los valores de riqueza alélica fueron bastante uniformes a lo largo de las localidades (Tabla 16), así como por impacto humano (Tabla 17).

***Chiton stokesii***. Se encontró un total de 74 alelos en 12 loci (Tabla 16). La proporción de alelos encontrados fue bastante uniforme a lo largo de todas las localidades, con excepción de La Tiñosa, donde se muestran valores bajos (Tabla 16). El promedio de

alelos por locus fue 6.17 con Goo1 siendo el más polimórfico con 12 alelos (Tabla 15). Los análisis de heterocigocidad presentan valores moderados para todas las localidades, con la excepción de Machalilla, donde la  $H_o$  fue 0.38 (Tabla 16). Al igual que las canchalaguas de Galápagos, los valores de heterocigocidad observada son menores a los de la esperada; una vez más, Machalilla fue la excepción, pues ocurrió lo contrario (Tabla 16). Con respecto a los alelos privados éstos se muestran más bajos que las especies de Galápagos, siendo Machalilla el sitio que presenta los más bajos (1) y La Tiñosa los más altos (9). De igual manera, la riqueza alélica se vio más baja para esta especie, sin embargo los valores son bastante uniformes a lo largo de todas las localidades (Tabla 17).

### **Distancias genéticas y estructura poblacional**

***Radsia goodallii***. Las distancias genéticas ( $F_{st}$ ) entre localidades para *Radsia goodallii* fueron muy bajas, presentando valores entre -0.006 y 0.050 y con la mayor diferencia entre las localidades de Montura en Floreana y Tongo Reef en San Cristóbal (Tabla 18). Los análisis de PCoA fueron consistentes con esto, ya que se presentó muy poca diferenciación entre las localidades. La única excepción fue Caamaño, que se muestra un poco más apartada que las demás (Fig. 1a). En el caso de análisis por impacto humano, el PCoA determinó que las muestras de bajo impacto humano presentan una mayor distribución en comparación con las de alto impacto humano; a pesar de esto no se presentó una disgregación evidente en relación al impacto humano (Fig. 1b). La composición genética en Structure muestra una  $K=2$ , sugiriendo que dos poblaciones explican mejor la variabilidad de datos, tanto por localidad como por impacto humano (Fig. 4). Sin embargo, no se evidencia estructura genética entre las localidades, con la única excepción de Caamaño, en donde se ve *admixture* (Fig. 4a).

***Radsia sulcatus***. Para *R. sulcatus* las distancias genéticas fueron también muy bajas, con valores  $F_{st}$  entre 0.032 - 0.057 siendo la diferencia más grande entre Playa de



los Perros en Santa Cruz y Luz del Día en Floreana (Tabla 19). De manera similar a *R. goodallii*, los análisis de PCoA para *R. sulcatus* fueron consistentes para la estructura poblacional: se presentó muy baja diferenciación entre las localidades (Fig. 2a), o entre tipo de impacto humano (Fig. 2b). La composición genética en Structure presenta  $K=2$ , cuando los análisis fueron por localidad (Fig. 5a), mientras que por impacto humano fue  $K=9$ . A pesar de esto, se escogió la segunda mejor  $K=2$ , asumiendo que dos poblaciones explican mejor la variabilidad de datos (Fig. 5b).

***Chiton stokesii*.** Los valores de distancias genéticas para *C. stokesii* fueron asimismo bajos, fluctuando entre 0.045 y 0.1489 (Tabla 20); sorprendentemente, la mayor diferencia fue entre Machalilla y La Playita, ambas localidades en Manabí. Los análisis de PCoA corroboraron las bajas distancias genéticas: las localidades no se distanciaron significativamente entre sí, ni se agruparon por ubicación geográfica. Sin embargo, a diferencia de las especies de Galápagos, las localidades de *C. stokesii* no se superpusieron tanto (Fig. 3). La composición genética en Structure arrojó una  $K=3$ , sugiriendo que tres poblaciones explican de mejor manera la variabilidad de los datos (Fig. 6).

### **Endogamia**

La densidad de la probabilidad de  $F$  (coeficiente de endogamia) para las tres especies, tanto en los análisis por localidad (tres especies), como por impacto humano (especies de Galápagos), muestran que ninguna especie presenta altas probabilidades de haber sufrido un evento de endogamia (valores altos  $F > 0.6$ ), ya que la mayoría de los datos se ubican entre los coeficientes 0.1 y 0.6 (Figs. 7-9).

### **Migración**

***Radsia goodallii*.** La red de migración por localidad indica que existe relativamente una alta migración entre todas las localidades. Sin embargo, es muy

evidente la migración de Tongo Reef a Playa de los Perros, de Playa de los Perros a Luz del Día, y, de Rosa Blanca a Luz del día (Fig. 10).

***Radsia sulcatus***. La red de migración por localidad indica que existe una migración moderada entre todas las localidades. A pesar de esto, la migración entre Rosa Blanca y Tongo Reef es muy evidente en comparación con las demás localidades. (Fig. 11).

***Chiton stokesii***. La red de migración por localidad indica que existe una migración moderadamente alta entre todas las localidades. A pesar de esto, la migración entre La Tiñosa y La Entrada, y entre La Entrada y Estero del Plátano es muy evidente en comparación con las demás localidades (Fig. 12).

## DISCUSIÓN

Al ser la extinción un proceso que no puede ser revocado, éste se ha convertido en el principal incentivo para motivar la conservación de las especies, la cual se encuentra ligada a la diversidad biológica de las mismas. En el caso de las especies marinas comerciales, cuando se extinguen o sus poblaciones se reducen, la recolección es usualmente trasladada a otra especie de similares características lo cual magnifica el impacto de pérdida en el sistema (Kenchington, 2003). Cada vez más, los científicos y los economistas se vuelven más conscientes de las implicaciones de la pérdida de una especie comercial y su impacto en procesos biológicos y funcionamiento de ecosistemas, de igual forma que el impacto generado en la sociedad humana (Kenchington, 2003). Es por lo cual en el presente estudio se obtuvo mayor conocimiento sobre la estructura genética, la conectividad y el flujo génico de las tres canchalaguas (*Radsia goodallii*, *Radsia sulcatus* y *Chiton stokesii*) entre diferentes localidades, y, para las dos primeras entre poblaciones expuestas a alto o bajo impacto humano, mediante el uso de

marcadores microsatélites diseñados específicamente para *R. goodallii* empleando información de su genoma, y posteriormente trasladando estos marcadores moleculares a las otras dos especies de canchalaguas. Se encontró niveles moderados de diversidad genética reflejados a través de la heterocigosidad (0.25 – 0.62), y, se presentó una mínima diferencia entre la heterocigosidad esperada y la observada, con valores más altos en la primera en todas las localidades (a excepción de Machalilla para *C. stokesii*) (Tablas 16 y 17). Por otra parte, no se encontró estructura genética para ninguna de las tres canchalaguas, a excepción de la localidad Caamaño en Santa Cruz para *R. goodallii*, donde se mostró para la mayoría de los individuos admixture (Figuras 1a y 4a). Tampoco se encontró para ninguna de las tres especies un patrón definido de flujo génico que pueda estar relacionado a corrientes marinas o a la ubicación geográfica en los análisis de migración (Figuras 10-12).

Para los análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) en *R. goodallii* nueve locis se encontraron fuera del equilibrio H-W en los análisis por localidad, y diez locis en los análisis por impacto humano (Tablas 10 y 11). Para las muestras de Rosa Blanca en San Cristóbal, el desequilibrio de H-W pudo haberse generado por la pequeña muestra de canchalaguas recolectadas ( $n=2$ ). Para el resto de locis en desequilibrio con mayor número de individuos colectados, el desequilibrio pudo haberse generado por fuerzas selectivas que actúan en las regiones de los microsatélites (Delanghi et al., 2016). En los análisis por impacto humano el mayor número de loci ligados puede ser explicado a partir de que para estos análisis se hizo una agrupación de las localidades catalogadas como de alto impacto humano en un grupo (cinco locis fuera del equilibrio H-W), y en otro grupo las localidades consideradas de bajo impacto humano (diez loci fuera del equilibrio de H-W), en donde las localidades de bajo impacto humano presentan mayor número de alelos fuera del equilibrio de H-W, incluyendo en esta agrupación a la localidad de Rosa Blanca

donde por la falta de datos no se generan valores para los análisis de equilibrio de H-W. En el caso de *R. sulcatus* cinco loci en los análisis por localidad y seis loci en los análisis por impacto humano se mostraron fuera del equilibrio de H-W (Tablas 12 y 13). El marcador Goo13 se mostró fuera del equilibrio de H-W para todas las localidades el cual no se encuentra ligado a otros marcadores ni presenta altos porcentajes de alelos nulos (Tablas 5 y 8), por lo cual el desequilibrio de este marcador podría ser explicado por errores de genotipado, como explica Morin et al. (2009), donde puede producirse un “allelic dropout” el cual es una fuente común de missing data, donde una o ambas copias de alelos en un locus falla para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Finalmente, en el caso de *C. stokesii*, cinco loci se encontraron fuera del equilibrio H-W en los análisis por localidad (Tabla 14), donde las muestras recolectadas en la localidad La Entrada en la provincia de Santa Elena fueron únicamente de dos individuos, por lo que el desequilibrio pudo haberse generado por la muestra muy pequeña en comparación con las demás localidades (Hale et al., 2012).

En el caso de los índices de diversidad genética para *R. goodallii*, *R. sulcatus* y *C. stokesii* se evidenció bajo número de alelos por locus, al igual que una baja riqueza alélica, un elevado número de alelos privados y una heterocigocidad moderada tanto en los análisis por localidad como por impacto humano (Tablas 16 y 17). Al comparar estos valores con otras especies de moluscos, Lounnas et al. (2017) reportó para *Galba cubensis* un promedio de alelos por locus de 4.33; Jaksch et al. (2017) para *Clausiliidae snails* de 15.07, y, Adcock et al. (1999) para *Illex argentinus* de 24.1 durante el periodo de pesca intensa para la última especie; por lo que se puede determinar que el promedio de alelos por locus encontrados para las tres especies de canchalaguas en Ecuador se muestra un poco baja en comparación a la media obtenida en otras especies de moluscos explotados y no explotados. La baja riqueza alélica encontrada es obtenida a partir del número

promedio de alelos por locus. Es por esto por lo que, una reducción en la riqueza alélica podría derivar en la reducción del potencial de las tres poblaciones de canchalaguas a adaptarse a futuros cambios ambientales, dado que esta diversidad es primordial para la evolución por selección natural (Greenbaum et al., 2014).

En *R. goodallii* en los análisis por localidad los alelos privados variaron entre 5 y 15, con excepción de la localidad de Rosa Blanca donde no se presentaron alelos privados, y en los análisis por impacto humano entre 27 y 48. En *R. sulcatus* la variación en las localidades fue entre 3 y 12, y por impacto humano entre 17 y 21. Mientras que para *C. stokesii* los alelos privados variaron entre 1-9 (Tablas 16 y 17). Al contrastar con un estudio realizado con el bivalvo *Cerastoderma edule*, Martínez et al. (2013) encontró entre 0 – 4 alelos privados en las poblaciones analizadas, por lo que se podría considerar que las tres canchalaguas poseen un elevado número de alelos privados tanto en las localidades como en las agrupaciones de alto impacto y bajo impacto humano. Guiller et al. (1996) explica que las frecuencias de alelos privados decrecen en el caso de tratarse de poblaciones cercanas, por lo que es sorprendente observar muchos alelos privados entre poblaciones cercanas. Dicho incremento de frecuencia de alelos raros en poblaciones que se hibridan ha sido descrito de forma considerable en otras especies, como son los moluscos terrestres, como los caracoles *Partula* y *Cerion*. Múltiples mecanismos, incluyendo altos rangos de mutación y selección relajada, se muestran como la explicación al incremento local de alelos privados. Por otro lado, Holland et al. (2017) determinó para las especies *Eunicella verrucosa* y *Alcyonium digitatum* que las poblaciones aisladas normalmente contienen alelos raros, es decir que en estos sitios se encuentra el mayor porcentaje de alelos privados, pero podrían reclutarse más lentamente y podrían ser aislados genéticamente, incrementando la vulnerabilidad y reduciendo la resiliencia, por lo tanto, incrementando la necesidad de protección de estas poblaciones.

En el caso de la heterocigocidad, los análisis de diversidad genética mostraron niveles moderados (0.25-0.62), tanto para las especies explotadas (*R. goodallii*, *R. sulcatus*), como para *C. stokesii*; se detectó una sutil diferencia entre la heterocigocidad esperada con la observada, con valores más altos en la primera en todas las localidades, a excepción de Machalilla para *C. stokesii* (Tabla 16). Una  $H_e > H_o$ , podría indicar que existen fuerzas externas como eventos climáticos o la sobrepesca de las canchalaguas que está provocando la eliminación de las frecuencias bajas de alelos (Nei et al., 1975; Caballero y García-Dorado, 2013).

Tanto las dos especies comerciales de canchalaguas de Galápagos, como la especie posiblemente no comercial del continente, no presentaron alguna estructura poblacional, ya que las distancias genéticas entre localidades variaron entre 0.006 – 0.050 para *R. goodallii*, 0.032 - 0.057 para *R. sulcatus* y 0.045 – 0.1489 para *C. stokesii* (Tablas 18, 19 y 20). De igual forma, de acuerdo a los análisis de PcoA y de Structure, se mostró una falta de estructura genética tanto en los análisis por localidad como por impacto humano (Figuras 1 – 6). Estos datos concuerdan con los obtenidos por Perez et al. (2016), usando marcadores microsatélites en el caracol *Bithynia tentaculata*. La alta conectividad de estas poblaciones podría ser explicada por su etapa larval, la cual, a pesar de no ser muy duradera, como encontró Lord (2011) para la canchalagua *Cryptochiton stelleri*, las corrientes de los océanos arrastran todas las larvas trocóforas (nadan libremente y son ciliadas) por todo el espacio, por lo que los factores biofísicos también cumplen un rol importante en la conectividad entre las poblaciones. A pesar de esto, es todavía importante estudiar a más profundidad la duración de la etapa larval *R. goodallii*, *R. sulcatus* y *C. stokesii* y su interacción con las corrientes.

En este estudio los eventos de endogamia se mostraron poco probables, dado que menos de 1 – 2 individuos presentó alta probabilidad de heredar alelos idénticos de

ancestros relacionados, tanto en los análisis por localidad, como por impacto humano (Figuras 7 – 9). Esto indica que tanto las poblaciones de canchalaguas de Galápagos (*R. goodallii* y *R. sulcatus*) como la especie del continente (*C. stokesii*) tienen o se encuentran muy cercanas a su tamaño ideal de población; estos datos son similares a los obtenidos por Moreira et al. (2011) en un estudio con seis marcadores microsatélites en el pulpo *Octopus vulgaris*.

Los patrones de dispersión en las tres especies de canchalaguas se dan en la etapa larval, la cual para *Cryptochiton stelleri* es reportada como una etapa muy corta, (5 días post-fertilización; Lord, 2011). Las redes de migración de las tres especies de canchalaguas muestran que existe una migración relativamente alta para todas las localidades. En *R. goodallii* se muestra un patrón mucho más evidente entre Tongo Reef en San Cristóbal a Playa de los Perros en Santa Cruz, de Playa de los Perros a Luz del Día en Floreana, de Rosa Blanca en San Cristóbal a Luz del Día (Fig. 10). En el caso de *R. sulcatus* la migración es mucho más evidente entre las localidades de Rosa Blanca y Tongo Reef las dos ubicadas en la isla San Cristóbal (Figura 11). Mientras que para *C. stokesii* la migración es mucho más evidente entre las localidades La Tiñosa en la provincia de Manabí, ubicada latitudinalmente en el centro de Ecuador continental, y La Entrada en la provincia de Santa Elena (latitudinalmente en el sur de la costa ecuatoriana), y entre las localidades La Entrada y Estero del Plátano en la provincia de Esmeraldas, ubicada latitudinalmente en el norte de Ecuador continental (Figura 12). Los patrones de migración de las tres especies de canchalaguas son interesantes de evaluar, dado que la dispersión de estas especies ocurre mientras son larvas trocóforas, y al analizar los patrones de migración se evidencia que existe una alta conectividad poblacional genéticamente hablando entre localidades ubicadas en diferentes islas (para

las especies *R. goodallii* y *R. sulcatus*) y entre localidades geográficamente aisladas, en el caso de *C. stokesii*.

Finalmente, con respecto al tamaño de muestra por localidad, Caamaño para *Radsia goodallii* presentó 19 individuos colectados, mientras que *Radsia sulcatus* no presentó ningún individuo para la localidad mencionada anteriormente. Esto se produjo ya que inicialmente diez individuos de la localidad de Caamaño en el momento de la recolección de muestras fueron etiquetados como *R. sulcatus*, a pesar de esto, al verificar los vouchers en el laboratorio, éstos eran más parecidos a *R. goodallii*, por lo que se tomó la decisión de añadir estas muestras a *R. goodallii*, quedando con una muestra total para la localidad de Caamaño de 19 individuos (Tabla 1). Sin embargo, la localidad de Caamaño resulta interesante, ya que presenta mayor proporción de alelos privados (Tabla 16), se aleja de las demás localidades en el PcoA (Figura 1), y presenta admixture en los análisis de estructura poblacional (Figura 4); interesantemente los mismos resultados se obtuvieron excluyendo a los 10 individuos extra de la localidad de Caamaño (Brandt M, datos no publicados). Aunque se necesitan estudios más exhaustivos para determinar las razones por las que las muestras de Caamaño arrojaron resultados tan diferentes al resto de localidades, podría pensarse que el islote Caamaño está aislado oceanográficamente del resto dado el mayor porcentaje de alelos privados y por las razones expuestas en los párrafos anteriores (Guiller et al., 1996; Holland et al., 201), o podría tratarse de hibridación de las dos especies en esta localidad, tal como Guiller et al. (1996) lo encontró para los moluscos terrestres *Partula* y *Cerion*.

## CONCLUSIÓN

Al comparar a las especies explotadas (*R. goodallii* y *R. sulcatus*) con la especie posiblemente no explotada (*C. stokesii*) los índices de diversidad genética reflejados en



la heterocigosidad mostraron valores medios, siendo estos valores muy similares para las tres especies. Al comparar con otras especies explotadas los valores medios de heterocigosidad nos indican que los tres quitones no están perdiendo su diversidad genética, a pesar de esto es importante tomar en cuenta los valores de alelos privados, en donde al presentar elevados valores para localidades cercanas están expresando un posible aislamiento, siendo este más evidente en la localidad de Caamaño en la isla Santa Cruz. Sin embargo, en los análisis de migración se presentó un flujo génico bastante consistente entre localidades para cada uno de los quitones. Esta alta conectividad explicada posiblemente por la dispersión larval de las especies, es probablemente la que está afectando de forma positiva a mantener la diversidad genética de las especies explotadas. De igual forma, ninguna de las tres canchalaguas mostró una estructura genética poblacional definida (a excepción de Caamaño), la cual puede verse influenciada por la alta conectividad de las especies, por lo que se podría sugerir que las especies catalogadas como de bajo impacto humano están rescatando a las especies catalogadas de alto impacto humano, impidiendo de tal forma un aislamiento poblacional definido, siendo esto crucial al tratarse de especies explotadas por el ser humano.

## 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*, 2014.
- Adcock, G. J., Shaw, P. W., Rodhouse, P. G., & Carvalho, G. R. (1999). Microsatellite analysis of genetic diversity in the squid *Illex argentinus* during a period of intensive fishing. *Marine Ecology Progress Series*, 187, 171-178.
- Aguilera, M. A. (2011). The functional roles of herbivores in the rocky intertidal systems in Chile: A review of food preferences and consumptive effects. *Revista Chilena de Historia Natural*, 84(2).
- Allendorf, F. W., England, P. R., Luikart, G., Ritchie, P. A., & Ryman, N. (2008). Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in ecology & evolution*, 23(6), 327-337.
- Alvarado, J. J., Aburto-Oropeza, O., Abad, R., Barraza, E., Brandt, M., Cantera, J., ... & Maté, J. L. (2017). Coral reef conservation in the eastern tropical Pacific. In *Coral Reefs of the Eastern Tropical Pacific* (pp. 565-591). Springer, Dordrecht.
- Begg, G. A., Friedland, K. D., & Pearce, J. B. (1999). Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview. *Fisheries Research*, 43(1-3), 1-8.
- Caballero, A., & García-Dorado, A. (2013). Allelic diversity and its implications for the rate of adaptation. *Genetics*, 195(4), 1373-1384.
- Castoe, T. A., Poole, A. W., de Koning, A. J., Jones, K. L., Tomback, D. F., Oyler-McCance, S. J., ... & Pollock, D. D. (2012). Rapid microsatellite identification from Illumina paired-end genomic sequencing in two birds and a snake. *PLoS one*, 7(2), e30953.

- Chapuis, M. P., & Estoup, A. (2006). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution*, 24(3), 621-631.
- Clark, L., & Jasieniuk, M. (2011). POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 562–566.
- Cowen, R. K., Paris, C. B., & Srinivasan, A. (2006). Scaling of connectivity in marine populations. *Science*, 311(5760), 522-527.
- Cock, P. J., Antao, T., Chang, J. T., Chapman, B. A., Cox, C. J., Dalke, A., ... & De Hoon, M. J. (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinformatics*, 25(11), 1422-1423.
- Cruz, M. (2013). Especies de moluscos submareales e intermareales y macrofauna bentónica de la Bahía de Manta, Ecuador.
- Dray, S., & Dufour, A. B. (2007). The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22(4), 1–20.
- Dulvy, N. K., Sadovy, Y., & Reynolds, J. D. (2003). Extinction vulnerability in marine populations. *Fish and fisheries*, 4(1), 25-64.
- Eguiarte, L. E., Aguirre-Liguori, J. A., Jardón-Barbolla, L., Aguirre-Planter, E., & 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., & Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, 17(7), 422-433.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567-1587.

- Frankham, R. (2003). Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies*, 326, 22-29.
- Finet, Y., Chiriboga, A., Ruiz, D., Banks, S., & Tirado, N. (2011). CDF Checklist of Galapagos marine mollusks. *Charles Darwin Foundation Galapagos species checklist*, 1-164.
- Gawarkiewicz, G., Monismith, S., & Largier, J. (2007). Observing larval transport processes affecting population connectivity: progress and challenges. *Oceanography*, 20(3), 40-53.
- Goudet, J., & Thibaut, J. (2015). Hierfstat: Estimation and Tests of Hierarchical F-Statistics. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=hierfstat>
- Greenbaum, G., Templeton, A. R., Zarmi, Y., & Bar-David, S. (2014). Allelic richness following population founding events—a stochastic modeling framework incorporating gene flow and genetic drift. *PloS one*, 9(12), e115203.
- Griffiths, S. M., Fox, G., Briggs, P. J., Donaldson, I. J., Hood, S., Richardson, P., ... & Preziosi, R. F. (2016). A Galaxy-based bioinformatics pipeline for optimised, streamlined microsatellite development from Illumina next-generation sequencing data. *Conservation Genetics Resources*, 8(4), 481-486.
- Guiller, A., Coutellec-Vreto, M. A., & Madec, L. (1996). Genetic relationships among suspected contact zone populations of *Helix aspersa* (Gastropoda: Pulmonata) in Algeria. *Heredity*, 77(2), 113.
- Hale, M. L., Burg, T. M., & Steeves, T. E. (2012). Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PloS one*, 7(9), e45170.
- Hartl, D. L., Clark, A. G., & Clark, A. G. (1997). *Principles of population genetics* (Vol. 116). Sunderland: Sinauer associates.

- Herrera, A., Bustamante, R. H., & Shepherd, S. (2003). The fishery for endemic chitons in the Galapagos Islands. *Noticias de Galápagos*, 62, 24-28.
- Holland, L. P., Jenkins, T. L., & Stevens, J. R. (2017). Contrasting patterns of population structure and gene flow facilitate exploration of connectivity in two widely distributed temperate octocorals. *Heredity*, 119(1), 35.
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters*, 11(6), 609-623.
- Jaksch, K., Kruckenhauser, L., Haring, E., & Fehér, Z. (2017). First establishment of microsatellite markers in clausiliid snails (Mollusca: Gastropoda: Clausiliidae). *BMC research notes*, 10(1), 137.
- Jombart, T., & Ahmed, I. (2011). adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 27(21), 3070-3071.
- Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T. F., Crozier, W. W., & Prodöhl, P. A. (2013). diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, 4(8), 782-788.
- Kenchington, E. L. (2003). 14 The Effects of Fishing on Species and Genetic Diversity. *Responsible fisheries in the marine ecosystem*, 235.
- Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R., & Pandey, B. K. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, 2(4), 141.
- Kuo, C. H., & Janzen, F. J. (2004). Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles (*Terrapene ornata*). *Conservation Genetics*, 5(4), 425-437.
- Liu, X., Cao, Y., Xue, T., Wu, R., Zhou, Y., Zhou, C., ... & Wu, X. (2017). Genetic structure and diversity of *Nodularia douglasiae* (Bivalvia: Unionida) from the

- middle and lower Yangtze River drainage. *PloS one*, 12(12), e0189737.
- Lord, J. P. (2011). Larval development, metamorphosis and early growth of the gumboot chiton *Cryptochiton stelleri* (Middendorff, 1847)(Polyplacophora: Mopaliidae) on the Oregon coast. *Journal of Molluscan Studies*, 77(2), 182-188.
- Lounnas, M., Vázquez, A. A., Alda, P., Sartori, K., Pointier, J. P., David, P., & Hurtrez-Boussès, S. (2017). Isolation, characterization and population-genetic analysis of microsatellite loci in the freshwater snail *Galba cubensis* (Lymnaeidae). *Journal of Molluscan Studies*, 83(1), 63-68.
- Martínez, L., Méndez, J., Insua, A., Arias-Pérez, A., & Freire, R. (2013). Genetic diversity and population differentiation in the cockle *Cerastoderma edule* estimated by microsatellite markers. *Helgoland marine research*, 67(1), 179.
- Masella, A. P., Bartram, A. K., Truskowski, J. M., Brown, D. G., & Neufeld, J. D. (2012). PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC bioinformatics*, 13(1), 31.
- Ministerio del Ambiente. (2016). Resolución No. 62. Obtenido el 21 de Agosto del 2018 desde:<http://www.galapagos.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2019/07/00062.pdf>
- Molina, L., Chasiluisa, C., Murillo, J. C., Moreno, J., Nicolaidis, F., Barreno, J. C., ... & Bautil, B. (2003). Pesca blanca y pesquerías que duran todo el año, 2003. *Evaluacion de las pesquerias en la reserva marina de Galapagos Informe compendio*.
- Moreira, A. A., Tomás, A. R. G., & Hilsdorf, A. W. S. (2011). Evidence for genetic differentiation of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) fishery populations from the southern coast of Brazil as revealed by microsatellites. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 407(1), 34-40.

- Morin, P. A., Leduc, R. G., Archer, F. I., Martien, K. K., Huebinger, R., Bickham, J. W., & Taylor, B. L. (2009). Significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium caused by low levels of microsatellite genotyping errors. *Molecular Ecology Resources*, 9(2), 498-504.
- Murillo, J. (2009). Abundancia y dinámica poblacional de *Chiton goodalli* y *Chiton sulcatus* en el litoral pacífico de isla San Cristóbal. (Tesis de maestría). Centro de investigación y estudios avanzados del instituto politécnico nacional. Mérida, Yucatán, México.
- Nei, M., Maruyama, T., & Chakraborty, R. (1975). The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29(1), 1-10.
- Palumbi, S. (2003). Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, 13(1), S146-S158.
- Perez, K. E., Werren, R. L., Lynum, C. A., Hartman, L. A., Majores, G., & Cole, R. A. (2016). Genetic structure of faucet snail, *Bithynia tentaculata* populations in North America, based on microsatellite markers. *Freshwater Mollusk Biology and Conservation*, 19(2), 56-68.
- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D., Canteros, C. E., & Casas, A. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *Capital natural de México*, 1, 437-494.
- Raymond, M. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, 86, 248-249.
- Reyes-Gómez, A., Ortigosa, D., & Simões, N. (2017). Chitons (Mollusca, Polyplacophora) from Alacranes Reef, Yucatan, Mexico. *ZooKeys*, (665), 1.

- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 365-386). Humana Press, Totowa, NJ.
- Szpiech, Z. A., & Rosenberg, N. A. (2011). On the size distribution of private microsatellite alleles. *Theoretical population biology*, 80(2), 100-113.
- Vintimilla, C. (2019). Caracterización de la población de canchalagua (*Radia goodallii* y *Radsia sulcatus*) en la isla San Cristóbal, Galápagos, Ecuador, para la recomendación de medidas de manejo (Tesis de maestría). Universidad Nacional, Costa Rica
- Vinueza, L., Post, A., Guarderas, P., Smith, F., & Idrovo, F. (2014). Ecosystem-based management for rocky shores of the Galapagos Islands. In *The Galapagos Marine Reserve* (pp. 81-107). Springer International Publishing.
- Willi, Y., & Hoffmann, A. A. (2009). Demographic factors and genetic variation influence population persistence under environmental change. *Journal of evolutionary biology*, 22(1), 124-133.



## TABLAS

**Tabla 1.** Número de individuos de *R. goodallii* y *R. sulcatus* colectados en las Islas Galápagos por isla, localidad y potencial impacto humano.

Especie	Isla	Localidad	Potencial Impacto Humano	Número de individuos	Coordenadas	
<i>Radsia goodallii</i>	Santa Cruz	Caamaño	Bajo	19	Lat: 0.7500° S Lon: 90.3000° O	
		Playa de los Perros	Alto	11	Lat: 0.7433° S Lon: 90.3157° O	
	Floreana	Luz del Día	Bajo	10	Lat: 1.2304° S Lon: 90.4756° O	
		Montura	Alto	10	Lat: 0.8305° S Lon: 89.3300° O	
	San Cristóbal	Rosa Blanca	Bajo	2	Lat: 0.9008° S Lon: 89.6075° O	
		Tongo Reef	Alto	10	Lat: 0.7500° S Lon: 90.3000° O	
	<i>Radsia sulcatus</i>	Santa Cruz	Caamaño	Bajo	0	Lat: 0.7500° S Lon: 90.3000° O
			Playa de los Perros	Alto	8	Lat: 0.7433° S Lon: 90.3157° O
		Floreana	Luz del Día	Bajo	10	Lat: 1.2304° S Lon: 90.4756° O
			Montura	Alto	0	Lat: 0.8305° S Lon: 89.3300° O
San Cristóbal		Rosa Blanca	Alto	8	Lat: 0.8305° S Lon: 89.33° O	
		Tongo Reef	Bajo	10	Lat: 0.9008° S Lon: 89.6075° O	

**Tabla 2.** Número de individuos de *C. stokesii* colectados en el continente, por ubicación geográfica, provincia, localidad y localidad.

Especie	Ubicación geográfica continental	Provincia	Localidad	Número de individuos	Coordenadas
<i>Chiton stokesii</i>	EC-Norte	EsmERALDAS	Estero del Plátano	10	Lat: 0.7766° N Lon: 80.09° O
		EsmERALDAS	Playa Escondida	8	Lat: 0.8177° N Lon: 80.01° O
	EC-Centro	Manabí	La Tiñosa	10	Lat: 0.9500° N Lon: 80.7162° O
		Manabí	La Playita	4	Lat: 1.6795° S Lon: 80.8037° O
	EC-Sur	Manabí	Machalilla	2	Lat: 1.4887° S Lon: 80.7739° O
		Santa Elena	La Entrada	10	Lat: 1.4761° S Lon: 80.7644° O



	R: CAGTTGGAGATGAAAAATGAATACGTCCC F: CCTCAGTAATAACGACAGTTATCGTACCCG R: AAGAGGACGGAGCAATTCATCAGGG	43	58		157-172	AAC(27)	HEX	SI	4
Goo8		47	62						
	R: AAGAGGACGGAGCAATTCATCAGGG	52	59						
<b>Goo1</b>	<b>F: CCAAGGACTGATATGCTGGGCG</b> <b>R: ACGGTGCTGGTGTCAAGCC</b>	<b>54</b> 59	<b>59</b> 59		<b>179-351</b>	<b>AAAAT(32)</b>	<b>6-FAM</b>	<b>NO</b>	<b>5</b>
Goo29	F: CAATTCCTTATTGCGCATCTTATGGCG R: GGATAGTCGCCCAATAAATACTACAAACCC	42 48	56 60		156-162	AC(16)	HEX	SI	5
Goo7	F: AGCGAATAACATGTGTCTACTCCCC R: CTTACCATCCAAAACATTTCACTGCG	50 44	57 56		183-201	ACC(30)	6-FAM	SI	1
Goo3	F: GTATCAACGAGCACTGCCAGAACCC R: CGTACTTGTCTCAATTTTATTTCCGGTGG	56 44	61 58		311-403	ATAC(32)	6-FAM	SI	1
Ch4	F: GGTGATTTTCCCAAGTTCACCTGCG R: AAACCCCAAAACACCTATAGGACGG	52 48	59 58		208-298	ATT(24)	6-FAM	SI	9
Goo6	F: CAGATGAGGTGTACGGTGATGAGGG R: GGTGTTACAGGCTGGGTATTGGG	56 58	61 61		178-196	ATC(24)	6-FAM	SI	2
Goo14	F: TACAACCTACAGCATTTTGTGCCCC R: TGTGTACAGGTGCGTGAAGTAGCCC	48 56	58 61		134-169	AC(16)	HEX	SI	2
Goo9	F: CATGAAGACATGTGGTACAGCACCC R: CTTTTCTGGCTCCAAACCTTATGGC	52 52	59 59		74-88	AAC(24)	6-FAM	SI	6
Goo12	F: CACCATGATTAACACATGATGCCCC R: GGCAGAGGGATTGTAAAACGACGG	48 54	58 59		112-172	AT(22)	HEX	SI	6
Goo15	F: TAAATCGGTTGTGGTTAAGGTTGCC R: TTAGCGTATAAGGCTGGACAGAGGC	44 52	56 59		175-187	AC(18)	6-FAM	SI	3
Goo10	F: TTTTCGTTATGTGCATCACAAATCCCC R: TTTCTTCTGTACCATTGATGCCCC	44 44	56 56		184-206	AC(16)	HEX	SI	3
Goo27	F: GTGTGTCGATACGAGGGTGAAGGG R: GCGTGTTTAATGAATCCGATGCG	58 46	61 56		122-154	AC(18)	6-FAM	SI	2
Goo13	F: TTCTGGTATTTAGCTGGGAAGGGCG R: GCTACAGACAGACCTCTCACAAAAGGC	52 54	59 61		186-210	AC(16)	HEX	SI	2
<b>Goo17</b>	<b>F: GAGCTGACCTACATGACGATTACAACCC</b> <b>R: TGGACATACACCGTGTGTGTAGCC</b>	<b>50</b> <b>52</b>	<b>61</b> <b>61</b>		<b>180-184</b>	<b>AT(26)</b>	<b>6-FAM</b>	<b>NO</b>	<b>7</b>
<b>Goo25</b>	<b>F: GCAAAAACCAACGATGAGGC</b> <b>R: CACATACATATAAGTGTGTATGTTGTCGG</b>	<b>50</b> <b>40</b>	<b>55</b> <b>59</b>		<b>148-308</b>	<b>AT(16)</b>	<b>HEX</b>	<b>NO</b>	<b>7</b>
Goo18	F: GAAGATAGATAGTCCTTTTGTGCTGCCG R: TGTCGAGTACAGGGATCAGTGAGCG	46 56	60 61		138-166	AT(16)	6-FAM	SI	8
Goo28	F: AATAAAAACGCGTTGTTTCAGCC R: GTCCTTACATAAGCAACAGATTTGGG	41 40	51 54		132-190	AC(18)	HEX	SI	8
<b>Goo24</b>	<b>F: TGTGTGCTCACCTTACCAGGG</b> <b>R: TCAGATCGTACCGATGTTTTCCGC</b>	<b>52</b> <b>48</b>	<b>59</b> <b>58</b>		<b>154-206</b>	<b>AT(22)</b>	<b>HEX</b>	<b>NO</b>	<b>10</b>
<b>Goo19</b>	<b>F: AGTGTGTGATTTGAAGGGTGTGCG</b> <b>R: CAGTTGGAGATGAAAATGAATACGTCCC</b>	<b>48</b> <b>43</b>	<b>58</b> <b>58</b>		<b>150-183</b>	<b>AC(20)</b>	<b>6-FAM</b>	<b>SI</b>	<b>4</b>
Goo8	F: CCTCAGTAATAACGACAGTTATCGTACCCG R: AAGAGGACGGAGCAATTCATCAGGG	47 52	62 59		150-163	AAC(27)	HEX	SI	4
Goo1	F: CCAAGGACTGATATGCTGGGCG R: ACGGTGCTGGTGTCAAGCC	54 59	59 59		225-253	AAAAT(32)	6-FAM	SI	5
<b>Goo29</b>	<b>F: CAATTCCTTATTGCGCATCTTATGGCG</b> <b>R: ACGGTGCTGGTGTCAAGCC</b>	<b>42</b> <b>59</b>	<b>56</b> <b>56</b>		<b>158</b>	<b>AC(16)</b>	<b>HEX</b>	<b>NO</b>	<b>5</b>
<i>Chiton stokesii</i>									



**Tabla 4.** Valores – P linkage disequilibrium por loci para *R. goodallii* con 16 marcadores microsatélites

	Goo8	Goo1	Goo29	Goo7	Goo3	Ch4	Goo6	Goo14	Goo9	Goo12	Goo10	Goo27	Goo13	Goo28	Goo24
Goo19	<b>0.000006</b>	0.510683	0.578639	0.449120	0.874801	0.194254	0.500149	0.966701	0.976657	0.918148	0.715008	0.993515	0.328635	0.415904	1.000000
Goo8		0.346447	0.023510	0.956654	0.483322	0.093980	0.531526	0.831969	0.236579	0.991344	0.967878	0.718670	1.000000	0.286320	1.000000
Goo1			0.023510	0.962463	0.105078	0.715082	0.665900	0.291149	0.497513	0.832388	0.247813	0.694117	1.000000	0.003480	not possible
Goo29				0.846793	0.515755	0.964226	0.881456	0.811904	0.932200	0.544867	0.801796	0.364578	1.000000	0.045852	0.867386
Goo7					0.590370	0.884423	0.262056	0.999939	0.884646	0.996025	0.992152	0.977933	0.099128	0.974307	0.910047
Goo3						0.990562	0.966225	0.666896	0.116765	0.962398	0.249091	0.994211	0.737914	0.125373	0.201473
Ch4							1.000000	0.913497	0.798412	0.966636	0.688341	0.973762	0.937505	0.603898	1.000000
Goo6								0.423995	0.607483	0.799377	0.925766	0.992570	0.766683	0.733966	0.593156
Goo14									0.844503	0.558386	0.932309	0.675174	0.524725	0.434568	0.702293
Goo9										0.703997	0.720382	0.886360	0.882541	0.493345	0.741766
Goo12											0.868768	0.815482	1.000000	0.590365	1.000000
Goo10												0.162654	0.881839	0.009708	1.000000
Goo27													0.635307	0.070046	1.000000
Goo13														0.780660	not possible
Goo28															not possible

Se encuentran en negrilla los marcadores que presentaron ligamiento. Valor crítico = 0.0091.

**Tabla 5.** Valores – P linkage disequilibrium por loci para *R. sulcatus* con 16 marcadores microsatélites

	Goo8	Goo29	Goo7	Goo3	Ch4	Goo6	Goo14	Goo9	Goo12	Goo15	Goo10	Goo27	Goo13	Goo18	Goo28
Goo19	<b>0.001120</b>	0.118490	<b>0.004402</b>	<b>0.004750</b>	1.000000	0.906551	0.131892	0.171733	0.012511	0.282758	0.583990	0.492058	0.949485	0.972758	0.219260
Goo8		0.574080	0.050694	0.053279	0.023969	0.872607	0.053363	0.015072	0.110794	0.350456	0.713264	0.089178	0.652875	0.115973	0.051094
Goo29			0.569051	0.973429	0.945564	0.306463	0.396323	0.396846	0.910937	0.793413	0.615546	0.699909	0.526868	0.987415	0.578884
Goo7				<b>0.000632</b>	0.639098	0.954212	0.434897	0.722902	0.016771	0.873388	0.673254	0.348039	0.487633	0.838231	0.237330
Goo3					0.478270	0.906403	0.452242	0.700048	0.000002	0.688944	0.419564	0.108242	0.910818	0.106570	<b>0.006248</b>
Ch4						0.344474	0.840240	0.609972	1.000000	0.598817	1.000000	0.167000	0.828492	0.923514	0.087816
Goo6							0.084887	0.633567	0.948447	0.938344	0.986809	0.558789	0.539084	0.358273	1.000000
Goo14								0.852549	0.835313	0.563911	0.328342	0.458926	0.215873	0.999395	0.949138
Goo9									0.552473	0.807329	0.941827	0.613742	0.670869	0.816922	0.195886
Goo12										0.421628	0.396109	0.822283	0.997362	0.720064	0.094052
Goo15											0.670678	0.936233	0.700626	0.572809	0.146128
Goo10												1.000000	0.390030	0.684446	0.492156
Goo27													0.397815	0.014969	0.010514
Goo13														0.443804	0.220932
Goo18															0.130296

Se encuentran en negrilla los marcadores que presentan ligamiento. Valor crítico = 0.0091.

**Tabla 6.** Valores – P linkage desequilibrium por loci para *C. stokesii* con 12 marcadores microsatélites

	Goo1	Goo7	Goo3	Ch4	Goo6	Goo14	Goo9	Goo12	Goo10	Goo13	Goo28
Goo8	0.966354	0.981347	0.981688	0.999695	0.993806	1.000000	0.956798	0.979208	0.999836	0.967534	0.998445
Goo1		0.971888	0.740377	1.000000	0.980818	1.000000	0.712931	1.000000	0.966044	1.000000	0.953995
Goo7			0.611646	0.882643	0.997475	0.330099	0.995152	0.897059	1.000000	0.997664	0.982258
Goo3				0.999717	0.982866	0.850654	0.903760	1.000000	1.000000	0.974448	1.000000
Ch4					0.998103	0.757826	0.990581	0.999592	0.820812	0.994407	0.599032
Goo6						0.999463	0.921733	0.994554	0.878815	1.000000	0.843912
Goo14							0.999547	0.999600	0.834418	0.588339	0.499477
Goo9								0.469070	0.998581	0.999980	0.991862
Goo12									0.983610	0.999585	1.000000
Goo10										0.939363	0.042342
Goo13											1.000000

Valor crítico = 0.0091.

**Tabla 7.** Frecuencias de alelos nulos por localidad para *R. goodallii*.

Localidad	Goo19	Goo8	Goo3	Goo1	Goo29	Goo7	Goo3	Ch4	Goo6	Goo14	Goo9	Goo12	Goo10	Goo27	Goo13	Goo28	Goo24
Caamaño	0.06407	0.00000	0.00000	0.04404	0.08934	0.00002	0.00000	0.00001	0.00003	0.00000	0.09584	0.13629	0.26010	0.32359	0.00100	0.14354	0.23914
Luz del Día	0.27681	0.00000	0.00000	0.08333	0.00009	0.20369	0.00000	0.08348	0.00002	0.00000	0.03297	0.12660	0.15372	0.29616	0.00100	0.13916	0.36621
Montura	0.19388	0.00000	0.00000	0.07407	0.00000	0.00100	0.00000	0.04680	0.00000	0.00000	0.03331	0.36625	0.20994	0.27268	0.00002	0.00032	0.29836
Playa de los Perros	0.00000	0.00000	0.00000	0.16925	0.00000	0.00001	0.00000	0.06061	0.00001	0.00000	0.08875	0.18637	0.24921	0.29049	0.00100	0.00000	0.29356
Rosa Blanca	-	0.00000	0.00000	-	-	0.00100	0.00000	-	0.00100	0.00000	-	-	0.00100	0.33333	0.00100	0.00071	-
Tongo Reef	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00002	0.00051	0.13568	0.00001	0.00000	0.00000	0.27189	0.20686	0.24911	0.00002	0.23306	0.25465

**Tabla 8.** Frecuencias de alelos nulos por localidad para *R. sulcatus*.

Localidad	Goo19	Goo8	Goo3	Goo7	Goo29	Goo7	Ch4	Goo6	Goo14	Goo9	Goo12	Goo15	Goo10	Goo27	Goo13	Goo18	Goo28
Luz del Día	0.36590	0.00003	0.00000	0.00000	0.00038	0.33010	0.13332	0.30541	0.00000	0.00001	0.24523	0.00001	0.30269	0.10763	0.00000	0.17183	0.15904
Playa de los Perros	0.00000	0.00002	0.00000	0.00000	0.00000	0.11237	0.05556	0.00000	0.00000	0.18337	0.26617	0.02366	0.21197	0.21018	0.00091	0.23129	0.43792
Rosa Blanca	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.05606	0.00000	0.07978	0.00000	0.00000	0.00001	0.41950	0.00000	0.29964	0.25057	0.00093	0.17353	0.20000
Tongo Reef	0.25383	0.00001	0.00000	0.00000	0.09616	0.00044	0.06587	0.00000	0.00000	0.19897	0.29781	0.19603	0.14969	0.31398	0.23640	0.14370	0.21533

**Tabla 9.** Frecuencias de alelos nulos por localidad para *C. stokesii*.

Localidad	Goo8	Goo1	Goo7	Goo3	Ch4	Goo6	Goo14	Goo9	Goo12	Goo10	Goo13	Goo28
Estero del Plátano	0.12500	0.03996	0.16080	0.00000	0.00077	0.30656	0.00000	0.00001	0.10459	0.00000	0.00000	0.00000
La Entrada	0.05613	0.02366	0.31500	0.00002	0.00000	0.32316	0.00000	0.07911	0.30237	0.28293	0.00000	0.00001
Playa Econdida	0.00000	0.05137	0.33333	0.00000	0.00000	0.33005	0.04762	0.06315	0.32687	0.16667	0.00000	0.00001
La Tiñosa	0.16676	0.00000	0.33333	0.00000	0.12787	0.29822	0.00001	0.00000	0.00091	0.36316	0.00000	0.00100
Machalilla	0.00000	0.00000	0.00100	0.00100	0.00100	0.00100	0.00000	0.00000	0.00100	0.33333	0.00000	0.00100
La Playita	0.00000	0.19665	0.10733	0.00000	0.27832	0.29029	0.00000	0.00000	0.29029	0.00087	0.00000	0.00000

**Tabla 10.** Análisis de Equilibrio Hardy-Weinberg por localidad para *R. goodallii*.

Localidad	Goo8	Goo1	Goo29	Goo7	Goo3	Ch4	Goo6	Goo14	Goo9	Goo12	Goo10	Goo27	Goo13	Goo24
Caamaño	0.2933	0.2723	<b>0.0000</b>	0.8065	0.2350	0.2358	<b>0.0015</b>	0.2308	<b>0.0003</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0002</b>	<b>0.0000</b>	NA	<b>0.0017</b>
Luz del Día	0.2868	0.4371	1.000	<b>0.0016</b>	0.5255	0.0500	0.8625	0.6631	0.8732	0.2837	0.1402	0.0153	NA	<b>0.0000</b>
Montura	0.1750	0.5128	<b>0.0097</b>	NA	0.5490	0.9409	0.4310	0.8063	0.7642	<b>0.0004</b>	0.0365	<b>0.0035</b>	0.8625	0.0099
Playa de los Perros	0.1591	<b>0.0014</b>	0.4936	0.9906	0.0153	0.1571	0.7401	0.8061	0.3771	0.2188	<b>0.0042</b>	0.0290	NA	0.0270
Rosa Blanca	0.3173	NA	NA	NA	0.3173	NA	NA	0.4232	NA	NA	NA	0.1573	NA	NA
Tongo Reef	0.8895	0.1826	0.2488	0.8625	0.8685	0.0771	0.8415	0.9338	0.2921	<b>0.0050</b>	0.0462	0.0891	0.8625	0.1654

Se encuentran en negrilla los loci fuera de equilibrio H-W. Valor crítico = 0.0091

**Tabla 11.** Análisis de Equilibrio Hardy-Weinberg por impacto humano para *R. goodallii*.

Impacto Humano	Goo8	Goo1	Goo29	Goo7	Goo3	Ch4	Goo6	Goo14	Goo9	Goo12	Goo10	Goo27	Goo13	Goo24
Bajo	0.2657	<b>0.0057</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>	0.2584	<b>0.0043</b>	<b>0.0006</b>	0.942	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>	NA	<b>0.0000</b>
Alto	0.1764	<b>0.0003</b>	0.0336	1.0000	0.3579	0.4422	0.4583	0.9758	0.6468	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>	0.9986	<b>0.0000</b>

Se encuentran en negrilla los loci fuera de equilibrio H-W. Valor crítico = 0.0091

**Tabla 12.** Análisis de Equilibrio Hardy-Weinberg por localidad para *R. sulcatus*.

Localidad	Goo8	Goo29	Goo7	Ch4	Goo6	Goo14	Goo9	Goo12	Goo15	Goo10	Goo27	Goo13	Goo18
Luz del Día	0.7725	0.1857	0.5637	0.2975	0.0029	0.4600	0.8415	0.1077	0.4029	0.1012	0.5213	<b>0.0083</b>	0.0584
Playa de los Perros	0.8466	0.6481	0.7824	0.3266	0.9792	0.9340	0.045	0.0605	0.5591	0.2755	0.0315	<b>0.0074</b>	<b>0.0032</b>
Rosa Blanca	0.9122	0.8311	0.4003	0.0766	0.9145	0.6415	0.8415	0.0203	0.5908	<b>0.0083</b>	0.0479	<b>0.0011</b>	0.2447
Tongo Reef	0.5435	0.9938	0.2812	0.2107	0.2301	0.6409	<b>0.0001</b>	0.0472	0.2685	0.2026	<b>0.0025</b>	<b>0.0082</b>	0.2485

Se encuentran en negrilla los loci fuera de equilibrio H-W. Valor crítico = 0.0091

**Tabla 13.** Análisis de Equilibrio Hardy-Weinberg por impacto humano para *R. sulcatus*.

Impacto humano	Goo8	Goo29	Goo7	Ch4	Goo6	Goo14	Goo9	Goo12	Goo15	Goo10	Goo27	Goo13	Goo18
Alto	0.7901	0.6187	0.2667	0.0383	0.0368	0.6920	0.9952	<b>0.0001</b>	0.3669	<b>0.0029</b>	<b>0.0055</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0004</b>
Bajo	0.3100	0.9004	0.1950	0.4753	0.8133	0.7083	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>	0.335	<b>0.0084</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0000</b>	<b>0.0000</b>

Se encuentran en negrilla los loci fuera de equilibrio H-W. Valor crítico = 0.0091

**Tabla 14.** Análisis de Equilibrio Hardy-Weinberg por localidad para *C. stokesii*.

Localidad	Goo8	Goo1	Goo7	Goo3	Ch4	Goo6	Goo14	Goo9	Goo12	Goo10	Goo13	Goo28
Estero del Plátano	0.2044	0.5052	0.0719	0.4708	0.1247	<b>0.0016</b>	0.1747	0.8407	<b>0.0063</b>	<b>0.0007</b>	0.1336	0.5777
La Entrada	0.5519	0.8643	<b>0.0027</b>	0.8625	0.9894	<b>0.0047</b>	0.9159	0.1145	<b>0.0082</b>	0.0417	0.0164	0.9866
Playa Escondida	0.1667	0.2669	0.0143	0.0542	0.8984	<b>0.0082</b>	0.5934	0.7674	0.0253	0.3716	0.4708	0.8415
La Tiñosa	0.0205	0.0735	0.0143	0.1976	<b>0.0068</b>	<b>0.0000</b>	0.7220	0.3505	<b>0.0074</b>	<b>0.0001</b>	0.0954	NA
Machalilla	0.5724	0.3173	NA	NA	NA	NA	0.3173	0.6390	NA	0.1573	0.1573	NA
La Playita	0.6962	0.2447	0.1718	0.7290	0.2076	0.0455	0.2615	0.9319	0.0455	0.0460	0.0833	0.7290

Se encuentran en negrilla los loci fuera de equilibrio H-W. Valor crítico = 0.0091



**Tabla 15.** Número de alelos por locus para las tres especies de canchalaguas.

a) <i>Radsia goodallii</i>		b) <i>Radsia sulcatus</i>		c) <i>Chiton stokesii</i>	
Marcador	Num.	Marcador	Num.	Marcador	Num.
Goo8	5	Goo8	7	Goo8	6
Goo1	26	Goo29	4	<b>Goo1</b>	<b>12</b>
Goo29	6	Goo7	8	Goo7	3
Goo7	6	<b>Ch4</b>	<b>12</b>	Goo3	5
Goo3	9	Goo6	4	Ch4	9
Ch4	12	Goo14	7	Goo6	4
Goo6	3	Goo9	5	Goo14	6
Goo14	5	<b>Goo12</b>	<b>12</b>	Goo9	6
Goo9	4	Goo15	7	Goo12	7
Goo12	11	Goo10	10	Goo10	10
Goo10	22	Goo27	9	Goo13	2
Goo27	10	Goo13	7	Goo28	4
Goo13	3	Goo18	11	Promedio	6.17
<b>Goo24</b>	<b>28</b>	Promedio	7.92		
Promedio	10.71				

Num: número de alelos por locus; en negrilla los loci más polimórficos.

**Tabla 16.** Índices de diversidad genética por localidad para las tres especies de canchalaguas

Especie	Localidad	Prop.	He	Ho	AR	PA
<i>Radsia goodallii</i>	Caamaño	70.31	0.59	0.46	2.06	15
	Luz del Día	52.03	0.57	0.44	1.98	6
	Montura	45.67	0.53	0.42	1.87	8
	Playa de los Perros	51.31	0.57	0.43	2.00	9
	Rosa Blanca	17.86	0.59	NaN	0.77	0
	Tongo Reef	47.86	0.51	0.40	1.83	5
<i>Radsia sulcatus</i>	Luz del Día	67.87	0.65	0.50	4.05	9
	Playa de los Perros	62.04	0.58	0.44	3.82	12
	Rosa Blanca	60.67	0.57	0.43	3.63	3
	Tongo Reef	62.44	0.61	0.44	3.71	7
	Estero del Plátano	60.01	0.49	0.44	1.79	7
	La Entrada	62.20	0.51	0.38	1.85	6
<i>Chiton stokesii</i>	Playa Escondida	56.36	0.51	0.39	1.70	4
	La Tiñosa	31.84	0.51	0.37	1.69	9
	Machalilla	62.65	<b>0.25</b>	<b>0.38</b>	1.32	1
	La Playita	51.50	0.47	0.43	1.81	3

Prop: Proporción total de alelos encontrados en cada localidad; He: heterocigocidad esperada; Ho: heterocigocidad observada; AR: riqueza alélica; PA: alelos privados

**Tabla 17.** Índices de diversidad genética por impacto humano para las dos especies de canchalaguas de Galápagos

Especie	Impacto Humano	Prop.	He	Ho	AR	PA
<i>Radsia goodallii</i>	Alto	70.82	0.57	0.42	6.20	27
	Bajo	82.01	0.60	0.45	7.22	48
<i>Radsia sulcatus</i>	Alto	83.92	0.62	0.43	5.44	21
	Bajo	82.20	0.65	0.46	5.38	17

Prop: Proporción total de alelos encontrados en cada localidad; He: heterocigocidad esperada; Ho: heterocigocidad observada; AR: riqueza alélica; PA: alelos privados

**Tabla 18.** Matriz de distancias genéticas por localidad de *R. goodallii*.

	Caamaño	Luz del Día	Montura	Playa de los Perros	Rosa Blanca	Tongo Reef
Caamaño	0.0000	0.0270	0.0445	0.0252	0.0041	0.0349
Luz del Día	0.0270	0.0000	0.0459	0.0277	-0.0062	0.0451
Montura	0.0445	0.0459	0.0000	0.0394	0.0047	0.0502
Playa de los Perros	0.0252	0.0277	0.0394	0.0000	0.0050	0.0383
Rosa Blanca	0.0041	-0.0062	0.0047	0.0050	0.0000	-0.0072
Tongo Reef	0.0349	0.0451	<b>0.0502</b>	0.0383	-0.0072	0.0000

Se encuentra en negrilla la mayor distancia Fst

**Tabla 19.** Matriz de distancias genéticas por localidad de *R. sulcatus*.

	Luz del Día	Playa de los Perros	Rosa Blanca	Tongo Reef
Luz del Día	0.0000	0.0576	0.0505	0.0532
Playa de los Perros	<b>0.0576</b>	0.0000	0.0501	0.0484
Rosa Blanca	0.0505	0.0500	0.0000	0.0321
Tongo Reef	0.0532	0.0483	0.0321	0.0000

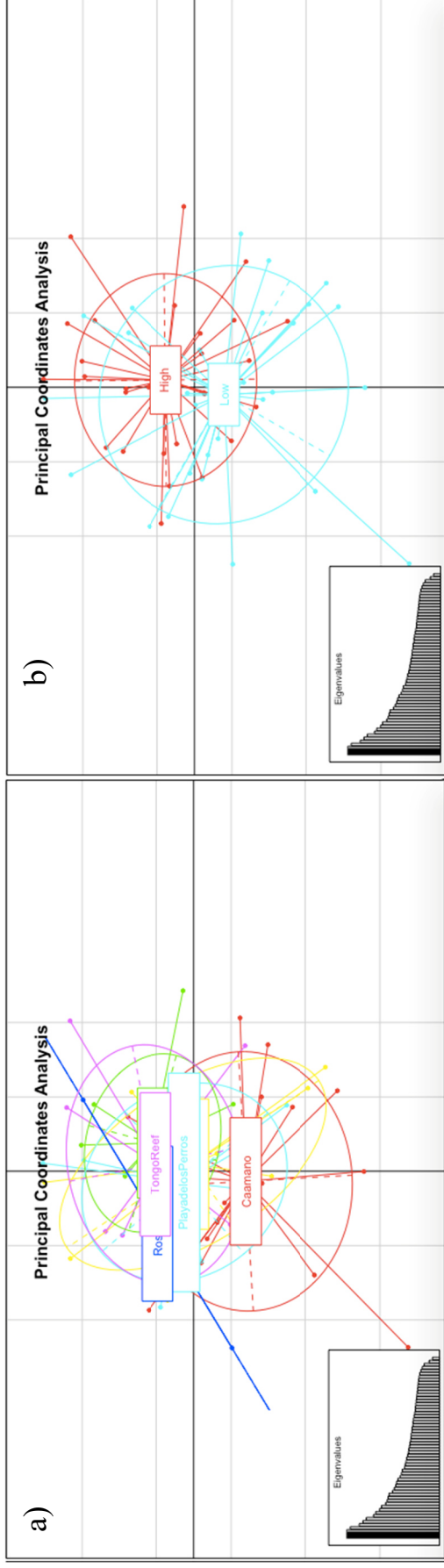
Se encuentra en negrilla la mayor distancia Fst

**Tabla 20.** Matriz de distancias genéticas por localidad de *C. stokesii*.

	Estero del Plátano	La Entrada	Playa Escondida	La Tiñosa	Machalilla	La Playita
Estero del Plátano	0.0000	0.0518	0.1029	0.1006	0.1099	0.0754
La Entrada	0.0518	0.0000	0.0464	0.0474	0.0862	0.0514
Playa Escondida	0.1029	0.0464	0.0000	0.0733	0.1002	0.0449
La Tiñosa	0.1006	0.0474	0.0733	0.0000	0.0736	0.0959
Machalilla	0.1099	0.0862	0.1002	0.0736	0.0000	<b>0.1479</b>
La Playita	0.0754	0.0514	0.0449	0.0959	0.1479	0.0000

Se encuentra en negrilla la mayor distancia Fst

**FIGURAS**



**Figura 1.** PcoA por a) localidad y b) impacto humano de *R. goodallii*.

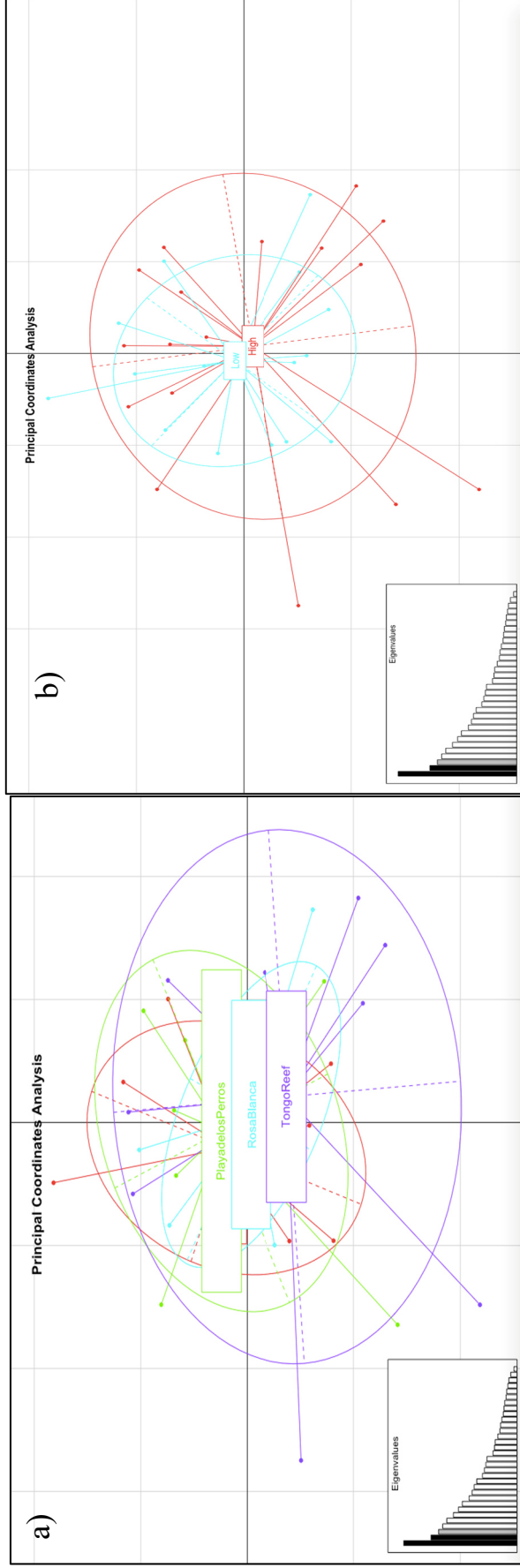


Figura 2. PcoA por a) localidad y b) impacto humano de *R. sulcatus*..

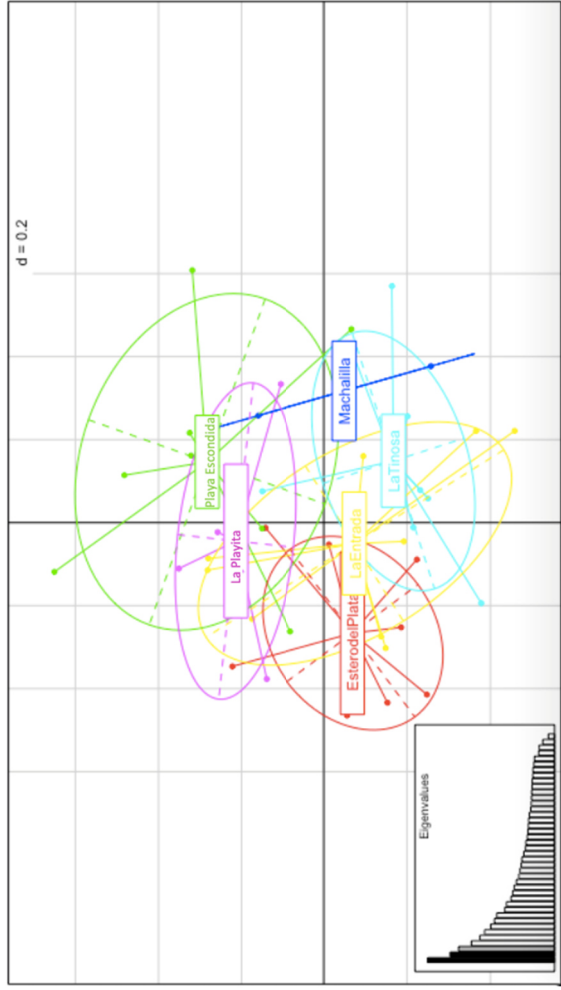


Figura 3. PcoA por localidad de *C. stokesii*.

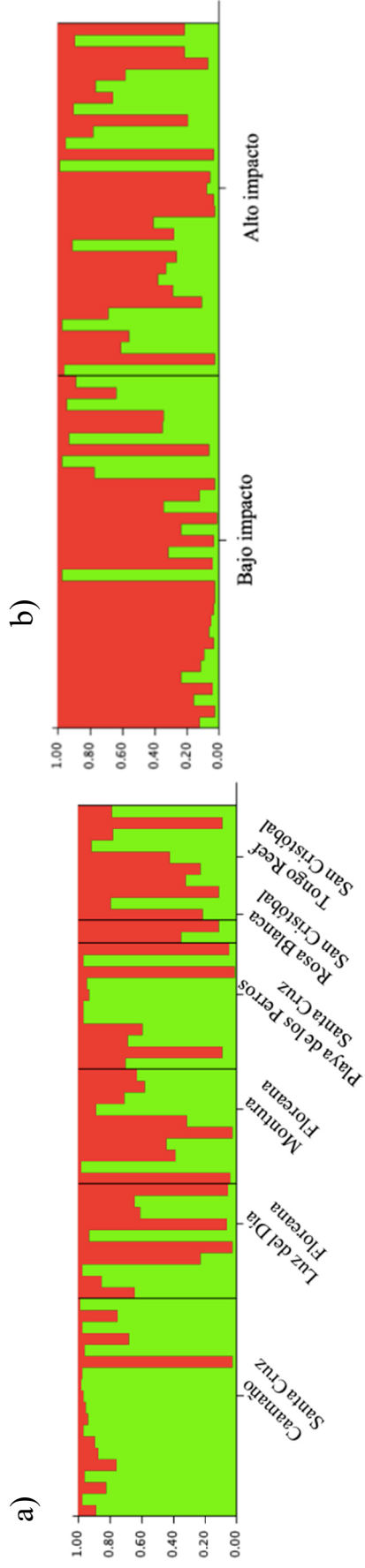
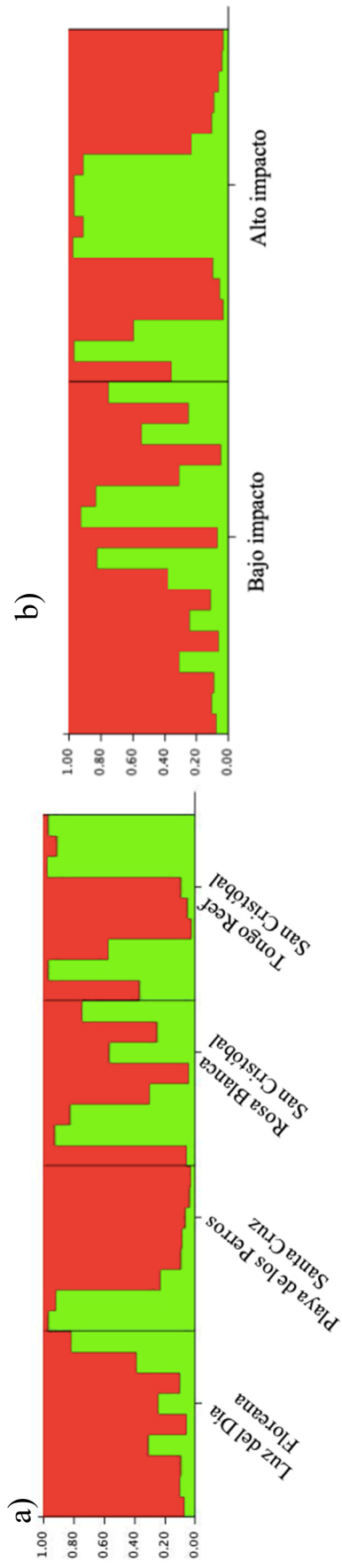
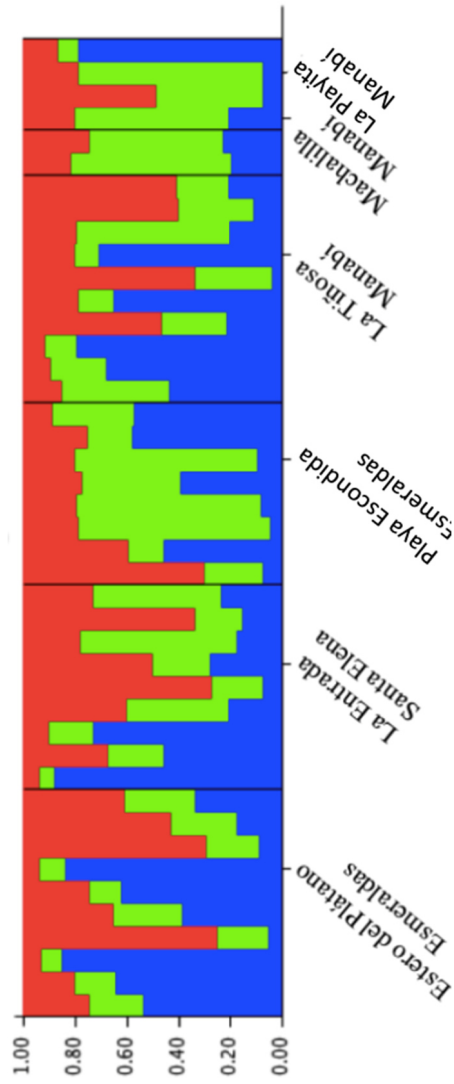


Figura 4. Análisis de estructura poblacional usando  $K = 2$  para *R. goodallii* por a) localidad y b) impacto humano.

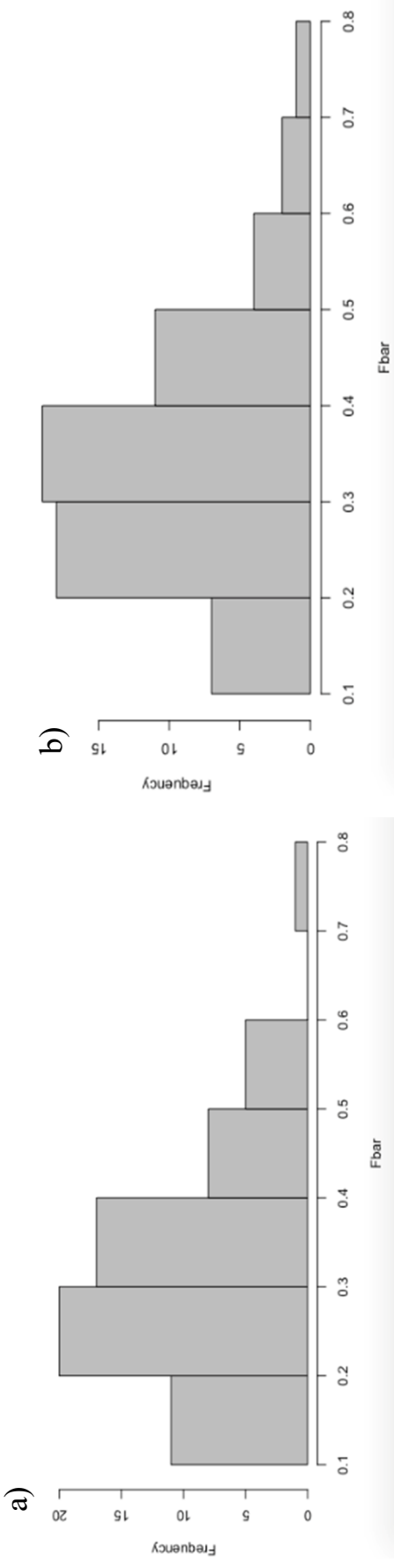


**Figura 5.** Análisis de estructura poblacional usando  $K = 2$  para *R. sulcatus* por a) localidad y b) impacto humano.

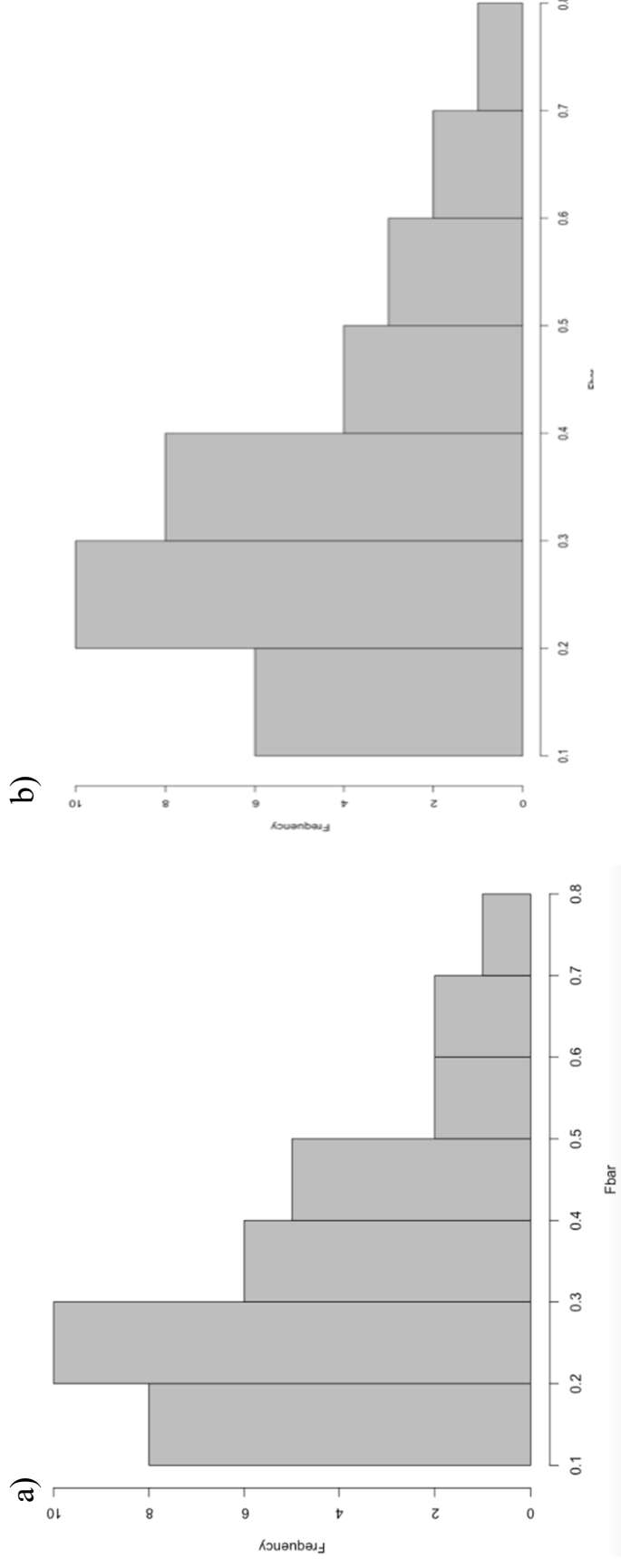


**Figura 6.** Análisis de estructura poblacional usando  $K = 3$  para *C. stokesii* por localidad.

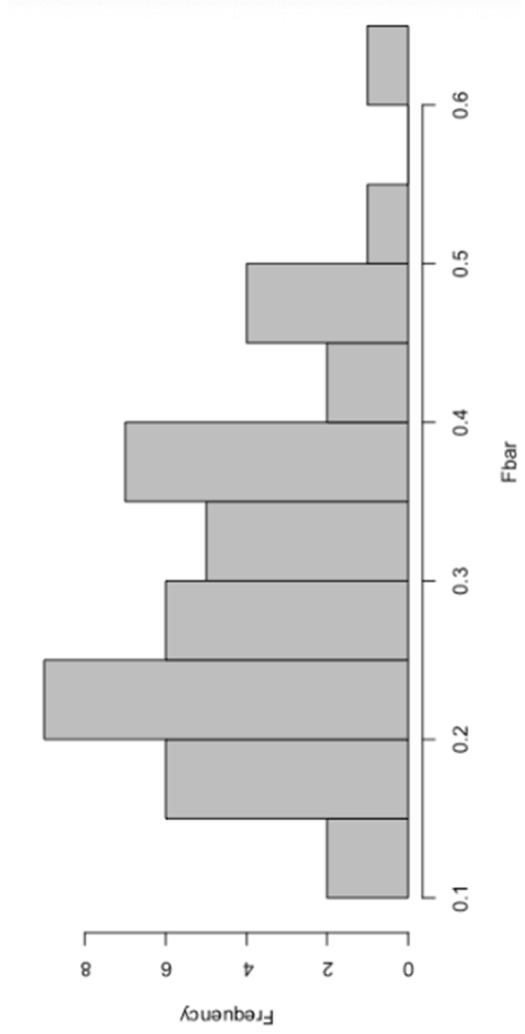




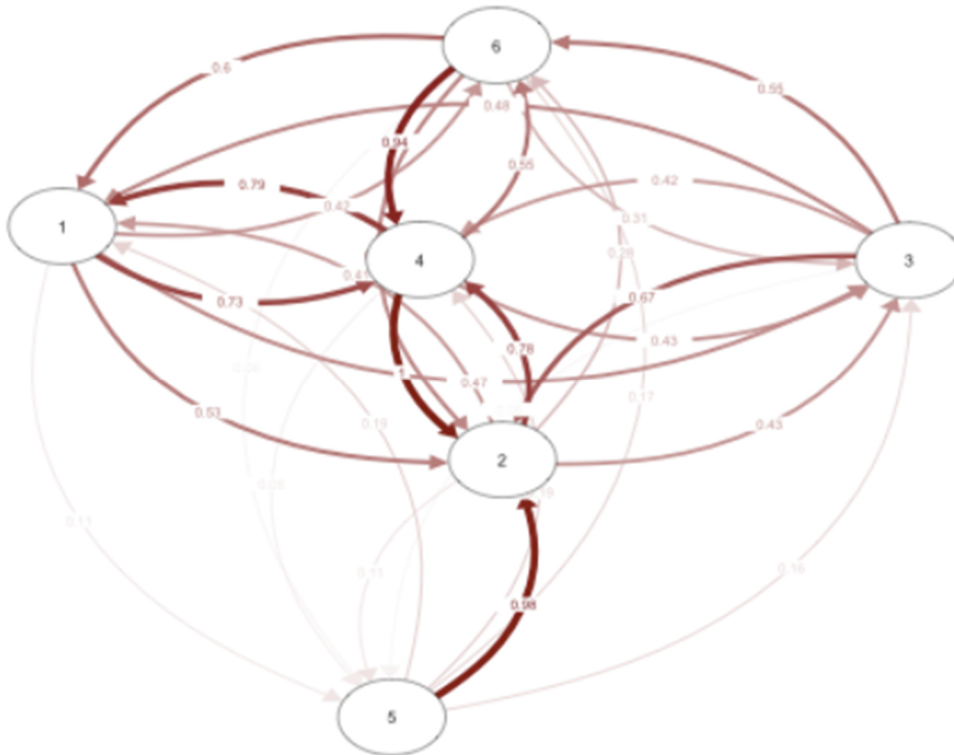
**Figura 7.** Distribución de la media del coeficiente de endogamia ( $F_{bar}$ ) en los individuos de *R. goodallii* por a) localidad y por b) impacto humano.



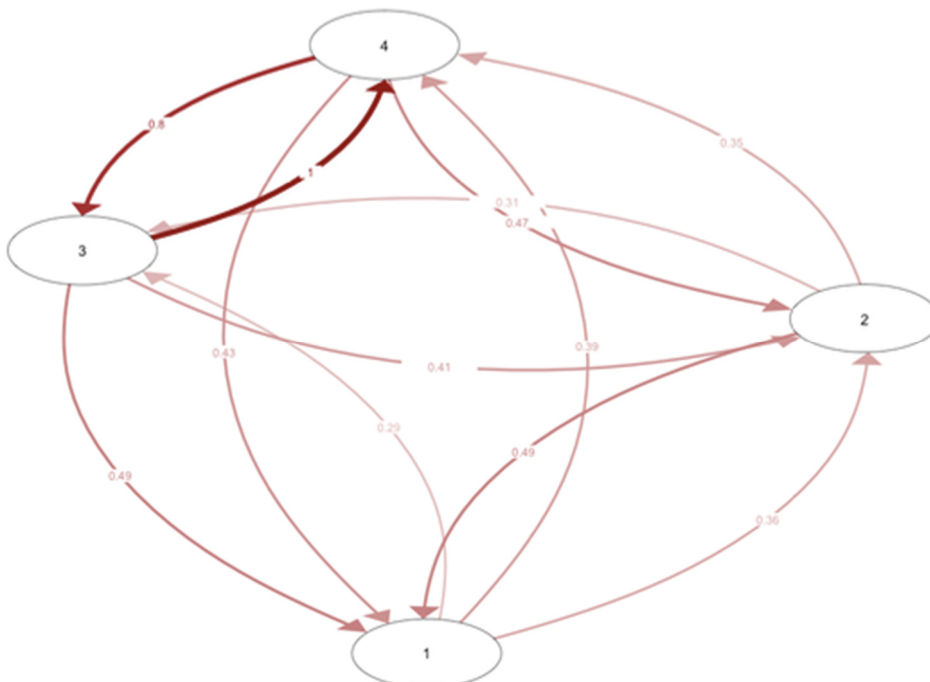
**Figura 8.** Distribución de la media del coeficiente de endogamia ( $F_{bar}$ ) en los individuos de *R. sulcatus* por a) localidad y por b) impacto humano.



**Figura 9.** Distribución de la media del coeficiente de endogamia ( $F_{bar}$ ) en los individuos de *C. stokesii* por localidad.



**Figura 10.** Red de migración organizada por localidad de *R. goodallii*, con un threshold de 0.4. Rojo oscuro representa alta migración. Caamaño (1), Luz del Día (2), Montura (3), Playa de los Perros (4), Rosa Blanca (5) y Tongo Reef (6).



**Figura 11.** Red de migración organizada por localidad de *R. sulcatus*, con un threshold de 0.4. Rojo oscuro representa alta migración. Luz del Día (1), Playa de los Perros (2), Rosa Blanca (3) y Tongo Reef (4).



**Figura 12.** Red de migración organizada por localidad de *Chiton stokesii*, con un threshold de 0.4. Rojo oscuro representa alta migración. Estero del Plátano (1), La Entrada (2), Playa Escondida (3), La Tiñosa (4), Machalilla (5) y La Playita (6).