UNIVERSIDAD LATINA DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DR. WILLIAM C. GORGAS
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

"APLICACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES PARA ESTUDIOS DE GENÉTICA POBLACIONAL Y PATERNIDAD EN EL CANGREJO PORCELANA VERDE *PETROLISTHES ARMATUS* (DECAPODA: ANOMURA: PORCELLANIDAE) DEL PACÍFICO ORIENTAL"

ELABORADO POR:
DANIELA SOFÍA DE LEÓN HERRERA
8-999-1132

MENTORA:
ALEXANDRA HILLER GALVIS

TRABAJO DESARROLLADO PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2026

DECLARACIÓN JURADA

Yo, Daniela Sofía de León Herrera con cédula de identidad personal N.º 8-999-1132, estudiante graduando del programa/carrera de Biotecnología, declaro bajo juramento que el material que aparece en este trabajo de graduación, en la opción Licenciatura en Biotecnología, es de mi producción intelectual, en razón de lo cual exonero a la Universidad Latina de Panamá de cualquier responsabilidad relacionada a este aspecto. Como constancia, firmo la presente el día _____del mes _____del año_____.

Firma: _____

Cédula: _____

DEDICATORIA

¡A Yahveh y a toda mi familia!

.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por acompañarme en cada paso de este proyecto, por permitirme disfrutar de esta experiencia y por ponerme en mi camino a personas maravillosas.

A mis padres, por ser mis confidentes y apoyo incondicional en cada momento durante la carrera. A mis hermanas, por compartir conmigo su entusiasmo y ánimo para que pudiera finalizar esta etapa con alegría. A mis abuelos paternos y maternos, por demostrarme siempre su afecto e interés en el proyecto; y a mis tíos, tías y primos, porque sé que puedo contar con ellos en todo momento.

A la Universidad Latina de Panamá, por brindarme los conocimientos necesarios para mi formación profesional en la Licenciatura de Biotecnología. Le agradezco especialmente al Dr. Omar Dupuy y a la Dra. María Fernanda Alves Rosa por sus enseñanzas y el apoyo académico que resultó fundamental para culminar con éxito esta etapa.

A la Institución de Investigaciones Tropicales del Smithsonian (STRI), por darme la oportunidad de trabajar en sus instalaciones. A la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT) por su interés y apoyo en el proyecto.

A la Dra. Alexandra Hiller, por transmitirme su amor y pasión hacia los porcelánidos, por brindarme la confianza de trabajar en este proyecto, por su orientación en los trabajos de campo, en los procedimientos de laboratorio molecular, así como en el desarrollo de ideas y enfoques para la redacción y análisis de este manuscrito. Al Dr. Harilaos Lessios, por integrarme y permitirme trabajar en su laboratorio de biología molecular marina, por su apoyo en las colectas de campo y por su orientación a lo largo de este trabajo.

A los técnicos de laboratorio molecular marino, y a la Mgtr. Ligia Calderón, por guiarme en los ensayos de laboratorio molecular y en el análisis de datos bioinformáticos; al Lic. Axel Calderón, por su apoyo en el laboratorio y en los trabajos de campo. Muchas gracias a ambos por su afecto y paciencia.

A la Dra. Laura Geyer, por compartir conmigo sus conocimientos sobre microsatélites. Asimismo a la Mgtr. Laura Baldrich, por apoyarme en el uso de RStudio para el análisis de datos en microsatélites.

A la Mgtr. Viviane Ali, por su apoyo en la comprensión de conceptos de genética poblacional, el cual fue de gran ayuda durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo, en especial a Jessika Apolayo, por su apoyo en las colectas, el mantenimiento de acuarios y por las conversaciones que me ayudaron a comprender mejor el comportamiento de *Petrolisthes armatus*. A las licenciadas Milagros González y Mayledis Garrido, y a los licenciados Bryan To y Milton Almanza por brindarnos su ayuda en las colectas y en el laboratorio molecular; por sus palabras de ánimo y entusiasmo en cada día de trabajo, y por los buenos momentos compartidos en el laboratorio.

A mis amigos de la universidad, por ser un gran apoyo en la carrera y por impulsarme a seguir adelante en los momentos más difíciles de las materias.

Por último, le agradezco a todos mis amigos de la comunidad de Naos (STRI) por recibirme con alegría todos los días de trabajo y hacer de esta una experiencia inolvidable.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE

DECLARACIÓN JURADA ii

DEDICATORIA iii

AGRADECIMIENTO iv

ÍNDICE DE FIGURAS viii

ÍNDICE DE TABLAS ix

ABREVIATURAS, SIGLAS Y UNIDADES x

RESUMEN xi

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN 1

1.1 Planteamiento del problema 2

1.2 Justificación 3

1.3 Objetivos 5

1.3.1 Objetivo general 5

1.3.2 Objetivos específicos 5

1.4 Hipótesis 6

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO 7

2.1 Genética de poblaciones 8

2.1.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg 8

2.1.2 Diversidad genética 9

2.1.3 Estructura genética 10

2.1.4 Desequilibrio de ligamiento (LD) 11

2.2 Sistemas de apareamiento 12

2.3 Marcadores microsatélites 15

2.3.1 Descripción 15

2.3.2 Mecanismos de mutación y reparación 16

2.3.3 Equilibrio y dinámica de mutaciones 20

2.3.4 Modelos teóricos de mutación 20
2.3.5 Alelos nulos y homoplasia 22
2.3.6 Ventajas y limitaciones 23
2.3.7 Diseño de cebadores 25
2.3.8 Genotipificación 28
2.4 Generalidades de la familia Porcellanidae y *Petrolisthes armatus* 30
2.4.1 Taxonomía de *P. armatus* 30
2.4.3 Ciclo de vida de *P. armatus* 31
2.4.4 Hábitat y distribución geográfica de *P. armatus* 32
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS 34
3.1 Muestreo y selección 35
3.2 Extracción de ADN 36
3.3 Estandarización de Ta (°C) por PCR estándar 37
3.4 Electroforesis en gel agarosa y Metaphor™ 37
3.5 Genotipificación 38
3.6 Análisis bioinformático 39
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN 42
4.2 Genética poblacional 53
4.3 Paternidad múltiple 58
CAPÍTULO V: CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES 60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 63
ANEXOS 69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Apareamiento erróneo de la cadena deslizada....18
Figura 2. Esquema del sistema de reparación de desajustes....19
Figura 3. Marcaje fluorescente de microsatélites con un cebador universal 29
Figura 4. Etapas larvales de *Petrolisthes armatus*....32
Figura 5. Ejemplar macho de *Petrolisthes armatus* 32
Figura 6. Esquema de la metodología....41
Figura 7. Gel de agarosa 1.5 % TBE. Muestras de la Madre 1 y su progenie 48
Figura 8. Gel de agarosa 1.5 % TBE. Muestras de *P. armatus* del POT 48
Figura 9. Gel de MetaPhor™ 4 % TBE. Muestras de la Madre 1 y su progenie 50
Figura 10. Electroferograma. Perfiles no interpretables para microsatélites 51
Figura 11. Electroferograma. Perfiles con patrones *stutter* en microsatélites 52
Figura 12. Electroferograma. Perfiles de alelos ideales para microsatélites 52
Figura 13. Electroferograma. Perfiles de alelos ideales para microsatélites 53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *P. armatus*....30
Tabla 2. Comparación de métodos de extracción de ADN en larvas de *P. armatus.* 43
Tabla 3. Temperatura de alineamiento de cebadores microsatélites de *P. armatus.* 47
Tabla 4. Caracterización general de locus para genética poblacional en *P. armatus* del POT..54
Tabla 5. Prueba de Hardy-Weinberg para locus microsatélites de *P. armatus* del POT....56
Tabla 6. Desequilibrio de ligamiento entre *loci* de *P. armatus* del POT....57
Tabla 7. Alelos observados por locus microsatélites para paternidad múltiple en *P. armatus* del Pacífico panameño 59
Tabla 8. Resumen de los datos de herencia alélica de las larvas incubadas de cada una de las 5 hembras (madres) de *P. armatus* del Pacífico panameño 59

ABREVIATURAS, SIGLAS Y UNIDADES

1-D: índice de diversidad de Simpson

ABI: Applied Biosystems

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

Ae: número de alelos efectivos

AFLP: *Amplified Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados)

AMOVA: *Analysis of Molecular Variance* (Análisis de varianza molecular)

Amp: amperios

ANOVA: *Analysis of Variance* (análisis de varianza)

Ar: riqueza alélica

ARNm: *Messenger* RNA (ARN mensajero)

AtOcc: Atlántico Occidental

AtOri: Atlántico Oriental

°C: grados Celsius

CE-LIF: electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser

COI: citocromo c oxidasa subunidad I

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatos

DST: diferenciación genética total

EST-SSRs: *Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeats* (microsatélites expresados)

EXO 1: exonucleasa I

FAM: fluorocromo 6-carboxifluoresceína

Fis: índice de endogamia intrapoblacional

Fst: índice de diferenciación genética entre poblaciones

GoTaq: ADN polimerasa derivada de *Thermus aquaticus*

He: heterocigosidad esperada

Hexp: heterocigosidad esperada

Ho: heterocigosidad observada

Hs: diversidad genética intrapoblacional

HWE: *Hardy-Weinberg Equilibrium* (equilibrio de Hardy-Weinberg)

IA: *Index of Association* (índice de asociación)

IAM: *Infinite Alleles Model* (modelo de alelos infinitos)

KAM: *K-Allele Model* (modelo de K alelos)

L: locus

LD: desequilibrio de ligamiento

LDHA: gen de lactato deshidrogenasa A

MISA: programa para identificación de microsatélites

MSATCOMMANDER: programa para detección y diseño de microsatélites

n: número de muestras

NA: datos no disponibles

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información Biotecnológica)

ND: no se detectaron contribuciones paternas

NED: colorante fluorescente amarillo propietario de Applied Biosystems

ng: nanogramos

NGS: *Next-Generation Sequencing* (Secuenciación de nueva generación)

nm: nanómetros

p: valor de probabilidad (*p-value*)

pb: pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (Antígeno nuclear de células en proliferación)

PET: colorante fluorescente rojo propietario de Applied Biosystems

PK: proteinasa K

Pop: población

POT: Pacífico Oriental Tropical

QDD: programa para la detección y el diseño de microsatélites

RADseq: *Restriction Site-Associated DNA Sequencing* (secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción)

r̄d: índice de asociación estandarizado

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)

RPA: *Replication Protein A* (Proteína A de replicación)

satDNA: ADN satélite

SNP: *Single Nucleotide Polymorphism* (polimorfismo de un solo nucleótido)

SSM: *Slipped-Strand Mispairing* (apareamiento erróneo por deslizamiento de cadena)

SSR: *Simple Sequence Repeats* (repeticiones de secuencia simple)

STR: *Short Tandem Repeats* (Repeticiones cortas en tándem)

Ta°C: Temperatura de alineamiento

TBE: tampón Tris-borato-EDTA

Tm°C: temperatura de fusión (*melting temperature*)

TPM: *Two-Phase Model* (modelo de dos fases)

TR: *Tandem Repeats* (repeticiones en tándem)

uL: microlitros

UTR: *Untranslated Region* (región no traducida)

V: voltaje

VIC: Colorante fluorescente verde propietario de Applied Biosystems

VNTR: *Variable Number of Tandem Repeats* (número variable de repeticiones en tándem)

χ^2: Chi-cuadrado

RESUMEN

La diversidad genética de una población constituye la base de su capacidad adaptativa y resiliencia frente a cambios ambientales. Su estudio a través de la genética poblacional, permite caracterizar la estructura genética de las poblaciones, evaluar el flujo génico entre ellas y comprender los procesos evolutivos que moldean su variación. La distribución genética dentro y entre las poblaciones puede verse influenciada por los sistemas de apareamiento, que incluyen la monogamia y poligamia; dentro de esta última se encuentran la poliginia, cuando un macho se aparea con varias hembras, y la poliandria, cuando una hembra se aparea con varios machos, sistema que en algunos casos resulta en paternidad múltiple, pudiendo incrementar el tamaño efectivo poblacional y la heterocigosidad de la descendencia, evitando la endogamia y las desviaciones en las proporciones genotípicas esperadas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para estudiar la diversidad genética de una población y los sistemas de apareamiento que influyen en ella, se han utilizado marcadores moleculares microsatélites que, debido a su carácter codominante y herencia mendeliana, permiten identificar ambos alelos en cada locus, distinguiendo las contribuciones materna y paterna, aumentando la resolución de los estudios en genética poblacional y paternidad múltiple.

Actualmente, se sabe muy poco sobre la genética poblacional y el sistema de apareamiento del cangrejo porcelana verde *Petrolisthes armatus*. Un organismo con capacidad invasora, cuyo rango de distribución geográfica se encuentra en expansión hacia latitudes más altas, por lo que caracterizar su diversidad genética podría contribuir a explicar su capacidad adaptativa a condiciones ambientales fuera de su rango nativo.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el polimorfismo de 14 microsatélites en *Petrolisthes armatus* del Pacífico oriental tropical, obteniendo siete marcadores útiles para genética poblacional y tres para paternidad múltiple. En el ensayo poblacional, las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg observadas pueden ser atribuibles al efecto Wahlund, sugiriendo estructura poblacional consistente con estudios filogeográficos previos en la especie, lo que indica la utilidad de estos marcadores para estudios futuros con mayor tamaño muestral. En contraste, el bajo polimorfismo de los loci evaluados para paternidad múltiple impidió detectar contribuciones paternas adicionales, limitando su aplicación para inferencias robustas sobre los sistemas de apareamiento en *P. armatus*.

Palabras clave: *Petrolisthes armatus*, microsatélites, polimorfismo, genética poblacional, paternidad múltiple.

ABSTRACT

The genetic diversity of a population underlies its adaptive capacity and resilience to environmental change. Population genetics provides a framework for characterizing the genetic structure of populations, assessing gene flow among them, and understanding the evolutionary processes that shape their variation. The distribution of genetic diversity within and among populations can be influenced by mating systems, which range from monogamy to polygamy; the latter encompasses polygyny, in which a single male mate with multiple females, and polyandry, in which a single female mates with multiple males. When polyandry results in multiple paternity, it can increase effective population size and offspring heterozygosity, reducing inbreeding and departures from the genotypic proportions expected under Hardy-Weinberg equilibrium.

Microsatellite molecular markers have been widely employed to investigate both population genetic diversity and the mating systems that influence it. Their codominant nature and Mendelian inheritance allow the identification of both alleles at each locus, enabling discrimination between maternal and paternal contributions and thereby increasing the resolution of population genetic and multiple paternity analyses.

Currently, little is known about the population genetics and mating system of the green porcelain crab *Petrolisthes armatus*, an organism with invasive potential whose geographic range is expanding toward higher latitudes. Characterizing its genetic diversity may contribute to elucidating the mechanisms underlying its adaptability to environmental conditions beyond its native range.

The present study aimed to evaluate the polymorphism of 14 microsatellite *loci* in *Petrolisthes armatus* from the Tropical Eastern Pacific. Seven *loci* were retained as suitable for population genetic analyses and three for multiple paternity assessments. In the population genetic trial, observed deviations from *Hardy-Weinberg Equilibrium* were attributable to the Wahlund effect, suggesting population structure consistent with previously reported phylogeographic patterns for the species, and supporting the utility of these markers for future studies with larger sample sizes. In contrast, the low polymorphism of the *loci* evaluated for multiple paternity precluded the detection of additional paternal contributions, limiting their application for robust inferences regarding the mating system of *P. armatus*.

Keywords: *Petrolisthes armatus,* microsatellites, polymorphism, population genetics, multiple paternity.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los sistemas de apareamiento polígamos, como la poliandria (cuando una hembra se aparea con varios machos durante la temporada reproductiva) y la poliginia (cuando un macho se aparea con varias hembras) pueden influir en procesos genéticos poblacionales, afectando la distribución de la diversidad genética, la intensidad de la deriva genética y el desequilibrio de ligamiento dentro de las poblaciones. Se hipotetiza que la poliandria puede beneficiar a las poblaciones al maximizar el tamaño efectivo de la población y mantener altos niveles de diversidad genética, aunque también, se sugiere que puede reducir estos parámetros genéticos poblacionales cuando no se traduce en paternidad múltiple, ya que, unos pocos machos pueden monopolizar la paternidad, aumentando la varianza en el éxito reproductivo masculino (Nash et al., 2021). Sin embargo, cuando la poliandria sí resulta en paternidad múltiple, en la que más de un macho contribuye genéticamente a una misma nidada, la varianza en el éxito reproductivo masculino tiende a reducirse en comparación con escenarios donde un solo macho monopoliza la paternidad, favoreciendo mayores niveles de heterocigosidad dentro de las nidadas. Esto podría reducir la homogeneidad genética entre hermanos y disminuir efectos asociados a apareamientos no aleatorios, los cuales pueden generar desviaciones en las proporciones genotípicas esperadas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg afectando la diversidad genética de las poblaciones.

Petrolisthes armatus (Gibbes, 1850) es un crustáceo decápodo de la familia Porcellanidae, organismo filtrador de fitoplancton y detritos orgánicos. Presenta una amplia distribución en costas americanas y africanas (Hiller & Lessios, 2017). Recientemente el sistema de apareamiento de *P. armatus* ha traído interés debido a reportes de expansión de su rango geográfico hacia regiones más templadas del Atlántico occidental, incluyendo las costas de Georgia y Carolina del Sur, donde ha sido considerada una especie invasora capaz de alcanzar densidades de miles de individuos por metro cuadrado (Hollebone & Hay, 2007). Manteniendo una reproducción continua a lo largo del año (Díaz & Vargas, 2001; Wehrtmann et al., 2011; Oliveira et al., 2013; Popp et al., 2020).

Además, presenta una alta plasticidad fisiológica lo que le ha permitido tolerar cambios de temperatura y salinidad (Gore & Abele,1976; Canning-Clode et al., 2011; Hiller & Lessios). Características que han podido favorecer la expansión de su rango geográfico (Hollebone & Hay, 2007). A pesar de su abundancia en ecosistemas intermareales, el conocimiento sobre su diversidad genética, estructura poblacional y comportamiento reproductivo es aún limitado.

Los estudios genéticos poblacionales realizados hasta el momento para *P. armatus* se han basado principalmente en marcadores mitocondriales, como el gen de citocromo oxidasa subunidad I (COI), los cuales permiten evaluar patrones de variación genética y relaciones filogeográficas entre poblaciones (Hiller & Lessios, 2017). Sin embargo, el ADN mitocondrial representa un único locus heredado exclusivamente por vía materna y, por lo tanto no refleja la variación presente en el genoma nuclear ni los patrones de herencia biparental característicos de organismos diploides.

El avance de las técnicas genéticas ha hecho más factible el estudio de las estrategias de apareamiento de las hembras y el análisis de diversidad dentro y entre poblaciones de distintas especies. Entre los marcadores moleculares más utilizados para estos fines se encuentran los microsatélites, que constituyen poderosas herramientas moleculares para el estudio de genética de poblaciones y paternidad, debido a su alto nivel de polimorfismo, herencia codominante y amplia distribución en el genoma, características que permiten analizar con mayor resolución los genotipos de una población (Schlötterer, 2000; Ellegren, 2004; Selkoe & Toonen, 2006).

No obstante, hasta la fecha no se han reportado *loci* microsatélites desarrollados o caracterizados específicamente para *P. armatus*, lo que limita su aplicación para realizar estudios genéticos en la especie.

Debido a la ausencia de marcadores microsatélites para *P. armatus*, resulta necesario evaluar y estandarizar *loci* que permitan obtener genotipos confiables. La caracterización preliminar de estos marcadores para análisis exploratorios de diversidad genética poblacional y de paternidad múltiple en la especie permitirá reportar a la literatura *loci* microsatélites funcionales para este tipo de estudios en *P. armatus*.

Una vez caracterizados, podrían emplearse en estudios posteriores para generar información robusta sobre patrones de heterocigosidad, desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg asociadas a la dinámica reproductiva de sus poblaciones y variación genética relacionada con su alta abundancia, tolerancia ambiental, expansión geográfica y potencial invasor.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Los microsatélites, definidos como secuencias de ADN altamente polimórficas compuestas por repeticiones cortas en tándem de uno a seis nucleótidos, exhiben herencia mendeliana codominante y son considerados una de las herramientas moleculares más informativas para

análisis de genética de poblaciones y análisis de paternidad en diversas especies (Vieira et al., 2016). Su elevada tasa de mutación y alto nivel de heterocigosidad generan múltiples variantes alélicas dentro de las poblaciones, lo que permite una clara discriminación entre individuos y facilita la identificación precisa de genotipos homocigotos y heterocigotos mediante la variación en el tamaño de alelos amplificados (Guichoux et al., 2011). Además, estos marcadores se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del genoma, lo que permite el desarrollo de múltiples pares de cebadores para amplificar *loci* independientes.

El uso combinado de múltiples *loci* microsatélites permite una mayor resolución en estudios de variación y estructura genética poblacional (Goldstein & Schlötterer, 1999; Schlötterer, 2004). La caracterización de estos *loci* puede realizarse eficientemente mediante PCR utilizando cebadores específicos de locus con un cebador universal marcado con fluoróforos, seguida de genotipificación por electroforesis capilar o mediante geles de alta resolución, lo que permite obtener datos reproducibles a un costo relativamente bajo (Schuelke, 2000; Ellegren, 2004).

Debido a que la diversidad genética y el sistema reproductivo de *P. armatus* permanecen poco estudiados, es necesario contar con herramientas moleculares adecuadas para evaluar estos aspectos en la especie, como los marcadores microsatélites. Por lo tanto, el presente estudio busca responder las siguientes preguntas: ¿Son los *loci* microsatélites desarrollados para *Petrolisthes armatus* suficientemente polimórficos en poblaciones del Pacífico Oriental Tropical (POT) para estudios preliminares de diversidad genética poblacional? y ¿permiten estos marcadores detectar evidencia de paternidad múltiple en nidadas del Pacífico panameño?

Para ello, se realizará un ensayo piloto con individuos provenientes de cuatro localidades del POT, distribuidas entre Panamá, Colombia, Ecuador y el Golfo de California, con el fin de explorar el potencial de estos marcadores para la caracterización de diversidad genética y estructura poblacional.

Paralelamente, se realizará un ensayo preliminar de paternidad múltiple a partir de familias de *P. armatus* del Pacífico panameño. Estos resultados podrían complementar un estudio paralelo del laboratorio, sobre el comportamiento reproductivo de la especie en Panamá, en el cual se realizaron observaciones conductuales de machos y hembras en acuarios y se documentaron patrones compatibles con poligamia, particularmente con tendencia hacia la poliginia.

La evaluación molecular de estos patrones reproductivos resulta relevante debido a que investigaciones en otros porcelánidos han reportado evidencia de paternidad múltiple. Por ejemplo, Toonen (2004) concluyó para *Petrolisthes cinctipes* que el 92.5 % de las hembras analizadas en Bodega Bay produjeron nidadas de paternidad mixta, requiriéndose al menos entre uno y tres machos para explicar la distribución alélica observada en la descendencia.

Comprender la variabilidad genética de la especie podría ser relevante para futuras investigaciones orientadas a evaluar su potencial biotecnológico. Este es un paso previo indispensable si se pretende realizar ensayos de bioprospección en la especie, dado a que su notable tolerancia a condiciones ambientales adversas sugiere la presencia de mecanismos moleculares con potencial interés biotecnológico.

Finalmente, los resultados obtenidos serán comparados con los de Hiller & Lessios (2017), quienes estudiaron la genética de poblaciones de *P. armatus* en todo su rango geográfico utilizando marcadores mitocondriales. Esta comparación entre marcadores permitirá evaluar si ambos tipos de marcadores son concordantes en su descripción de la estructura poblacional de *P. armatus* dentro del Pacífico Oriental Tropical o si el uso de marcadores nucleares biparentales revela una historia poblacional distinta a la documentada.

1.3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar marcadores microsatélites polimórficos para su aplicación en estudios de diversidad genética poblacional y de paternidad en el cangrejo de porcelana verde *Petrolisthes armatus* del Pacífico oriental tropical (POT).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la capacidad de amplificación y genotipificación de *loci* microsatélites de *Petrolisthes armatus* del POT.
- Caracterizar preliminarmente el polimorfismo, la variación alélica y la diversidad genética de los marcadores microsatélites en poblaciones de *Petrolisthes armatus* del POT.

- Analizar preliminarmente el polimorfismo para detectar patrones de paternidad múltiple en progenies de *P. armatus* del Pacífico panameño mediante la reconstrucción de genotipos paternos a partir de la distribución alélica en la descendencia.

1.4. HIPÓTESIS

- Hipótesis nula: los *loci* microsatélites evaluados en *P. armatus* no presentan un nivel de polimorfismo adecuado para detectar variación genética entre poblaciones del POT ni para discriminar genotipos parentales en ensayos de paternidad múltiple dentro de la población panameña.

- Hipótesis alternativa: los *loci* microsatélites evaluados en *P. armatus* presentan un nivel de polimorfismo adecuado para detectar variación genética del POT y para discriminar genotipos parentales en ensayos de paternidad múltiple dentro de la población panameña.

Dado que la paternidad múltiple exige mayor poder de exclusión que la genética de poblaciones, se contempla un escenario intermedio en el que los *loci* resulten informativos para estimar diversidad y estructura genética entre poblaciones del POT, pero insuficientes para resolver eventos de paternidad múltiple dentro de la población panameña.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. GENÉTICA DE POBLACIONES

2.1.1 EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG

El equilibrio de Hardy-Weinberg, formulado independientemente por el británico Godfrey Harold Hardy y el alemán Wilhelm Weinberg en 1908, constituye uno de los principios fundamentales de genética de poblaciones, ya que, describe el comportamiento esperado de las frecuencias alélicas y genotípicas en una población ideal en el tiempo, en ausencia de la influencia de fuerzas evolutivas, entre estas, selección natural, migración y mutación, y cumplir con el apareamiento aleatorio entre los individuos en poblaciones infinitas (supuestos poblacionales discutidos abajo).

Este principio establece que, para un locus autosómico con dos alelos *A* y *a* con frecuencias respectivas *p* y *q*, las frecuencias genotípicas esperadas en una población en equilibrio se distribuyen de acuerdo la siguiente ecuación: $p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1$, donde el genotipo homocigoto AA es representado como p^2, el genotipo heterocigoto Aa representado como 2pq y q^2 para el otro genotipo homocigoto aa. Estas frecuencias se mantienen constantes entre generaciones siempre que se cumplan los siguientes supuestos: población infinita, dado que, las poblaciones pequeñas son más susceptibles a deriva genética; ausencia de selección natural, de modo que todos los genotipos presenten la misma probabilidad de supervivencia y reproducción; ausencia de mutación, para evitar cambios en las frecuencias alélicas; ausencia de migración, puesto que, el flujo genético entre poblaciones puede alterar dichas frecuencias; y apareamiento aleatorio, donde todos los individuos tienen la misma probabilidad de reproducirse dentro de la población (Mayo, 2008).

La verificación del equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus representa un criterio importante para determinar la confiabilidad de los marcadores utilizados y para interpretar adecuadamente los patrones de variación genética observados entre poblaciones, debido a su consideración como un modelo nulo.

Cuando los *loci* se encuentran en equilibrio, se asume que las frecuencias genotípicas reflejan adecuadamente la segregación mendeliana y que el marcador puede utilizarse de manera confiable para estimar parámetros poblacionales como heterocigosidad, diferenciación genética y estructura poblacional (Selkoe & Toonen, 2006). Desviaciones significativas del equilibrio pueden sugerir la presencia de procesos biológicos relevantes como: selección natural,

endogamia o deriva genética; o problemas técnicos en la obtención de los genotipos como alelos nulos y amplicones con *stutter* (explicados en la Sección 2. Marcadores Microsatélites)

Errores sistemáticos en la genotipificación pueden afectar la interpretación de datos e influir en las conclusiones biológicas de una población; sus causas incluyen variaciones en la secuencia de ADN, baja calidad o cantidad del ADN, artefactos bioquímicos y errores humanos (Pompanon et al., 2005). Adicionalmente, el *allelic dropout*, que se refiere a la no amplificación de uno de los dos alelos en un locus heterocigoto, representa una fuente de error difícil de cuantificar, ya que, un locus heterocigoto afectado por este fenómeno y un locus genuinamente homocigoto producen un perfil de banda única, lo que dificulta la comparación de tasas de error entre *loci* o poblaciones con diferente nivel de heterocigosidad (Pompanon et al., 2005).

Por tanto, la interpretación requiere considerar tanto factores evolutivos y demográficos como aspectos metodológicos para dar explicación a alteraciones de dichas frecuencias en el análisis poblacional (Meisner y Albrechtsen, 2019).

2.1.2 DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES

La diversidad genética describe la cantidad y distribución de variación genética dentro de una población o conjunto de poblaciones. Se evalúa mediante distintos parámetros, entre ellos: heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), los cuales cuantifican respectivamente la proporción de individuos heterocigotos observados en la muestra y la proporción esperada bajo el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1978; Hartl & Clark, 2007).

A su vez, también se calcula la riqueza alélica, que corresponde al número de alelos presentes en un locus dentro de una población. Debido a que este estimador puede verse influenciado por el tamaño de muestra, en muchos estudios se emplean métodos de estandarización como la rarefacción para permitir comparaciones entre poblaciones con diferentes tamaños de muestra (Leberg, 2002). De manera complementaria, el número efectivo de alelos describe el número de alelos igualmente frecuentes que producirían el mismo nivel de heterocigosidad observado en una población, proporcionando una medida adicional de la distribución de las frecuencias alélicas (Kimura & Crow, 1964).

Por último, existen diversos índices de diversidad que permiten una evaluación integral de la riqueza y la abundancia relativa de los alelos presentes en una población. Entre ellos, el índice de Simpson (1-D), que se basa en la probabilidad de que dos alelos seleccionados al azar en una población sean distintos entre sí. El índice se calcula a partir de la suma de los cuadrados de las frecuencias alélicas, de manera que valores cercanos a 0 indican una mayor dominancia de pocos alelos, mientras que, valores cercanos a 1 reflejan una distribución más equitativa de las frecuencias alélicas y, por tanto una mayor diversidad genética (Simpson, 1949).

2.1.3 ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

La estructura genética poblacional describe la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de una especie. Surge como resultado de diversos procesos evolutivos y demográficos, tales como la deriva genética, el flujo génico, la selección natural, la mutación y los patrones de dispersión de los organismos. Permite inferir el grado de conectividad entre poblaciones y comprender los procesos evolutivos que moldean la diversidad genética en las especies naturales, dado que, cuando las poblaciones intercambian individuos con frecuencia, las frecuencias alélicas tienden a homogeneizar entre localidades; en contraste, cuando el flujo génico es limitado, las poblaciones pueden divergir genéticamente a lo largo del tiempo, generando diferenciación genética espacial (Slatkin, 1987; Holsinger & Weir, 2009). En estudios de conservación, permite identificar poblaciones aisladas, detectar cuellos de botella genéticos y evaluar niveles de conectividad; mientras que, en biogeografía, facilita el reconocimiento de barreras que afectan la dispersión e influyen en el flujo génico.

Uno de los enfoques más utilizados para cuantificar la estructura genética poblacional es el análisis de los índices de fijación o estadísticos F, propuestos por Sewall Wright (Wright, 1965).

Estos parámetros describen la distribución de la variación genética en diferentes niveles jerárquicos de organización poblacional y permiten evaluar desviaciones del equilibrio de apareamiento aleatorio. Entre ellos, el coeficiente F_{IS}, mide el grado de endogamia de los individuos dentro de una subpoblación, comparando la heterocigosidad observada con la heterocigosidad esperada bajo equilibrio de Hardy-Weinberg; valores positivos indican un déficit de heterocigotos, al tiempo que, valores negativos sugieren un exceso de heterocigotos (Holsinger & Weir, 2009).

Por su parte, el coeficiente F_{ST} cuantifica la diferenciación genética entre subpoblaciones y representa la proporción de la variación genética total atribuible a diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones, donde valores cercanos a cero indican escasa diferenciación genética y valores elevados reflejan mayor divergencia genética (Meirmans & Hedrick, 2011).

Finalmente, el coeficiente F_{IT} describe el nivel total de endogamia de los individuos en relación con la población global, integrando los efectos de apareamiento no aleatorio dentro de las subpoblaciones y diferenciación genética entre ellas (Weir & Cockerham 1984).

Los tres estadísticos F se relacionan dentro de un modelo jerárquico de estructura poblacional que considera tres niveles: individuo, subpoblación y población total. Esta relación se expresa mediante la ecuación $(1-F_{IT}) = (1-FI_S)\ (1-F_{ST})$, la cual indica que la reducción total de heterocigosidad en una población estructurada depende tanto de los procesos que actúan dentro de las subpoblaciones, como la endogamia o la deriva genética local, como de los procesos que generan divergencia entre poblaciones, tales como la restricción del flujo génico o el aislamiento geográfico (Wright, 1965).

Por otro lado, también se utiliza el método de análisis de varianza molecular (AMOVA) para evaluar la estructura genética poblacional en estudios no preliminares mediante la partición de la variación genética en diferentes niveles jerárquicos, lo que lo hace más adecuado para datos genéticos que no cumplen los supuestos de normalidad e independencia del ANOVA clásico, permitiendo calcular componentes de varianza para cuantificar la diferenciación genética entre grupos y evaluar su significancia estadística mediante pruebas de permutación (Excoffier et al., 1992).

2.1.4 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO (LD)

El desequilibrio de ligamiento describe la asociación no aleatoria de alelos en diferentes *loci* dentro de una población. En condiciones ideales de apareamiento aleatorio y ausencia de fuerzas evolutivas, los alelos presentes en *loci* distintos se combinan de manera independiente, de modo que la frecuencia de los haplotipos corresponde al producto de las frecuencias alélicas individuales. Sin embargo, cuando esta independencia no se cumple, se habla de desequilibrio de ligamiento. Este fenómeno puede originarse por diversos procesos evolutivos y demográficos, como la proximidad física entre *loci* en un cromosoma, la deriva genética, la selección natural,

eventos de fundador, cuellos de botella poblacionales o la mezcla reciente de poblaciones genéticamente diferenciadas. Los marcadores como microsatélites, permiten evaluar si los *loci* analizados se segregan de manera independiente y, por lo tanto pueden emplearse de manera confiable para inferir patrones de diversidad genética y estructura poblacional (Slatkin, 2008; Selkoe & Toonen, 2006).

Los índices multilocus permiten resumir el desequilibrio de ligamiento en una única estadística a partir de múltiples *loci*, facilitando el análisis de la estructura genética multilocus y las asociaciones no aleatorias entre *loci* (Brown et al., 1980). Entre estos, el índice de asociación estandarizado $\bar{r}_d$ constituye una medida del grado de asociación no aleatoria entre alelos en diferentes *loci* dentro de una población. Este índice se deriva del *Index of Association* (IA), pero presenta la ventaja de estar estandarizado por el número de *loci* analizados, lo que admite comparaciones directas entre poblaciones o estudios con diferente número de marcadores (Agapow & Burt, 2001). Conceptualmente, $\bar{r}_D$ cuantifica la desviación entre la varianza observada de las distancias genéticas multilocus y la esperada bajo equilibrio de ligamiento, donde valores cercanos a cero indican independencia entre *loci*, a la vez que, valores positivos reflejan la presencia de desequilibrio de ligamiento, asociado a factores como reproducción clonal, estructura poblacional o selección.

2.2 SISTEMAS DE APAREAMIENTO

Los sistemas de apareamiento en animales representan el conjunto de estrategias mediante las cuales los individuos localizan, seleccionan y aseguran parejas reproductivas, incluyendo el número de parejas, la duración de los vínculos y el grado de cuidado parental, reflejando una interacción dinámica entre historia de vida, restricciones fisiológicas y presiones ecológicas (Subramoniam, 2013).

Los sistemas reproductivos se pueden clasificar en monogamia y poligamia. El primer sistema se cumple cuando se forman vínculos exclusivos entre dos individuos del sexo opuesto de una misma especie para obtener crías únicamente de la pareja. La monogamia puede traducirse en monogamia social, en la que se forma una pareja estable que comparte territorio, cuidado parental o convivencia, y monogamia genética o reproductiva, cuando existe exclusividad reproductiva (Lambert et al., 2018). Una pareja puede practicar socialmente la monogamia, pero no ser reproductivamente monógama, como ocurre con el gorrión común (*Passer domesticus),*

especie que presenta monogamia social, aunque análisis genéticos han evidenciado patrones de paternidad extrapareja (PPM). Este comportamiento puede conferir ventajas evolutivas, como el aumento de la diversidad genética entre las crías, una mayor probabilidad de su supervivencia y la reducción del riesgo de endogamia, mientras se mantiene el cuidado biparental proporcionado por la pareja socialmente monógama (Brouwer & Griffith, 2019).

El sistema de apareamiento polígamo involucra el apareamiento de un individuo con múltiples parejas del sexo opuesto. Las relaciones polígamas pueden clasificarse en poliginia, cuando un macho logra aparearse con múltiples hembras, tal es el caso del oso de tres dedos garganta marrón (*Bradypus variegatus*), donde las hembras son monopolizadas por un solo macho (Pauli et al., 2012); y poliandria, cuando una hembra se aparea con múltiples machos. En muchos escenarios de la poliandria, especialmente en insectos, las hembras almacenan el esperma de distintos machos, como ocurre en la mosca *Drosophila pseudoobscura* (Gowaty, 2012). Este comportamiento puede generar paternidad múltiple en la descendencia, aumentando potencialmente el tamaño efectivo poblacional y la diversidad genética al incrementar el número de progenitores que aportan alelos a las crías (Yockachonis et al., 2020).

Debido a que muchos sistemas de apareamiento naturales no ocurren completamente al azar, al estar condicionados por factores ecológicos y fisiológicos, como la distribución espacial de los individuos, disponibilidad de recursos, la territorialidad, competencia sexual y la capacidad de dispersión, estos pueden generar desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg y modificar la estructura genética poblacional (Nunney, 1993; Martinez et al., 2000). Por lo tanto, el estudio de los sistemas de apareamiento resulta fundamental, ya que, estos influyen directamente sobre la dinámica y estructura genética de las poblaciones.

En crustáceos, la diversidad de sistemas de apareamiento abarca, también desde la monogamia, incluyendo asociaciones persistentes o secuenciales, hasta formas complejas de poligamia como poliginia, poliandria y poliginandria (Baeza y Thiel, 2007; Subramoniam, 2013). Esta variabilidad está fuertemente condicionada por factores ecológicos y fisiológicos, tales como la distribución espacial de las hembras, la sincronía de su receptividad y la proporción sexual operacional, los cuales determinan el potencial de monopolización de parejas y la intensidad de la competencia sexual (Emlen y Oring, 1977; Subramoniam, 2013).

En especies de vida libre, donde los individuos pueden desplazarse ampliamente y los recursos se encuentran dispersos, suelen observarse sistemas polígamos. La movilidad le permite a

machos y hembras encontrar múltiples parejas, aumentando la competencia sexual y reduciendo la estabilidad de las asociaciones reproductivas. Emlen & Oring (1977) proponen que los sistemas de apareamiento dependen de la posibilidad de monopolizar recursos o parejas. Cuando los recursos están distribuidos de manera desigual, algunos machos pueden controlar territorios de mayor calidad y atraer múltiples hembras, favoreciendo la poliginia por defensa de recursos. Además, plantean que la distribución espacial de los recursos y la disponibilidad temporal de parejas determinan el potencial ambiental para la poligamia.

Por otro lado, el estilo de vida simbiótica tiene una dinámica poblacional diferente. En crustáceos simbiontes el sistema de apareamiento depende en parte de las características del hospedero, como su tamaño, abundancia y complejidad estructural (Baeza & Thiel, 2003). Cuando el hospedero es, escaso y difícil de encontrar, los individuos tienden a permanecer en él y defenderlo, favoreciendo la monogamia. En contraste, cuando los hospederos son abundantes, grandes y fáciles de reemplazar, los simbiontes pueden moverse entre ellos con frecuencia favoreciendo la promiscuidad. Por ejemplo, en el cangrejo *Dissodactylus crinitichelis*, simbionte del erizo *Encope emarginata*, se observó un desplazamiento activo de individuos entre hospederos, debido a su abundancia, posibilitando un comportamiento polígamo entre los individuos, puesto que, no se encontraban aislados (Rodrigues et al., 2017).

Además, del estilo de vida de los crustáceos, los sistemas de apareamiento, también pueden verse influenciados por estrategias reproductivas como "*mate guarding*" o el respaldo precopulatorio, donde algunos machos suelen permanecer cerca de las hembras y protegerlas luego de que ellas muden su exoesqueleto para asegurar la cópula (Parker, 1970; Subramoniam, 2013).

Estudios en decápodos del infraorden Brachyura, han demostrado que, aunque el resguardo precopulatorio incrementa la probabilidad de éxito reproductivo masculino al reducir la interferencia de competidores, no se garantiza una exclusividad reproductiva, ya que, las hembras pueden copular con múltiples machos y almacenar los espermatóforos en la espermateca, cavidad o saco conectado al sistema reproductor femenino. La presencia de espermateca conlleva a escenarios de competencia espermática, lo que implica la elección femenina postcopulatoria (Diesel, 1991; Eberhard, 1996; Jossart et al., 2014) y un éxito de paternidad única por nidada (Urbani et al.,1998).

En anomuros de la familia Porcellanidae, el sistema reproductor femenino carece de espermateca (Nyblade, 1987). Por lo tanto, en sistemas polígamos, la ausencia de esta estructura, implica que los espermatozoides no se resguardan ni se estratifican por periodos prolongados, como sucede con los cangrejos Brachyura (Goldstein & Dupré, 2010). Esto implicaría que la fertilización dependería principalmente del esperma transferido recientemente durante la cópula, aunque los mecanismos exactos de almacenamiento y distribución espermática en este grupo aún no se conocen con certeza. Se ha observado, por medio de técnicas moleculares, que una misma nidada de la especie *Petrolisthes cinctipes*, puede ser fecundada por varios machos, estimando que el 92.5 % de las hembras en Bodega Bay producen nidadas de paternidad mixta, requiriendo un mínimo de 1 a 3 machos para explicar la distribución alélica observada en la descendencia (Toonen, 2004).

2.3 MARCADORES MICROSATÉLITES

En esta sección se realizará una descripción general de los marcadores microsatélites dado que es la técnica molecular utilizada en el presente estudio, incluyendo sus mecanismos de mutación y reparación, la dinámica que regula la variación en la longitud de los alelos y los principales modelos teóricos de mutación utilizados para explicar los cambios en las frecuencias alélicas poblacionales. Asimismo, se abordará el impacto de fenómenos como los alelos nulos y la homoplasia en el análisis de microsatélites, así como sus ventajas, limitaciones, diseño de cebadores y las principales fuentes de error que pueden afectar los procesos de genotipificación.

2.3.1 DESCRIPCIÓN GENERAL

Los marcadores microsatélites, también conocidos como repeticiones de secuencia simple (SSR) o repeticiones cortas en tándem (STR) forman parte de una de las subcategorías de repeticiones de nucleótidos en tándem (TR) así como los satélites y los minisatélites (Vieira et. al, 2016).

Previamente a la realización del Proyecto Genoma Humano, se creía que las repeticiones de nucleótidos en tándem se encontraban solamente en las regiones no codificantes, que solo las regiones codificantes que formaban el 1 o el 5 % del genoma eran importantes y el 98 % restante se consideraba “basura” o “relleno evolutivo” (Mattick y Amaral, 2023). Ahora, se han encontrado estas repeticiones dentro de genes codificantes de proteínas y sus regiones no traducidas o UTR

en eucariotas y se señala que su distribución podría ser no aleatoria en intrones, UTR y regiones codificantes (Li et. al, 2004).

En humanos, se ha evidenciado que ciertas repeticiones en tándem, como las repeticiones de trinucleótidos en poliglutamina, están involucradas en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington, el síndrome del cromosoma X frágil, algunos tipos de cáncer y la ataxia espinocerebelosa, debido a las extensiones prolongadas en los sitios 5'UTR, 3'UTR e intrones de dichas repeticiones que superan el umbral definido provocando deslizamientos de la transcripción y produciendo productos expandidos que interrumpen el empalme, la exportación del ARNm al citoplasma o el silenciamiento genético, que conducen a cambios fenotípicos (Gemayel et.al, 2012; Li, et.al 2004).

Hoy se define a los microsatélites como segmentos cortos de ADN codominantes que varían de 1 a 6 pb repetidos sucesivamente. En comparación con el ADN no repetitivo que presenta una tasa de mutación de 10^{-9} por locus por generación, los microsatélites pueden presentar altas tasas de mutación desde 10^{-6} a 10^{-2} por locus por generación en humanos, aunque estas estimaciones no se pueden suponer para todos los organismos, ya que, la tasa de mutaciones podría cambiar entre especies (Schlötterer, 2000; Ellegren, 2000).

Estas variaciones podrían explicar su alto grado de polimorfismo, puesto que, existen diferencias entre las longitudes de las unidades repetitivas entre individuos, las cuales permiten visualizar la presencia de dos o más formas variantes de un alelo y así diferenciar individuos homocigotos de heterocigotos.

Aquellas características convierten a los microsatélites en un marcador genético útil, que se ha utilizado en investigaciones forenses, en análisis genéticos de poblaciones para estimar su flujo y tasas de entrecruzamiento, en estudios para comprender su contribución a las enfermedades neurodegenerativas humanas, para estimar el grado de parentesco entre genotipos, para construir mapas de ligamiento y para mapear *loci* involucrados en caracteres cuantitativos, etc. (Vieira et. al, 2016).

2.3.2 MECANISMO DE MUTACIÓN Y REPARACIÓN

Apareamiento erróneo de la cadena deslizada (SSM)

El mecanismo de apareamiento erróneo de la cadena de ADN deslizada (*slipped-strand mispairing*, SSM) explica e influye la evolución y mutación de los microsatélites entre generaciones. La mutación heredable de los microsatélites ocurre principalmente durante la replicación del ADN en células de línea germinal y no existe evidencia de su asociación a eventos de recombinación cromosómica durante la meiosis (Ellegren, 2000; Kayser et al., 2000). Sin embargo, este mecanismo, también puede ocurrir durante la replicación de células somáticas y si los errores en este tipo de célula no se corrigen y se acumulan pueden llegar a contribuir a la inestabilidad genómica asociada a procesos neoplásicos (Pećina et al. 2020).

Este proceso inicia en la célula con la separación local de las hebras de doble cadena del ADN, facilitando que las repeticiones se alineen de forma incorrecta, ya que, al tener secuencias idénticas, una repetición puede aparearse con otra igual en la hebra paralela creando una burbuja o bucle (Fig. 1). Si durante la síntesis de ADN, la cadena nueva se desliza hacia atrás y la región recién sintetizada se alinea con una secuencia de la cadena molde, se formará el bucle en la cadena nueva, y la polimerasa volverá a leer la secuencia desapareada de la cadena molde, y por último este creará una inserción en la secuencia. Sin embargo, si durante la síntesis de ADN, la cadena molde se desliza hacia adelante (*downstream*) y se forma un bucle en una secuencia no leída por la polimerasa, entonces habría una deleción de la secuencia (Levinson y Gutman, 1987).

Se ha descrito que este mecanismo de mutación puede ocurrir mayormente en los extremos de las secuencias repetidas, donde la ADN polimerasa se libera después de la síntesis inicial, lo cual permite que los extremos parcialmente desapareados de la cadena molde y la cadena nueva se desalineen y vuelvan a emparejarse de forma no convencional y tras este deslizamiento, se forma un nuevo extremo que se vuelve a rellenar por la polimerasa, expandiendo o contrayendo la cadena (Schlötterer y Tautz, 1992).

Finalmente, mecanismos de deslizamiento similares, también pueden ocurrir durante la amplificación por PCR de secuencias microsatélites *in vitro*. En este caso, la ADN polimerasa puede desalinearse sobre las regiones repetitivas generando fragmentos secundarios más cortos o más largos, los cuales se observan en geles como bandas de menor tamaño (bp) y en electroferogramas como picos secundarios o desordenados, fenómeno conocido como *stutter* o “tartamudeo de la polimerasa”. Este efecto presenta más incidencia a medida que aumenta el tamaño de longitud de las unidades repetidas junto con repeticiones simples de mononucleótidos

y dinucleótidos. Se ha descrito que la tasa de mutación por deleción *in vitro* es mucho mayor que la tasa de expansión, debido a la presencia de productos más cortos durante la amplificación (Hosseinzadeh- Colagar et al., 2016; Ellegren, 2004).

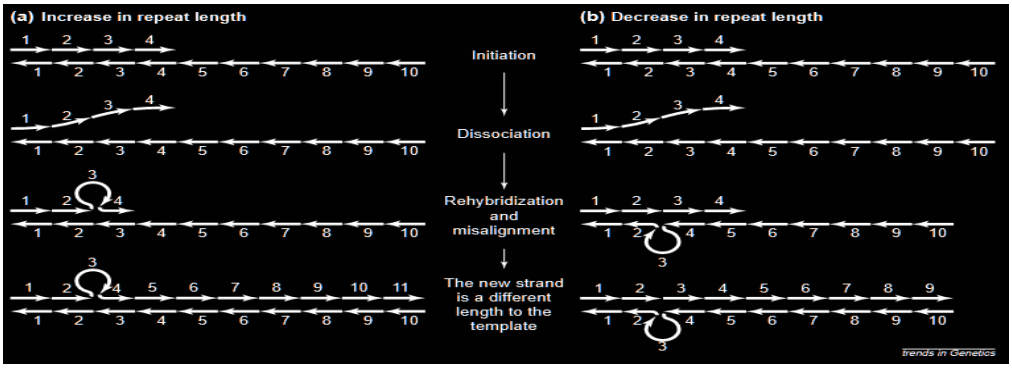


Figura 1. Apareamiento erróneo de la cadena deslizada. Inserción (A) y deleción de la secuencia de ADN (B). Tomado de Ellegren (2000)

Sistemas de reparación por el deslizamiento de la cadena

En células eucariotas, existen dos sistemas de reparación que se activan cuando ocurren errores en la replicación: el sistema *proofreading* y el sistema *mismatchrepair*. El segundo tiene un impacto mucho mayor en la corrección de bucles formados por el deslizamiento de la cadena y solo los fragmentos no reparados terminan como evento de mutación en microsatélites, este sistema explica porque la velocidad de la tasa de mutación del microsatélite no es igual a la velocidad con la que ocurren los deslizamientos al final de la replicación (Ellegren, 2004).

El sistema de reparación de desajustes o "*mismatchrepair*" (Fig. 2) presenta un conjunto de proteínas que actúan de manera coordinada para corregir errores de apareamiento o los bucles de inserción/deleción generados durante la replicación del ADN que puede estar en el extremo 5' o en el extremo 3' del error (Liu et al., 2017; Pećina et al., 2020).

El reconocimiento del desajuste en ambos extremos es llevado a cabo por complejos MutS homólogos: MutSα (MSH2-MSH6), que detecta principalmente desajustes puntuales y pequeños bules, y MutSβ (MSH2-MSH3), especializado en la detección de bucles de inserción/delección más grandes, frecuentes en microsatélites. Estos complejos sufren un cambio conformacional que les permite desplazarse como pinzas deslizantes a lo largo de la molécula hasta reclutar los factores posteriores de reparación.

Posteriormente, se recluta la enzima exonucleasa 1 (EXO 1), la cual degrada la hebra de ADN desde un extremo generado en el sitio de corte en dirección 5’ - 3’, eliminando el fragmento que contiene el desajuste. Mientras que, la proteína RPA “*Replicating Protein A*” se une a la otra cadena simple de ADN que queda expuesta, para evitar que se formen estructuras secundarias y facilitar el ensamblaje ordenado de los factores de reparación.

Cuando el bucle se encuentra en el extremo 3’, la endonucleasa MutLα (MLH1-PMS2) con dirección 3’-5’ entra y realiza un corte más allá del desajuste, en el lado 5’, esto le permite a la enzima Exo 1 entrar por el nuevo corte y eliminar el desajuste en dirección 5’ - 3’. Este sistema requiere, también de la participación de la proteína PCNA “*Proliferating Cell Nuclear Antigen*”, el cual actúa como abrazadera deslizante del ADN, y RFC “*Replication Factor C*”, que lo carga sobre la molécula de ADN utilizando ATP. PCNA contribuye a coordinar y orientar el proceso de reparación en la hebra neosintetizada.

Finalmente, tras la eliminación del tramo de ADN erróneo, la ADN polimerasa δ se une al extremo 3’-OH generado y resintetiza la hebra en dirección 5’-3’. Por último, la enzima ADN ligasa sella la cadena (Liu et al., 2017; Pećina et al., 2020).

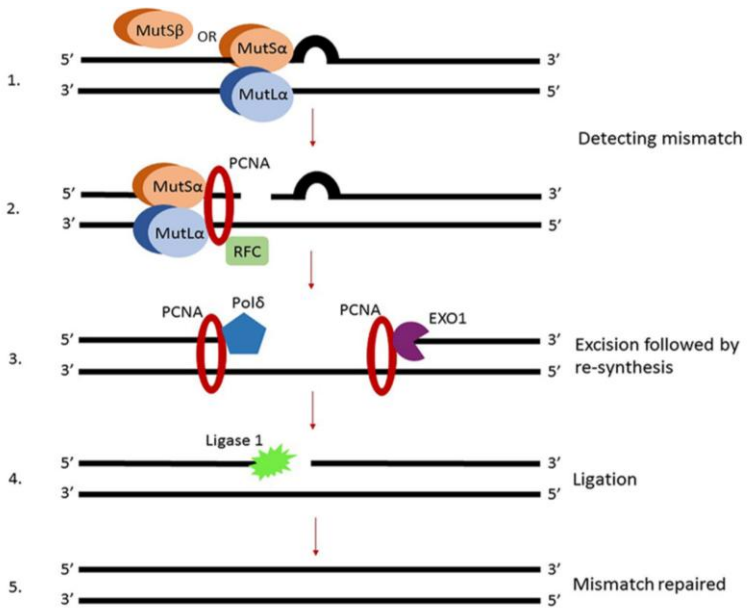


Figura 2. Esquema del sistema de reparación de desajustes. Tomado de Pećina et al. (2020)

2.3.3 EQUILIBRIO Y DINÁMICA DE MUTACIONES

Existe una clasificación para los microsatélites según el tipo de secuencia repetida, como perfectos, imperfectos, interrumpidos y compuestos. Los microsatélites perfectos son aquellos cuya secuencia repetitiva es totalmente consecutiva y no se ve interrumpida por bases que no pertenezcan al motivo. Por otro lado, los microsatélites imperfectos son aquellos que se ven interceptados por un par de bases que no coinciden entre los motivos repetidos del motivo. Mientras que, en los microsatélites interrumpidos existe una pequeña secuencia entre la secuencia repetitiva que no coincide con la secuencia del motivo, como una “interrupción”. Por último, los microsatélites compuestos que se refieren a una secuencia que contiene dos repeticiones de secuencia distintas consecutivamente (Oliveira et al., 2006).

Las interrupciones e imperfecciones en los microsatélites y las mutaciones puntuales, disminuyen el error por deslizamiento de la cadena, ya que, al agregar algunas bases diferentes a la secuencia repetida, podría aumentar la especificidad para el apareamiento de nucleótidos entre la cadena recién sintetizada y la molde, impidiendo la expansión ilimitada. Por lo tanto, la longitud de los microsatélites en equilibrio es el resultado de la interacción entre la tasa de deslizamiento y la tasa de mutaciones puntuales (Kruglyak et al., 2000). También, se describe que los alelos con mayor longitud son más propensos a sufrir una tasa de contracciones más alta que los alelos cortos. Las tasas de mutación por expansión no dependen de la longitud del microsatélite, lo que quiere decir que tanto alelos cortos como largos presentan igual probabilidad de expandirse. Por lo tanto, se favorece un equilibrio o distribución estable de longitudes (Xu et al., 2000).

Este equilibrio permite el polimorfismo entre la longitud de las secuencias de los microsatélites, y seguir patrones de herencia entre individuos, ya que, si las tasas de mutación fueran muy bajas, estos patrones serían pocos frecuentes. Si la tasa de mutación fuera muy alta, habría muchos cambios de una generación a la otra (Bennet, 2000).

2.3.4 MODELOS TEÓRICOS DE MUTACIÓN

En el estudio de genética de poblaciones se han desarrollado modelos evolutivos teóricos que explican el cambio de las frecuencias alélicas en una población a lo largo del tiempo. A continuación, se explicarán los modelos teóricos mutacionales más utilizados:

Modelo de alelos infinitos (IAM)

Propuesto por Kimura y Crow en 1964, asume que cada vez que ocurre una mutación en un locus, se genera un alelo completamente nuevo que no ha existido previamente en la población. El espacio de posibles alelos es tan grande que la probabilidad de repetir alelos por mutación es despreciable, indican que dos mutaciones nunca producirán el mismo alelo por azar. Asimismo, señalan que no hay reversiones ni convergencias alélicas.

En microsatélites, estas mutaciones alteran el número de repeticiones y este modelo no refleja fielmente el mecanismo de mutación real de los microsatélites, que suele consistir en la ganancia o pérdida de unidades repetitivas y, por lo tanto, “la proximidad en términos del número de repeticiones no indica una mayor relación filogenética” (Oliveira et al., 2006), dado que, la evolución de los microsatélites es altamente mutable y reversible. Por último, bajo este modelo, la diferenciación poblacional se estima típicamente mediante el F_{st} de Wright (1965), que no considera relaciones evolutivas entre alelos ni diferencias en sus tamaños, calculado a partir de la heterocigosidad total esperada (Ht) y la heterocigosidad promedio dentro de las poblaciones (Hs).

Modelo de mutación por pasos o *Stepwise mutation model* (SMM)

Propuesto por Kimura y Ohta en 1978, describe un tipo de mutación en el que los alelos cambian de forma gradual, ganando o perdiendo una unidad a la vez. A diferencia del modelo de alelos infinitos, que asume que cada mutación genera un alelo completamente nuevo, el SMM considera que los alelos son valores numéricos ordenados y que las mutaciones ocurren en "pasos" de una unidad, ya sea hacia arriba (+1) o hacia abajo (–1). En microsatélites, este modelo refleja el mecanismo de mutación real de los mismos, ya que, se asume que un alelo con 10 repeticiones puede mutar a uno con 9 o con 11 repeticiones en un solo evento y que estas mutaciones reversibles se acumulan a lo largo del tiempo. Más adelante, en 1995 Montgomery Slatkin aplicó este modelo a estudios de genética de poblaciones usando microsatélites y propuso una medida llamada R_{ST} como alternativa al estadístico Fst. A diferencia de F_{ST}, que considera únicamente las frecuencias alélicas, R_{ST} incorpora la distancia mutacional entre alelos, asumiendo que alelos con tamaños similares están evolutivamente más relacionados que aquellos con mayores diferencias en el número de repeticiones. Sin embargo, este modelo puede presentar limitaciones, ya que, también pueden ocurrir mutaciones de dos o más repeticiones a la vez.

Modelo de dos fases o *Two phase model* (TPM)

Este modelo fue desarrollado como una mejora del modelo de mutación por pasos (SMM), por Di Rienzo et al en 1994, donde proponen una fase principal en la que las mutaciones ocurren en pasos de una sola repetición (SMM), pero una proporción menor ocurre en una fase secundaria de mutaciones de saltos de dos o más repeticiones a la vez. Por ejemplo, un alelo con 10 repeticiones puede mutar a 9 o 11 (paso simple), pero también, con menor probabilidad, a 7 o 13 (salto múltiple). Esta mezcla de mutaciones refleja mejor lo que se ha observado experimentalmente en la evolución de los microsatélites en diferentes organismos.

Modelo de K-alelos (KAM)

Propuesto por Crow y Kimura en 1970. Este modelo describe que hay un número finito de posibles alelos (K) en un locus y que cada mutación produce otros K-1 alelos posibles. Si ocurre una mutación, el alelo cambia al azar a uno de los otros alelos posibles, pero no puede convertirse en sí mismo. Esto lo diferencia del modelo de alelos infinitos, donde cada mutación siempre crea un alelo completamente nuevo. El modelo KAM permite calcular la heterocigosidad esperada, que es la probabilidad de que dos alelos al azar sean diferentes. Esta probabilidad depende del tamaño de la población, la tasa de mutación (u) y el número de alelos posibles.

2.3.5 ALELOS NULOS Y HOMOPLASIA

La homoplasia y los alelos nulos son dos fenómenos que complican la interpretación de los genotipos basados en microsatélites. La homoplasia en microsatélites ocurre cuando dos alelos comparten el mismo tamaño, pero no tienen un origen común, es decir, no son idénticos por descendencia sino por convergencia evolutiva. Este fenómeno puede explicarse bajo distintos modelos teóricos de mutación, como el modelo de mutación escalonada (SMM), el modelo de dos fases (TPM) y el modelo de K alelos (KAM) (Jarne & Lagoda, 1996).

Como se mencionó anteriormente, en estos modelos se describen procesos en los que las mutaciones implican ganancias o pérdidas de unidades repetidas, lo que permite que distintos linajes evolucionen hacia estados alélicos del mismo tamaño por vías mutacionales distintas, sin compartir ancestros comunes recientes. En muchos estudios de genética de poblaciones no causa efecto o gran impacto en el análisis de microsatélites. Sin embargo, para otros estudios filogenéticos o modelos que asumen identidad por descendencia si podría presentar desafíos (Estoup et al., 2002).

Los alelos nulos son alelos presentes en el individuo pero que no pueden ser detectados debido a mutaciones en las regiones donde se unen los cebadores, impidiendo su amplificación durante la PCR. Esto genera una aparente ausencia del alelo y puede falsear la interpretación de genotipos porque el individuo parece homocigoto para el alelo amplificado, cuando en realidad es un heterocigoto con un “alelo invisible”. Como consecuencia, la frecuencia de homocigotos queda sobreestimada, lo que puede producir desviaciones artificiales del equilibrio de Hardy-Weinberg (Pemberton et al., 1995). Se describe que estos alelos pueden alcanzar frecuencias de hasta 15 % en algunos *loci* y su presencia puede ser identificada si se observa una desviación sistemática de las proporciones esperadas de genotipos bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg (Jarne & Lagoda, 1996).

Por lo tanto, los alelos nulos y la homoplasia pueden introducir sesgos en los estudios de paternidad, ya sea generando exclusiones falsas o coincidencias engañosas entre individuos no relacionados. Para minimizar estos errores y aumentar la precisión del análisis, se recomienda utilizar múltiples *loci* microsatélites, ya que, permitiría ampliar el número de datos disponibles para mejorar la resolución del estudio y reforzar la capacidad de discriminación entre los resultados (Blouin et al., 1996).

2.3.6 VENTAJAS Y LIMITACIONES

Metodología

En el laboratorio, los microsatélites pueden amplificarse mediante PCR multiplex utilizando cebadores marcados con fluorescencia, lo que reduce el tiempo requerido para su detección (Hayden et al., 2008). Esta se realiza a través de fluorescencia inducida por láser durante el proceso de genotipificación, lo que permite determinar el tamaño de los productos de PCR y, por ende, inferir el número de repeticiones presentes en cada alelo del individuo analizado (Ziegle et al., 1992; Schuelke, 2000). Igualmente, pueden amplificarse a partir de concentraciones mínimas de ADN con estudios en mamíferos que reportan umbrales de aproximadamente 56 pg por reacción para obtener genotipos confiables al 99 % de probabilidad (Taberlet et al., 1996).

La principal complejidad técnica radica en que los microsatélites deben ser aislados *de novo* en cada especie estudiada por primera vez, lo que exige conocer las secuencias flanqueantes de cada locus para poder diseñar cebadores específicos. Este proceso involucra la construcción y

cribado de bibliotecas genómicas, la secuenciación de clones positivos y la posterior optimización de cada locus. Zane et al. (2002) indican que el método tradicional de aislamiento tiene un costo de configuración de entre 2 000 y 4 000 dólares y puede tomar aproximadamente un mes de trabajo, con un rendimiento de clones positivos frecuentemente inferior al 3 %. En caso de recurrir a proveedores comerciales, el costo de una biblioteca enriquecida puede oscilar entre 5 000 y 10. 000 dólares, cifra que aumenta considerablemente si el proveedor debe encargarse, también de la secuenciación y optimización de los *loci*. En ocasiones, las bandas de *stutter* generadas por la ADN polimerasa pueden dificultar la evaluación precisa de los polimorfismos cuando los análisis de genotipificación se realizan únicamente mediante electroforesis en gel (Marwal & Gaur, 2020).

Aunque el costo inicial es elevado, los cebadores representan una inversión a largo plazo, ya que, una vez diseñados pueden reutilizarse para genotipificar múltiples individuos de la misma especie. Adicionalmente, en algunos casos es posible su aplicación en especies cercanamente emparentadas mediante amplificación cruzada, aunque con una tasa de éxito variable dependiendo de la distancia evolutiva entre los taxones (Schlötterer, 2000; Ellegren, 2000; Zane et al., 2002; Vieira et. al, 2016).

Microsatélites vs. otros marcadores

Los microsatélites presentan ventajas importantes frente a marcadores más antiguos como satélites (satDNA) y minisatélites (VNTR). El ADN satélite está compuesto por unidades de repetición largas, su tamaño total de expansión va de 100 kb a varios Mb, que forman bloques de heterocromatina constitutiva asociados principalmente a regiones centroméricas y teloméricas. Al no ser amplificables eficientemente por PCR, su utilidad en genética de poblaciones es escasa (Bennett, 2000). Los VNTR presentan unidades de repetición de longitud intermedia (6–50 pb). Aunque se encuentran distribuidos a lo largo de todo el genoma, la mayoría se agrupa en regiones teloméricas. Además, son polimórficos y amplificables por PCR; sin embargo, su tamaño total de expansión, que puede variar entre 100 pb y 20 kb, dificulta una tipificación precisa y reproducible (Bennett, 2000).

En cambio, los microsatélites poseen unidades de repetición cortas de 1 a 6 pb, distribuidas de manera más homogénea en regiones codificantes y no codificantes del genoma. Estos son fácilmente ampliables por PCR lo que permite una genotipificación reproducible. Por ello,

constituyen los marcadores de repeticiones en tándem más utilizados en estudios genéticos (Ellegren, 2004; Litt & Luty 1989; Jarne & Lagoda 1996).

Para análisis de paternidad los microsatélites siguen siendo más eficientes en comparación a los marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP). Los AFLP son marcadores dominantes, por lo que solo permiten registrar presencia o ausencia de bandas, sin diferenciar si la banda proviene de uno o de ambos cromosomas homólogos, impidiendo distinguir heterocigotos de homocigotos (Gerber et al., 2000).

Actualmente, los microsatélites compiten contra los polimorfismos de nucleótido único (SNP). Estos consisten en variaciones de una sola base nitrogenada en una posición específica del ADN y por lo general son bialélicos o presentan dos nucleótidos alternativos posibles en un mismo locus. Se distribuyen tanto en regiones codificantes como no codificantes del genoma y son más abundantes que los microsatélites, lo que permite desarrollar mapas genéticos más densos y obtener una cobertura genómica de alta resolución. Además, debido a su naturaleza bialélica, poseen una nomenclatura e interpretación más simples, facilitando la automatización del genotipado (Vignal et al.,2002). Los SNP, también pueden ser identificados mediante secuenciación de ADN asociada a un sitio de restricción (RADseq), esta técnica funciona generando miles de pequeñas secuencias homólogas entre individuos que posteriormente son secuenciadas masivamente para detectar las variaciones nucleotídicas, sin necesidad de conocer el genoma completo del organismo (Sunde et al.,2020).

Sin embargo, los microsatélites siguen siendo muy útiles en estudios de menor alcance, porque cada marcador es altamente informativo debido a su naturaleza multialélica y alta heterocigosidad (Ellegren, 2000). Sunde et al. (2020) describieron para la especie *Northern pike* que 10 *loci* SSR fueron suficientes para detectar diferenciación poblacional significativa similares a los obtenidos con 1,580 - 1,670 SNP obtenidos por RADseq. Además, los microsatélites requieren menos procesamiento bioinformático y un menor volumen de datos que RADseq, lo que los convierte en una técnica más práctica y económica para proyectos pequeños o estudios donde no se necesita resolución genómica extremadamente fina (Sunde et al.,2020).

2.3.7 DISEÑO DE CEBADORES

Los cebadores *in vitro* son oligonucleótidos de simple hebra de ADN que definen la especificidad del amplicón. Por lo tanto, su diseño es de gran importancia para poder amplificar los *loci* microsatélites por PCR (por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*).

Para el diseño *in silico* de los cebadores, se debe conocer la secuencia del genoma completo de interés o al menos las regiones flanqueantes de los microsatélites, con el fin de identificar las secuencias complementarias adecuadas para el anclaje de los cebadores. Esta información puede obtenerse a partir de bases de datos genómicas como GenBank, perteneciente a los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH), donde se encuentran disponibles secuencias genómicas de numerosos organismos.

Los cebadores pueden diseñase utilizando herramientas del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), específicamente a través Primer-BLAST, al cual se accede en la sección "*Primers* de selección" dentro del panel “Analiza esta secuencia” del NCBI. Esta plataforma integra algoritmos de diseño de cebadores basados en Primer3 y validación de especificidad mediante BLAST (Álvarez, 2013). También, existen otras herramientas de diseño de cebadores, por ejemplo, Primer3Plus, OLIGO y Vecto NTI ®.

Para garantizar la eficiencia y especificidad de un producto amplificado, los cebadores deben cumplir con los siguientes parámetros: 1) La secuencia en el extremo 3’ requiere un apareamiento de bases perfecto, debido a que la ADN polimerasa extiende la cadena a partir del grupo OH; por lo tanto, se deben evitar desajustes en las últimas bases del extremo 3’, así como secuencias de tres o más G/C consecutivas, ya que, pueden generar uniones con alta estabilidad debido a los puentes de hidrógeno y favorecer la probabilidad de hibridaciones parciales o inespecíficas generando productos no deseados; 2) evitar la complementariedad de secuencias entre los cebadores, dado que, podrían formar estructuras secundarias internas (*hairpin*) o dímeros que disminuyen la especificidad y el rendimiento; 3) la longitud puede ser de 18 a 24 nt, ya que, cuanto más corto sea el cebador será más rápida su hibridación con la cadena molde y menor su especificidad; 4) el contenido de G/C debe ser del 40 a 60 %, porque una concentración menor de G/C es propensa a presentar una temperatura de fusión (T_m) muy baja y podría afectar la hibridación o incluso no hibridar; 5) la temperatura de fusión debe estar entre 55 y 65 °C, y no puede haber una diferencia de más 5 °C entre las T_m de los cebadores *Forward* y *Reverse* (Dieffenbach et al., 1993; © QIAGEN, 2013).

Obtención de microsatélites

Método clásico

En el caso en que no se encuentre el genoma completo de interés en la base de datos, se pueden aislar las regiones microsatélites mediante sondas en librerías genómicas. Primero se extrae el ADN genómico con alta pureza. Posteriormente se digieren con enzimas de restricción el ADN y un vector para que ambos presenten extremos iguales, preferiblemente cohesivos, que permitan la inserción del fragmento de interés en el plásmido. El vector es tratado anteriormente con fosfatasa alcalina para evitar su autoligación. Una vez obtenido el plásmido recombinante, se transforman en bacterias competentes, mediante *shock* térmico o electroporación. Luego se realiza *screening* o una réplica de la placa original sobre una membrana de *nylon* que contiene las sondas marcadas para secuencias repetitivas que pueden contener biotina. Por último, se cultivan las colonias con coloración positiva y se realiza la extracción del plásmido para su secuenciación. Finalmente, se procede al diseño de los cebadores (Rassmann et al., 1991; Zane et al., 2002).

Método basado en secuenciación de próxima generación (NGS)

Actualmente, la obtención de microsatélites mediante NGS permite su identificación más rápida y eficiente sin necesidad de un genoma de referencia completo. En primer lugar, se realiza la extracción de ADN genómico de alta calidad, el cual es fragmentado para la construcción de librerías de secuenciación. Dependiendo de la plataforma utilizada, como la pirosecuenciación Roche 454, actualmente descontinuada pero ampliamente utilizada en los primeros estudios de desarrollo de microsatélites por NGS (Schoebel et al., 2013), o tecnologías de síntesis como *Illumina sequencing*, estos fragmentos son amplificados y secuenciados masivamente, generando entre miles y millones de lecturas cortas. En algunos casos, previo a la secuenciación, se incorpora un paso de enriquecimiento de microsatélites mediante sondas específicas que incrementan la proporción de secuencias con repeticiones, optimizando su detección (Zalapa et al., 2012).

Posteriormente, las lecturas obtenidas son procesadas mediante análisis bioinformático, que incluye control de calidad, ensamblaje opcional de lecturas y la identificación *in silico* de microsatélites utilizando programas especializados. Herramientas como MISA, QDD y MSATCOMMANDER permiten detectar repeticiones en tándem y extraer las regiones flanqueantes necesarias para el diseño de *primers* (Vieira et al., 2016; Beier et al., 2017; Meglécz

et al., 2010; Faircloth, 2008). A partir de estas secuencias, se emplean programas como Primer3 para generar automáticamente cebadores específicos que posteriormente son validados mediante PCR.

Además, del uso de ADN genómico, los microsatélites, también pueden obtenerse a partir de datos transcriptómicos mediante RNA-seq, lo que permite identificar SSRs expresados (EST-SSRs). En este enfoque, el ARN es extraído, convertido a ADNc (ADN complementario) y secuenciado, generando lecturas que representan genes expresados. Estas secuencias son analizadas de manera similar para identificar repeticiones y diseñar *primers*, con la ventaja de que los marcadores pueden estar asociados a funciones génicas, aunque con menor nivel de polimorfismo en comparación con SSRs genómicos (Taheri et al., 2018).

2.3.8 GENOTIPIFICACIÓN

En la década de 1980, el análisis y la genotipificación de polimorfismos microsatélites fue más sencillo, gracias a la técnica molecular reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Kary Mullis (Litt & Luty, 1989; Ellegren, 2004). Que permite amplificar *in vitro* las regiones repetidas y verificar el tamaño por electroforesis de gel agarosa o poliacrilamida y electroforesis capilar fluorescente (Vieira, et al., 2016).

Marcaje fluorescente

Actualmente, el uso de cebadores marcados con fluorocromos y cebadores universales se ha vuelto una técnica común y económica para genotipificar los *loci* microsatélites (Schuelke, 2000).

La reacción se realiza por PCR convencional y requiere de un cebador *Reverse*, un cebador universal M13(-21) marcado con fluorocromos como 6-carboxi-fluo-rescina (FAM) y un cebador *Forward* de la secuencia de interés con una secuencia de extensión o “cola” que sea complementaria al cebador universal, como la del del fago M13(-21) (5’ TGT AAA ACG GCC AGT 3’) en el extremo 5’ o la secuencia CAG (Fig. 3).

En los primeros ciclos de PCR el cebador *Forward* con cola M13(-21) se incorpora a los productos de PCR. Cuando este cebador se agota, la temperatura *melting* cambia a 53 °C para facilitar la unión del cebador universal M13(-21) al producto amplificado. Por último, el producto final

etiquetado se puede analizar por electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser (CE-LIF).

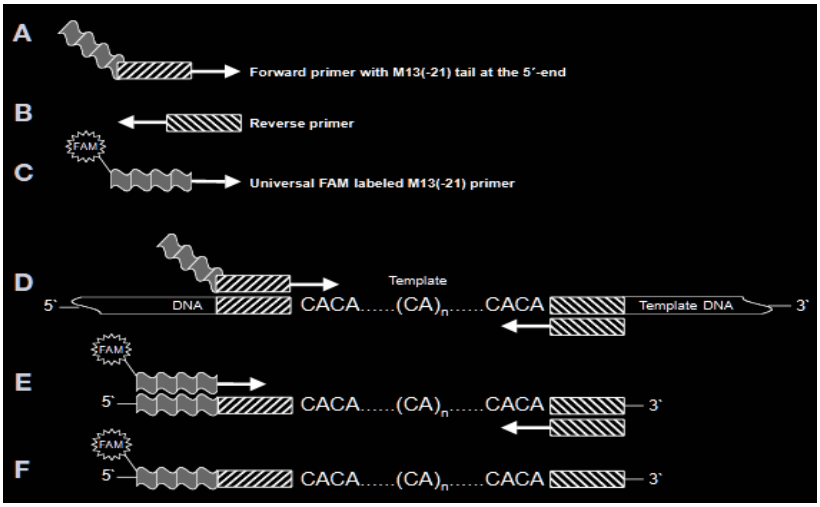


Figura 3. Marcaje fluorescente con un cebador universal. (A) Cebador *forward* con secuencia M13(-21) en 5'; (B) Cebador *Reverse*; (C) Cebador universal M13(-21) con fluorocromo; (D, E, F) Apareamiento de cebadores durante la PCR. Tomado de Schuelke (2000)

Análisis multiplex

La primera corresponde a la PCR multiplex, en la cual diferentes pares de cebadores SSR se incorporan en un mismo tubo de reacción. Para ello, es necesario determinar previamente el rango de tamaño de los alelos de cada locus, evitando superposición entre fragmentos, además, de verificar *in silico* que todos los cebadores presenten temperaturas de fusión similares y una baja probabilidad de formación de estructuras secundarias o dímeros, permitiendo su amplificación simultánea en una sola reacción de PCR. La segunda corresponde a la genotipificación multiplexada, donde cada locus se amplifica por separado mediante PCR individual; posteriormente, los amplicones obtenidos se mezclan y se analizan conjuntamente en un mismo canal de electroforesis capilar (Vieira et al., 2016).

Errores de genotipificación

Los errores de genotipificación pueden deberse a errores vinculados a la propia secuencia de ADN, baja calidad o cantidad de ADN, artefactos bioquímicos y factores humanos (Pompanon et al., 2005). Dentro de los errores debidos a la propia secuencia de ADN se encuentran los alelos nulos y la homoplasia de tamaño. Como se mencionó anteriormente, lo alelos nulos ocurren cuando mutaciones puntuales en las regiones flanqueantes impiden la unión del cebador, haciendo que un alelo no amplifique y el individuo heterocigoto sea clasificado erróneamente

como homocigoto, inflando su estimación en la población. La homoplasia de tamaño ocurre cuando dos alelos de origen evolutivo independiente presentan el mismo tamaño, siendo tratados como idénticos y subestimando así la diversidad genética real (Jarne & Lagoda, 1996).

Las bajas concentraciones de ADN pueden ocasionar *allelic dropout*, es decir, la pérdida estocástica de un alelo durante la amplificación. Este fenómeno ha sido descrito principalmente en estudios con muestras no invasivas de mamíferos (heces, pelo), donde concentraciones inferiores a 56 pg/µL representan un umbral crítico (Taberlet et al., 1996). Wang et al. (2012) explican que el *allelic dropout* puede producirse en dos etapas del proceso de genotipificación: 1) durante la preparación de la muestra, cuando una copia alélica está presente en cantidad insuficiente para ser amplificada; y 2) durante la amplificación por PCR, debido a fallas en la unión de los cebadores o de la ADN polimerasa al molde.

Asimismo, la Taq polimerasa puede añadir de forma inespecífica una adenina en el extremo 3' del producto de PCR (artefacto +A), generando un doble pico por alelo en el electroferograma y produciendo ruido de fondo que dificulta la interpretación de los genotipos (Pompanon et al., 2005).

2.4 GENERALIDADES DE *PETROLISTHES ARMATUS*

En esta sección se describe la clasificación taxonómica, el ciclo de vida, hábitat y la distribución geográfica de la especie de estudio, *Petrolisthes armatus*.

2.4.1 TAXONOMÍA DE *PETROLISTHES ARMATUS*

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *P. armatus*

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Subfilo	Crustacea
Clase	Malacostraca
Subclase	Eumalacostraca
Superorden	Eucarida
Orden	Decapoda

Suborden	Pleocyemata
Infraorden	Anomura
Familia	Porcellanidae
Género	*Petrolisthes*
Especie	*armatus*

La especie fue descrita originalmente como *Porcellana armata* por Gibbes (1850) y posteriormente transferida al género *Petrolisthes* por Stimpson (1858), quien estableció la combinación actualmente válida de *Petrolisthes armatus*.

Dentro de la sinonimia de la especie se incluye, *Porcellana digitalis* por Heller (1862) *Porcellana gundlachii* por Guérin-Méneville (1855), *Porcellana leporina* por Heller (1862), así como *Petrolisthes similis* por Henderson (1888), *Petrolisthes iheringi* por Ortmann (1897), *Petrolisthes armatus* var. *pallidus* por Verrill (1908) y *Petrochirus lamarcki machadoensi* por Bott (1964) los cuales actualmente son considerados sinónimos (Registro Mundial de Especies Marinas WoRMS; Osawa & McLaughlin, 2010).

2.4.2 CICLO DE VIDA DE *PETROLISTHES ARMATUS*

El ciclo de vida de *Petrolisthes armatus* inicia con la eclosión de los huevos los cuales se mantienen fijados a los pleópodos de la madre. Gore (1970) describe que la fase planctónica dura aproximadamente 2 semanas bajo condiciones de laboratorio. Primeramente, *P. armatus* eclosiona como prezoea, una etapa transitoria que dura aproximadamente una hora. Posteriormente, la larva muda a la primera etapa zoea (Zoea I), con una longitud aproximada de 1,6 mm, caracterizada por una espina rostral alargada y una espina caudal curvada (Fig. 4A). En esta fase se inicia la alimentación activa mediante los apéndices bucales y los dos primeros maxilípedos con setas natatorias, mientras que, el maxilípedo 3 y los pereópodos se encuentran aún como yemas indiferenciadas. En la segunda etapa zoea (Zoea II), la larva alcanza alrededor de 2,0 mm, con un rostro aproximadamente cinco veces más largo que el caparazón y ojos móviles; en esta fase continúa el desarrollo morfológico hacia una forma más cercana a la vida bentónica (Fig. 4B). Posteriormente, en la etapa megalopa, la larva presenta una apariencia similar a un cangrejo juvenil, con una longitud cercana a 1,5 mm y un ancho de 1,2 mm, ojos proporcionalmente más grandes y desarrollo completo de quelas, patas caminadoras y

pleópodos (Fig. 4C) Esta etapa representa el asentamiento y preparación para la vida bentónica adulta (Fig. 5) (Gore, 1970).



Figura 4. Etapas larvales de *Petrolisthes armatus*. (A), Zoea I; (B) Zoea II;(C) Megalopa
Tomado de Gore (1970)



1.5 cm

Figura 5. Ejemplar macho adulto de *Petrolisthes armatus*

2.4.3 HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE *PETROLISTHES ARMATUS*

El cangrejo de porcelana verde *Petrolisthes armatus* (Gibbes, 1850) es una especie de crustáceo decápodo que habita principalmente zonas intermareales rocosas del océano Pacífico Oriental Tropical (POT) y del océano Atlántico Occidental (AtOcc) y Oriental (AtOri). En el POT la especie se distribuye desde la parte norte del Golfo de California hasta Perú, pero no se ha observado en las islas oceánicas. Su distribución nativa en el AtOcc se extiende desde Carolina del Norte hasta la costa sur de Brasil. En el Atlántico Oriental, la distribución de esta especie se extiende desde Senegal hasta Angola (Hiller & Lessios, 2017).

En ambas costas americanas esta especie se ha reportado con amplio rango ecológico, en hábitats difíciles como bajo piedras, en bancos de ostras y mejillones, en raíces de manglares,

corales, esponjas y pilotes de muelles (Hiller & Lessios, 2017). Asimismo, se ha encontrado en el fondo rocoso y arenoso a 18 m de profundidad en las costas americanas (Haig, 1960) hasta 30 m de profundidad en el Atlántico Oriental (Chace, 1956).

En el Pacífico panameño, *P. armatus* constituye la especie de porcelánido dominante en el intermareal rocoso, alcanzando densidades de hasta 20 individuos por metro cuadrado (Gore & Abele, 1976; Hiller & Lessios, 2017).

La capacidad de esta especie para tolerar variaciones ambientales como salinidad y temperatura (Gore & Abele,1976; Canning-Clode et al., 2011), le ha permitido establecerse exitosamente en diversos ambientes costeros. En su filogeografía de la especie Hiller & Lessios (2017) identificaron dos clados principales en el Atlántico occidental: el clado Noroccidental, que agrupa las poblaciones de Florida, Georgia y Carolina del Sur, y el clado Suroccidental que agrupa las poblaciones desde Yucatán hasta Brasil pasando por el Caribe. Hasta principios de los años 1990 el rango de *P. armatus* en el AtOcc no se extendía hasta el norte de Cabo Cañaveral (Gore & Abele, 1976). La expansión hacia las costas de Georgia y Carolina del Sur fue muy probablemente facilitada por el transporte humano de ostras (*Crassostrea virginica*) desde el Golfo de México hacia la costa atlántica durante los años 1960, trayendo consigo grandes cantidades de individuos de esta especie que habitaban esas camas de ostras. Una vez establecida, la especie pudo sobrevivir y asentarse exitosamente gracias a su plasticidad para tolerar nuevos ambientes, lo que la ha caracterizado como especie invasora (Hiller & Lessios, 2017).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestreo y selección

3.1.1 Genética de poblaciones

Para las pruebas de genética poblacional, se seleccionaron 16 muestras de ADN de individuos adultos de *Petrolisthes armatus* del banco de ADN de crustáceos de la familia Porcellanidae de la Dra. Hiller. Las muestras provienen de distintas localidades a lo largo de la costa Pacífica de América: México, Golfo de California (n = 2); Panamá, Naos y Miraflores (n = 6); Colombia, Bahía Málaga (n = 5) y Ecuador, Salinas (n = 3).

3.1.2 Paternidad múltiple

Para la prueba de paternidad múltiple, se recolectaron individuos adultos de *Petrolisthes armatus* en la zona intermareal de la Playa de los Cangrejos de Punta Culebra, Panamá, durante periodos de marea negativa, entre los meses de abril y agosto de 2025 (Anexo A; B). Los cangrejos se almacenaron en neveras portátiles con agua de mar y un pedazo de malla que le da superficie de agarre a los cangrejos y facilita su manipulación.

En el laboratorio húmedo se sexaron los individuos. Este procedimiento consistió en levantar el abdomen de los cangrejos con el fin de distinguir los pleópodos femeninos de los masculinos (Anexo C) y en el caso de ver huevos en las hembras, estás se separaron y se colocaron independientemente en balones de vidrio de 1 000 ml con agua de la bahía de Panamá filtrada y purificada, manteniéndose a temperatura ambiente hasta la eclosión de las larvas (Anexo D). Durante este periodo, se les suministraron larvas nauplias de *Artemia sp.* en horas de la mañana para su alimentación y el agua fue cambiada durante la tarde. El tiempo hasta la eclosión varió dependiendo del estado de desarrollo de los embriones al momento de la recolección, ocurriendo desde la misma noche de captura hasta aproximadamente una semana después.

Luego de la eclosión, en el laboratorio molecular se seleccionaron bajo el estereoscopio entre 8-12 larvas por madre, las cuales fueron posteriormente preservadas en etanol absoluto (Anexo E).

3.2 Extracción de ADN

Luego del muestreo, se tomaron muestras del tejido blando de una quela y de las branquias de cada madre. Posteriormente, se realizaron las extracciones de ADN utilizando el kit comercial DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones específicas del fabricante para la extracción de ADN de sangre y tejido (Anexo F).

Las nidadas correspondientes de las madres 1, 2 y 3 se dividieron en dos grupos con el fin de evaluar dos protocolos de extracción de ADN en larvas de crustáceos: (1) un método comercial utilizando el kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN) (2) un método de extracción simple basado en proteinasa K e incubación. El método comercial, aunque más costoso, produce ADN de mayor pureza; en contraste, el método basado en proteinasa K es más económico, pero genera ADN con impurezas debido a la ausencia de pasos de purificación. El objetivo fue comparar ambos métodos y seleccionar un protocolo replicable y económicamente viable para la posterior amplificación de regiones microsatélite mediante PCR convencional. Para ambos protocolos se utilizaron los cuerpos completos de las larvas.

Para el método de extracción simple con proteinasa K se le añadieron 20 µl de *buffer* y 5 µl de proteinasa K (5µg/ml) a cada tubo de 0.65 ml conteniendo una larva sin etanol absoluto. Posteriormente, las muestras se incubaron en un termociclador bajo el siguiente programa: 65 °C durante 35 min, 95 °C durante 5 min y 4 °C durante 10 min, siguiendo el protocolo para microsatélites del laboratorio del Dr. Lessios en las instalaciones de STRI.

Optimización del protocolo de lisado del método comercial en larvas de P. armatus

Aparte, se utilizaron 33 embriones adicionales para optimizar el protocolo de lisis del kit comercial DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) en larvas de crustáceos, modificando específicamente el paso de digestión con proteinasa K. En lugar de realizar la incubación en baño María con vórtex manual, se empleó un Eppendorf Thermomixer R a 1 400 rpm durante 3 horas a 56 °C. Posteriormente, se siguieron las instrucciones del método de extracción según el fabricante (Anexo F).

Finalmente, se midió la concentración de todas las muestras utilizando el espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop One. Cabe destacar que estas muestras se utilizaron exclusivamente

para la optimización del protocolo y no se incluyeron en los ensayos de genética de poblaciones y paternidad.

Los resultados obtenidos se compararon con las extracciones realizadas mediante el kit DNeasy® en larvas sin modificaciones en el protocolo, correspondientes a las nidadas de las madres 1, 2 y 3.

3.3 Estandarización de la temperatura de alineamiento Ta (°C)

La temperatura de alineamiento Ta (°C) se estandarizó mediante PCR estándar. Se evaluaron 14 pares de cebadores flanqueantes de regiones microsatélites polimórficas previamente desarrollados para *Petrolisthes armatus*. Para cada par de cebadores se calculó la temperatura de fusión promedio Tm (°C) entre los cebadores *Forward* y *Reverse*. Cuando no se logró estandarizar la Ta de un cebador bajo estas condiciones, se utilizó la Tm más baja entre ambos cebadores, siguiendo el protocolo para microsatélites del laboratorio del Dr. Lessios en las instalaciones del STRI.

Para las reacciones de PCR se empleó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 11.35 µl: 5 µl de ddH2O, 2.5 µl de GoTaq *Buffer* (5x), 1.25 µl de MgCl2, 1.25 µl de dNTPs, 0.625 µl de cada cebador *Forward* y *Reverse* a una concentración de 10µM y 0.1 µl de GoTaq®.

Los volúmenes de los reactivos se ajustaron de acuerdo al número total de muestras a procesar. La mezcla maestra (*Master Mix*) se preparó en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Para cada reacción se utilizaron 11.35 µl de *Master Mix* y 1 µl de ADN en tubos para PCR.

Finalmente, se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 94 °C durante 1 min; seguida de 39 ciclos de 94 °C durante 30 s, temperatura de alineamiento que se estaba probando (Ta°C) durante 45 s y extensión a 72 °C durante 1 min 30 s; con una extensión final a 72 °C durante 10 min y una etapa final a 10 °C.

3.4 Electroforesis en gel de agarosa y Metaphor™

El tamaño y la intensidad de los productos de PCR se documentaron después de adicionar 1.8 µl de *loading buffer* a 3 µl de cada producto de PCR y correrlos por electroforesis a 100 V y 31

Amp durante 1 h, después de pipetearlos en los pozos de un gel de agarosa al 1.5 %, preparado con *buffer* TBE 0.5x, teñido con GelRed. El tamaño de los amplicones se estimó comparando las bandas obtenidas con un marcador de peso molecular de 1 kb. Las muestras se visualizaron y fotografiaron en el gel con un transiluminador UV conectado a una cámara e impresora fotográfica. Posteriormente, para evaluar el polimorfismo de los fragmentos amplificados, se realizó el mismo proceso anterior en un gel de agarosa MetaPhor™ al 4 % en *buffer* TBE 0.5× sometido a electroforesis a 100 V y 31 Amp durante 3 h.

3.5 Genotipificación

Marcaje fluorescente

Con las temperaturas de alineamiento determinadas, se procedió al marcaje fluorescente de cada locus microsatélite mediante el método económico de Schuelke (2000), descrito en el marco teórico.

La mezcla de reacción para PCR estuvo compuesta por 2.4 µl de *buffer Colorless* 5×, 1.2 µl de $MgCl_2$ [25 mM], 1.2 µl de dNTPs, 0.036 µl del cebador *Forward* [10 µM] con una cola CAG (CAGTCGGGCGTCATC), 0.6 µl del cebador *Reverse* [10 µM], 0.6 µl del cebador universal con una cola complementaria a la secuencia CAG [10 µM] marcado con un fluoróforo o tinte (FAM, azul; VIC, verde; NED, amarillo; PET, rojo; Applied Biosystems), 0.06 µl de Taq polimerasa y 1 µl de ADN.

Posteriormente, se utilizaron las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min; seguida de 14 ciclos de 95 °C durante 20 s, temperatura de alineamiento (Ta) durante 20 s y extensión a 72 °C durante 20 s; posteriormente, 24 ciclos de 95 °C durante 20 s, 52 °C durante 20 s y 72 °C durante 20 s; con una extensión final a 72 °C durante 5 min y una etapa final de mantenimiento a 10 °C.

La temperatura de alineamiento utilizada en los primeros 14 ciclos varía dependiendo de la temperatura óptima determinada previamente en los ensayos de estandarización de los distintos pares de cebadores.

Finalmente, se mezclaron 2 µl del producto amplificado con 10 µl de formamida y 0.35 µl del estándar interno GeneScan 500 LIZ Size Standard. Las muestras se analizaron mediante

electroforesis capilar con detección fluorescente inducida por láser (CE-LIF) en el analizador genético ABI 3500xl Genetic Analyzer.

3.6 Análisis bioinformático

Los electroferogramas obtenidos mediante electroforesis capilar fueron analizados con el *software* Geneious Prime (Kearse et al., 2012). Posteriormente, los genotipos fueron organizados en matrices de datos en Microsoft Excel y analizados en el entorno de programación Rstudio utilizando el lenguaje R.

Procesamiento de datos para los ensayos de genética poblacional

Los análisis de genética de poblaciones se realizaron en el lenguaje R mediante los paquetes readxl, magrittr, adegenet, pegas, poppr, ade4.

Los genotipos de microsatélites fueron convertidos a un objeto genético de tipo *genind* mediante la función df2*genind* del paquete adegenet, especificando una ploidía diploide.

Posteriormente, se realizaron los análisis de caracterización alélicas de los *loci*. Se calculó el número de alelos observados y el índice de diversidad genética basado en 1 − D de Simpson para cada marcador. El índice de Simpson es robusto frente a la presencia de alelos raros, ya que, es más sensible a la frecuencia de los alelos comunes y menos influenciado por alelos de baja frecuencia. Posteriormente, se estimó la equidad (*evenness*) de Simpson para evaluar la uniformidad en la distribución de los alelos; y se evaluó el equilibrio de Hardy–Weinberg para cada locus mediante pruebas exactas y chi-cuadrado (χ^2) implementadas en el paquete *pegas* en R.

Por último, se realizó una prueba del desequilibrio de ligamiento de manera independiente para cada población mediante el índice de asociación (Ia) y el índice estandarizado de asociación ($\bar{r}_{D,}$), utilizando el paquete poppr. Los análisis se realizaron a partir de objetos genéticos manejados con el paquete adegenet. La significancia estadística de ambos índices se determinó mediante 999 permutaciones aleatorias.

Procesamiento de datos para el ensayo de paternidad múltiple

La matriz de datos fue importada mediante el paquete readxl y posteriormente procesada para combinar los alelos correspondientes a cada locus microsatélite. Los genotipos fueron codificados utilizando el formato alelo/alelo para generar perfiles multilocus individuales.

Posteriormente, los datos fueron convertidos en un objeto genético de tipo *genind* mediante la función df2*genind* del paquete adegenet, especificando una ploidía diploide. A partir de este objeto se estimó el número de alelos observados por familia utilizando la función nAll() del paquete hierfstat. A parte, se realizó una reconstrucción de genotipos paternos por exclusión manual comparándolos con el genotipo conocido de la madre.

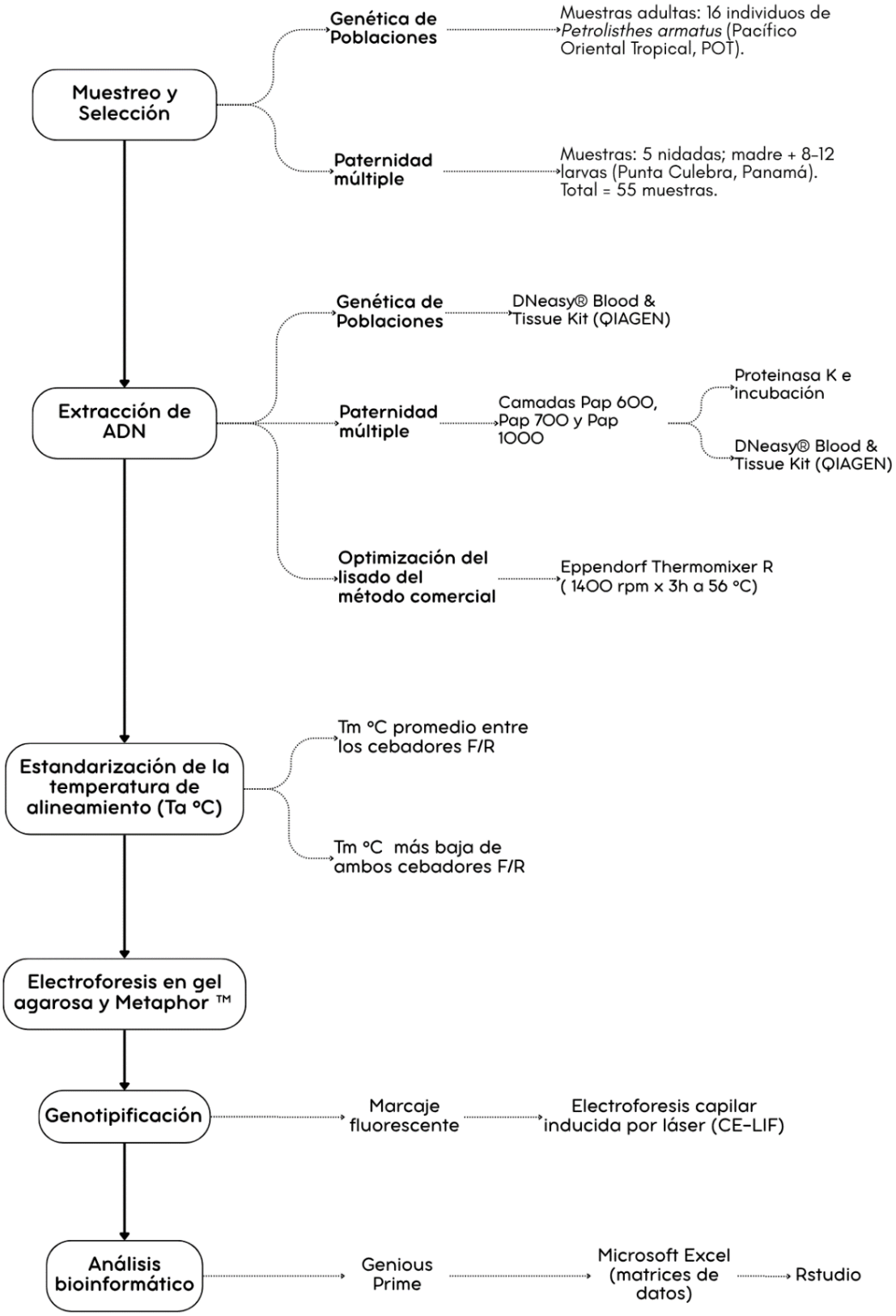


Figura 6. Esquema metodológico

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Extracción de ADN

Tabla 2. Comparación de métodos de extracción de ADN en larvas de *P. armatus*

Método	n	Concentración ng/uL		A260/280		A260/230	
		Mediana	Mín - máx	Mediana	Mín - máx	Mediana	Mín - máx
Proteinasa K	15	91.9	41 - 98.5	1.04	0.95 - 1.4	0.3	0.25 - 0.83
DNeasy® Blood & Tissue Kit	15	4.3	1.5 - 7.6	2.19	1.77 - 2.59	0.31	0.18 - 0.91
DNeasy® Blood & Tissue Kit + Thermomixer	19	6.6	3.9 - 11.2	1.9	1.76 - 2.0	0.54	0.28 - 0.99

Nota. PK: método de digestión simple con proteinasa K e incubación, sin etapas de purificación en columna. DNeasy® Blood & Tissue Kit: kit comercial con columnas de sílice (QIAGEN). DNeasy® + Thermomixer: modificación del proceso de lisado celular del kit mediante agitación mecánica continua a 1 400 rpm, 56 °C, 3 h. n: número de muestras. Los valores de referencia óptimos para ADN son A260/280 ≈ 1.8 y A260/230 ≈ 2.0–2.2 (Thermo Fisher Scientific, s.f.)

Comparación de métodos de extracción de ADN

Con el fin de evaluar la eficiencia de extracción de ADN en larvas de *P. armatus,* se compararon los valores de absorbancia y concentración en dos protocolos: el kit comercial DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) y un método basado en digestión simple con proteinasa K (PK) (Tabla 2; Anexo G).

Las extracciones mediante el método PK mostraron relaciones 260/280 entre 0.95 – 1.4 y relaciones 260/230 entre 0.25 – 0.83 (Tabla 2), valores que se sitúan por debajo de los rangos óptimos de referencia para ADN (260/280 ≈ 1.8; 260/230 ≈ 2.0–2.2), lo que indica contaminación por proteínas que absorben a 280 y compuestos orgánicos que absorben a 230 nm, respectivamente (Thermo Fisher Scientific, s.f.).

Estos resultados eran esperados, dado que el método PK se limita a la digestión enzimática del tejido sin incluir etapas de purificación mediante columnas de sílice ni lavados específicos para eliminar contaminantes. Si bien este procedimiento incrementa la coextracción de proteínas, polisacáridos y otros compuestos celulares que afectan los índices de pureza, también parece favorecer una mayor concentración de ADN en larvas de crustáceos. No obstante, dichas concentraciones deben interpretarse con cautela, ya que, la medición espectrofotométrica refleja

la absorbancia total del contenido del tubo y no la cantidad neta de ADN extraído, lo que implica una sobreestimación parcial del rendimiento real.

Las extracciones con el kit comercial presentaron relaciones 260/280 entre 1.77 – 2.59 y relaciones 260/230 entre 0.18 – 0.91 (Tabla 2). Los valores de 260/280 comprendidos entre 1.77–1.9 se consideran aceptables para ADN, mientras que, los valores superiores a 2.0, que en este caso alcanzaron 2.59, podrían reflejar degradación del ADN o contaminación por ARN (Thermo Fisher Scientific, s.f.). Las relaciones 260/230, que en algunos casos fueron incluso inferiores a las del método PK, sugieren la presencia de residuos de sales o etanol provenientes de los tampones del kit, cuya eliminación no fue completamente eficiente durante los pasos de lavado. Si bien el kit comercial produjo índices de pureza 260/280 superiores a los del método PK, las relaciones 260/230 de ambos métodos presentaron limitaciones comparables, lo que indica que el kit comercial no garantiza una eliminación completa de contaminantes para extracciones de larvas de crustáceos.

Además, la obtención de ADN en larvas de crustáceos puede verse limitada por la presencia de estructuras como la quitina y el carbonato de calcio del exoesqueleto, los que pueden dificultar la lisis celular y causar interferencia en las mediciones espectrofotométricas. Athanasio et al. (2016) señalaron que la quitina presenta un alto índice de refracción alrededor de 260 nm y dispersión anómala a longitudes de onda menores a 300 nm, lo que puede sobreestimar la concentración de ADN cuando se utilizan métodos basados en absorbancia. Por esta razón, estos autores recomendaron el uso de métodos de cuantificación basados en fluorescencia para obtener estimaciones más precisas en organismos con estructuras quitinosas, como *Daphnia magna*. Sin embargo, en el presente estudio no se aplicó este tipo de cuantificación debido a limitaciones presupuestarias.

La mejora de los índices de pureza requeriría la incorporación de pasos adicionales de purificación orientados a eliminar los residuos quitinosos y otros compuestos coextraídos que interfieren con las mediciones de absorbancia a 230 nm.

Sin embargo, estas relaciones de pureza subóptimas no comprometieron la viabilidad del ADN para amplificar y genotipificar los alelos (Fig. 12 y 13). Las muestras obtenidas mediante ambos métodos produjeron amplificaciones funcionales en los ensayos de PCR de *loci* microsatélites (Fig. 7 y 8). Esto sugiere que, a pesar de presentar menor pureza espectrofotométrica, el método

PK genera ADN funcional para PCR, constituyendo una posible alternativa metodológica de bajo costo para estudios genéticos con microsatélites en larvas de crustáceos.

Optimización del lisado celular

Se realizaron nuevas extracciones de larvas utilizando el mismo kit comercial DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN), modificando específicamente el paso de digestión con proteinasa K. Toonen (2004) empleó disrupción mecánica mediante micropistilos plásticos durante la extracción de ADN de larvas de *Petrolisthes cinctipes* para favorecer la ruptura tisular y la liberación del ADN, lo que sugiere que incorporar algún componente de disrupción mecánica es relevante en protocolos de extracción para larvas de crustáceos. Bajo este principio, en lugar de incubación en baño María con vórtex manual, se empleó un Eppendorf Thermomixer R a 1 400 rpm durante 3 horas a 56 °C, lo que permitió combinar incubación térmica constante con agitación mecánica continua.

Esta modificación se asoció con un aumento en la concentración de ADN obtenida, pasando de un rango previo de 1.5 – 7.6 ng/µl a 3.9 – 11.2 ng/µl (Tabla 2). Este incremento puede atribuirse a que la agitación constante a 1 400 rpm no solo favoreció la disrupción mecánica del tejido embrionario, también optimizó la cinética enzimática de la proteinasa K al mantener el sustrato en suspensión continúa, promoviendo así una liberación más eficiente del material genético. Las relaciones 260/280 se situaron entre 1.76 – 2.0, valores que indican una pureza aceptable respecto a contaminación proteica, siendo 1.8 el valor de referencia óptimo para ADN. Sin embargo, las relaciones 260/230 presentaron un rango de 0.28 – 0.99, notablemente por debajo del valor óptimo de 2.0 – 2.2, lo que sugiere nuevamente la presencia de contaminantes coextraídos, posiblemente sales del tampón de lisis o polisacáridos derivados de la estructura quitinosa, cuya eliminación no habría sido completamente eficiente durante los pasos de lavado del protocolo.

Estos resultados indican que la modificación del protocolo mejoró la eficiencia de lisis de forma generalizada. No obstante, la persistencia de valores 260/230 merece consideración, ya que, contaminantes coextraídos como polisacáridos o sales pueden, en ciertos contextos, interferir con la actividad de la ADN polimerasa durante la amplificación por PCR. Si bien en el presente estudio las amplificaciones para microsatélites fueron funcionales a pesar de los índices de pureza subóptimos (Figura 7 y 8), se recomienda considerar pasos adicionales de purificación

en aplicaciones con mayor sensibilidad a contaminantes, como secuenciación del genoma completo.

El subconjunto específico de larvas (muestras 20 - 33) quedó fuera de las comparaciones, debido a que estas muestras fueron sometidas a una modificación en el procedimiento: tras la digestión con proteinasa K, los lisados fueron almacenados temporalmente a −20 °C antes de continuar con el protocolo de purificación al día siguiente, lo que afectó las relaciones 260/280, que oscilaron entre 2.08 - 2.65 (Anexo H). Valores de 260/280 superiores a 2.0 suelen asociarse con la presencia de ARN residual.

2. **Estandarización de la temperatura de alineamiento Ta (°C) mediante PCR estándar**

Como se describió en la metodología, se realizaron ensayos de estandarización de la temperatura de alineamiento utilizando inicialmente el promedio teórico de Tm (°C) entre los cebadores *Forward* y *Reverse* para cada locus. En aquellos casos donde no se obtuvo amplificación eficiente bajo esta condición, se efectuó un segundo ensayo empleando la temperatura de alineamiento correspondiente al cebador con menor Tm (°C). Mediante este procedimiento se logró optimizar experimentalmente la temperatura de alineamiento específica para cada par de cebadores. A excepción del par 40F2R2, por lo tanto, quedó descartado del proyecto (Tabla 3).

Estos ensayos de estandarización se realizaron utilizando series de larvas de familias completas, lo que redujo el riesgo de falsas interpretaciones asociadas al uso de muestras individuales. En el gradiente de temperatura, una muestra seleccionada al azar podría presentar alelos nulos para el locus evaluado, generando ausencia de amplificación e interpretaciones erróneas sobre la eficiencia del locus o del protocolo. Por estas razones, el gradiente de temperatura no fue utilizado como método de estandarización de Ta (°C) evitando, además, la necesidad de correr múltiples reacciones por locus y por larva, lo que redujo el volumen de ADN consumido por muestra.

Tampoco se empleó el método *touchdown* debido a que este ajusta progresivamente la temperatura de hibridación a lo largo de los ciclos sin establecer un valor de Ta (°C) explícito, lo cual es incompatible con el protocolo de marcaje fluorescente con cebador universal CAG, que requiere una Ta fija para programar los 14 ciclos iniciales de la PCR de dos fases.

Tabla 3. Temperatura de alineamiento de cebadores microsatélites de *Petrolisthes armatus*

Cebadores	Secuencia	Tm °C	Ta °C	Producto esperado (bp)	Motif
	F2: GGGGAGGGATAATGGAGAAA	53.7			
Par 21	R2: CGTAGTCATCCACCCGTTCT	56.5	53	221 bp	(ga) 16
	F: TACCTGCGTGATGATGATGG	54.6			
Par 22	R: TCCCTAGAGATTGGCAGACG	56.1	55	205 bp	(tg) 61
	F: TGGGAGGAGACGACTGACAT	57.5			
Par 23	R: ATACAAACAAACACACGCAAGC	54.8	56	199 bp	(tg) 32
	F: GGAGAACGAGAGATGGAACG	54.9			
Par 24	R: TGCAACACCAATACACTATTATGC	53.7	54	186 bp	(ag) 25
	F: AGGCATGATGTTGGTGGTTT	53.7			
Par 25	R: TGACTTGAAGTGACAAAGGTGAA	54.6	53	196 bp	(gt) 41
	F: CAGGTAAGGGCCACACTCTT	56.9			(tc) 26
Par 26	R: CATGATGCAAGTTTAGGCTCA	53.2	53	238 bp	(ac)13
	F: CAGGGCGGTAATTGACTGTT	55.3			(ct)7-cc-
Par 29	R: TAATTTGGCCGTGAGACACA	54.4	54	166 bp	(ct)16
	F: CAGAGACACGACGGCACTTA	56.8			
Par 30	R: TTGAGGTCACTGCGATTTTG	53.4	53	177 bp	(ag) 26
	F: AAAATGCTGGCGTGAGAAAC	54.2			
Par 31	R: TTACTTCGCGTGCTTGATTG	53.6	53	151 bp	(ga) 23
	F: CCATCAGTTCCTCCCTGTCA	56.4			
Par 32	R: CTGTCTGCTCGGAACTTTGA	54.8	54	201 bp	(ca) 23
	F: AGTCGAGTTATGTTTTCGACAGA	53.9			
Par 33	R: ACTTTGCTAATCATGCAACGAG	53.8	54	176 bp	(ga) 16
	F: GAGGAGACTTGATTGAGGAGC	54.8			
Par 34	R: GAACTTGTGAGGTGCGACAG	56.1	54	153 bp	(gt)8-tt(gt)6
	F: AATCGCAACGCCAATCATAC	53.8			(ct) 13
Par 38	R: TGCCTTGAGGGTTGCATAAT	54.6	54	116 bp	*imperfect*
	F2: CTCATCTCAAACCTGGCAAGTA	54.6			
Par 40	R2: TTTGATGGTTATTTGCCTCAGA	52.4	NA	196 bp	

3. Electroforesis en gel agarosa y Metaphor ™

Gel de agarosa

Para todos los pares de cebadores se obtuvieron amplicones dentro del rango esperado de aproximadamente 200 pb en las muestras de larvas para análisis de paternidad múltiple (Fig. 7A y B) y en los individuos adultos de distintas localidades del Pacífico Oriental para el análisis de genética poblacional (Fig. 8).

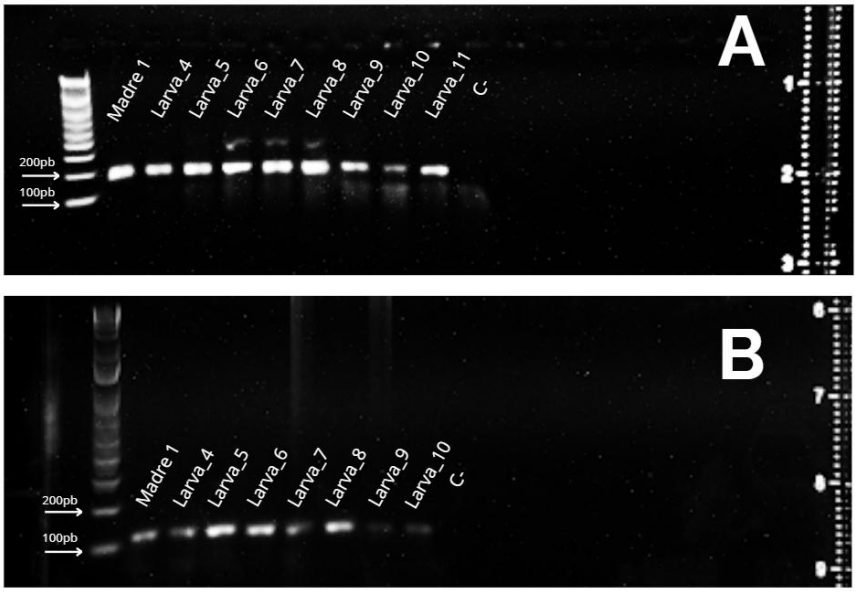


Figura 7. Gel de agarosa 1.5 % TBE. Muestras de la Madre 1 y su progenie. (A) Locus correspondiente al par de cebadores **34** (tamaño esperado ≈153 pb). (B): Locus correspondiente al par de cebadores **38** (tamaño esperado ≈116 pb).

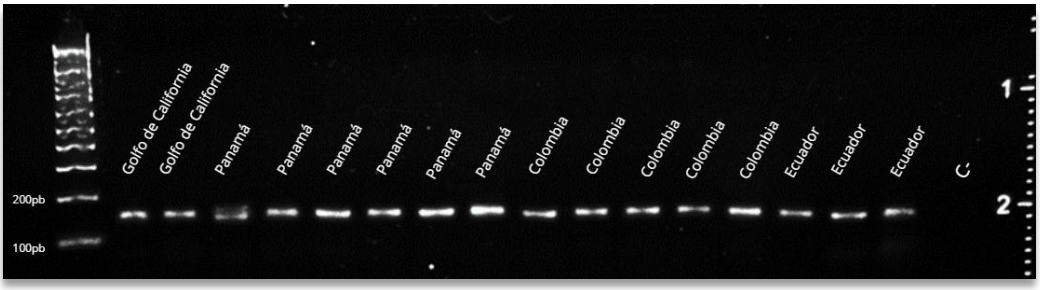


Figura 8. Gel de agarosa 1.5 % TBE. Muestras de individuos adultos de *Petrolisthes armatus* de distintas localidades del Pacífico Oriental. Locus correspondiente al par de cebadores **38** (tamaño esperado ≈116 pb). Se observa una sola banda amplificada por individuo, posible homocigosis.

Gel MetaPhor™

En las muestras correspondientes a larvas utilizadas para el ensayo de paternidad múltiple se observó generalmente una única banda para la mayoría de los *loci* en el Gel MetaPhor™ (Fig. 9B), lo que sugiere homocigotos para estos *loci*. No obstante, en el locus correspondiente al par de cebador 34 se observaron dos bandas de intensidad similar esperadas aproximadas a 153 pb, indicando individuos heterocigotos, a excepción de la muestra Larva_1, que mostró una única banda de mayor grosor e intensidad, compatible con un individuo homocigoto (Fig. 9A).

Adicionalmente, se evidenció una tercera banda de mayor peso molecular y con menor intensidad en la región superior del gel y presente exclusivamente en las muestras del par de cebador 34 con patrón heterocigoto, siendo ausente en la Larva_1 (Fig. 9A). Se sugiere que esta banda podría corresponder a un heterodúplex, es decir, una molécula de ADN de doble cadena formada por el apareamiento de hebras provenientes de alelos distintos durante la PCR. Estas estructuras pueden migrar más lentamente durante la electroforesis, generando bandas con un tamaño aparente mayor al esperado.

Kulibaba y Liashenko (2016), trabajando con microsatélites en líneas de pollos domésticos (*Gallus gallus*) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante (PAGE), describieron que los heterodúplex presentan una movilidad electroforética notablemente menor que los fragmentos objetivo y se forman exclusivamente en muestras heterocigotas. Así mismo, Jedrzejczak-Silicka et al. (2021), estudiando el polimorfismo de microsatélites de pentanucleótidos en el gen LDHA de palomas (*Columba livia*) mediante gel de agarosa de alta resolución, reportaron bandas adicionales por encima del producto esperado exclusivamente en heterocigotos; no obstante, en ambos casos dichas bandas se localizan cerca del producto esperado, a diferencia de lo observado en el presente estudio, donde la banda adicional se encuentra considerablemente por encima del tamaño esperado. Por esta razón, la interpretación de heterodúplex se plantea como una hipótesis y no como una conclusión definitiva.

La presencia de esta banda no compromete los resultados de genotipificación, dado que la electroforesis capilar discrimina los fragmentos por tamaño dentro del rango esperado, permitiendo descartar cualquier producto fuera de dicho rango.

Las muestras de individuos adultos destinadas al análisis de genética poblacional no fueron sometidas al Gel MetaPhor™ tras la verificación por gel de agarosa debido a restricciones de

tiempo, por lo que se procedió directamente a su genotipificación por marcaje fluorescente y detección mediante electroforesis capilar (CE-LIF).

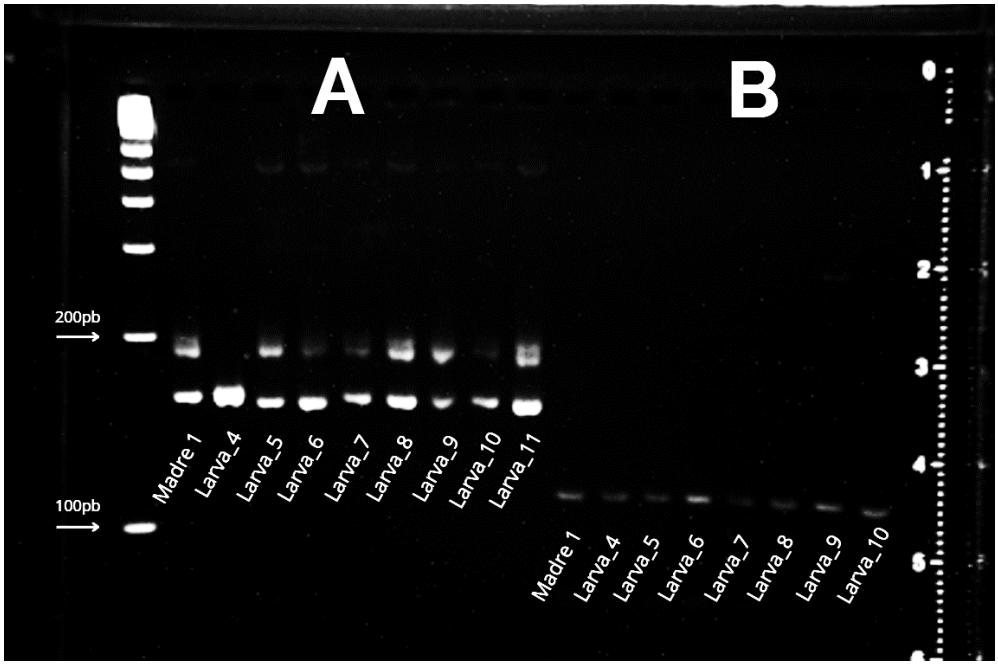


Figura 9. Gel MetaPhor™ 4 % TBE. Muestras de la Madre 1 y su progenie. (A) Locus correspondiente al par de cebadores 34 (tamaño esperado ≈153 pb). (B) Locus correspondiente al par de cebadores **38** (tamaño esperado ≈116 pb).

4. Análisis bioinformático

4.1 Electroferogramas

Tras el marcaje fluorescente de cada locus por muestra, los genotipos fueron obtenidos mediante electroforesis capilar con detección por fluorescencia inducida por láser (CE-LIF). Los electroferogramas fueron visualizados y analizados con el *software* Geneious Prime.

Debido a limitaciones presupuestarias, los *loci* Par21, Par24 y Par31 fueron excluidos del análisis por CE-LIF y no se incluyeron en los ensayos de genética de poblaciones ni de paternidad múltiple.

En el caso de los *loci* correspondientes a los pares de cebadores Par29 y 32, el análisis por CE-LIF reveló perfiles electroforéticos atípicos caracterizados por la presencia de múltiples picos de

baja intensidad distribuidos de manera irregular (Fig. 10) que presentaban una morfología difusa y poco consistente entre individuos. Por lo tanto, debido a la dificultad para asignar alelos de manera confiable, estos *loci* fueron excluidos del conjunto final de marcadores utilizados para genética poblacional y para el análisis de paternidad múltiple.

Por otro lado, los *loci* correspondientes a los pares de cebadores Par22, 25, 26, 30 y 33 presentaron perfiles con patrón típico de *"stutter"*(Miller & Yuan, 1997) en las larvas analizadas (Fig. 11). Debido a que este patrón dificulta la asignación precisa de alelos en análisis de parentesco, estos *loci* fueron descartados del conjunto de marcadores utilizados en el ensayo de paternidad múltiple.

Finalmente, el locus correspondiente al par de cebador 23 fue sometido a electroforesis capilar únicamente para el ensayo de paternidad múltiple y no para el análisis de genética poblacional, debido a limitaciones presupuestarias (Fig. 12).

Por lo tanto, para el análisis de genética poblacional se utilizaron los *loci* correspondientes a los pares de cebadores Par22, 25, 26, 30, 33, 34 y 38 (Figura 13), mientras que, para el ensayo de paternidad múltiple se emplearon los *loci* correspondientes a los pares Par23, 34 y 38.

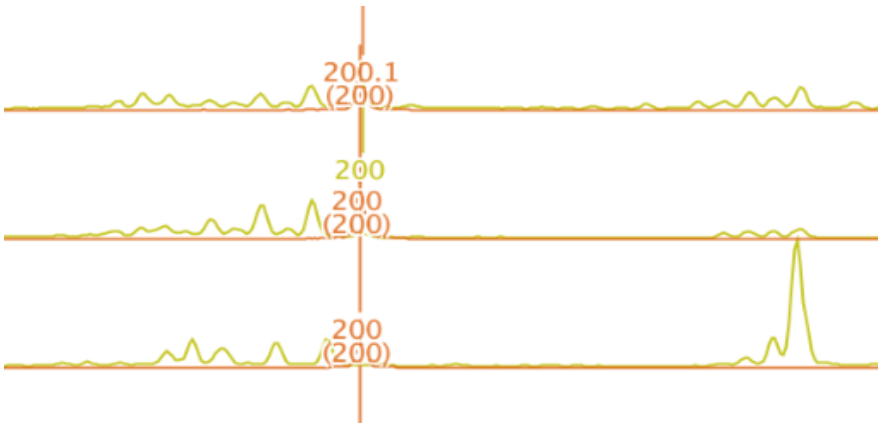


Figura 10. Electroferograma Par29-NED. Perfiles no interpretables para microsatélites. Muestras del ensayo para múltiple paternidad. La escalera de tamaño GeneScan 500 LIZ Size Standard (200 pb) se muestra en naranja.

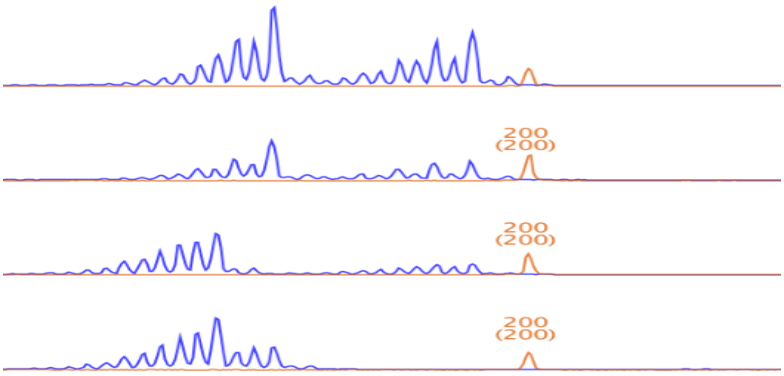


Figura 11. Electroferograma Par30-FAM. Perfiles con patrones "*stutter*". Muestras del ensayo para múltiple paternidad. La escalera de tamaño GeneScan 500 LIZ Size Standard (200 pb) se muestra en naranja.

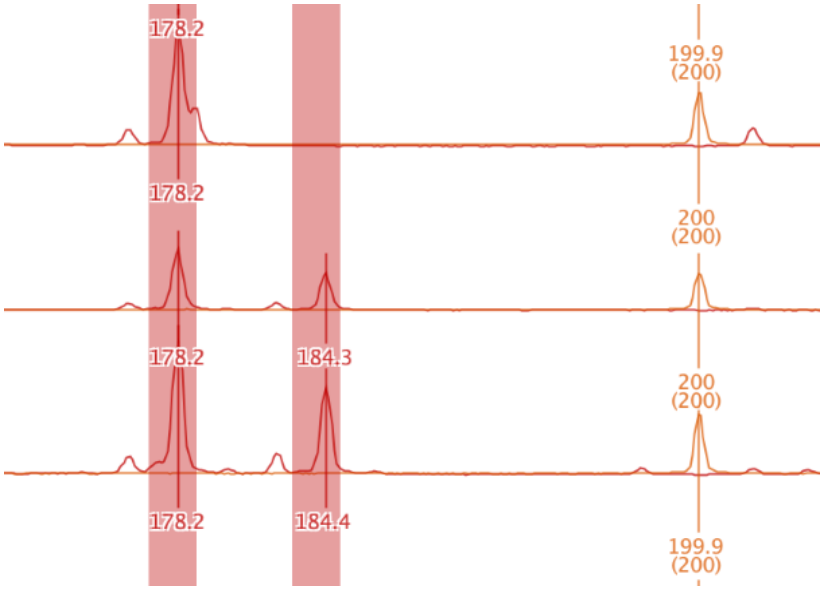


Figura 12. Electroferograma Par23-PET. Perfiles de alelos ideales para microsatélites. Muestras del ensayo para múltiple paternidad. La escalera de tamaño GeneScan 500 LIZ Size Standard (200 pb) se muestra en naranja.

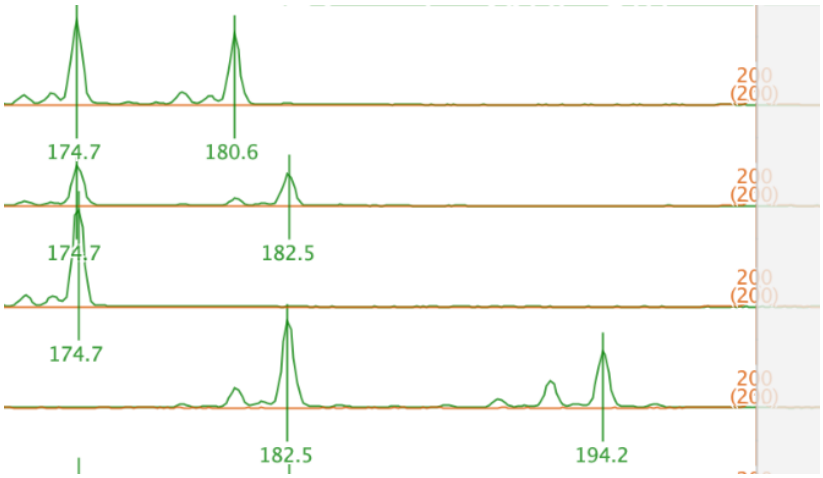


Figura 13. Electroferograma Par34-VIC. Perfiles de alelos ideales para microsatélites. Muestras del ensayo para genética poblacional. La escalera de tamaño GeneScan 500 LIZ Size Standard (200 pb) se muestra en naranja.

4.2 Genética de poblaciones

A partir de los genotipos obtenidos en Geneious Prime, se construyó una matriz de datos en Microsoft Excel con los tamaños alélicos de cada individuo por locus (Anexo I), la cual posteriormente fue procesada en RStudio para los análisis correspondientes de caracterización de marcadores para genética poblacional.

Los resultados presentados en esta sección deben interpretarse considerando el tamaño muestral reducido de todas las poblaciones analizadas como una limitante (Golfo de California n = 2, Panamá n = 6, Colombia n = 5, Ecuador n = 3). Tamaños muestrales pequeños pueden incrementar la varianza de los estimadores de diversidad y diferenciación genética, reduciendo su precisión y limitando la representatividad de las estimaciones obtenidas (Nei, 1987, Weir & Cockerham, 1984). No obstante, estos resultados permiten evidenciar preliminarmente la utilidad de estos marcadores en genética poblacional para su uso en estudios futuros con mayor tamaño muestral.

a. Caracterización general de *loci*

El análisis de caracterización general de los siete *loci* microsatélites empleados en este estudio evaluó el polimorfismo de los marcadores para las muestras del POT como una sola unidad poblacional (Tabla 4). El promedio de número alelos por locus fue de 7.86, confirmando un nivel

de polimorfismo adecuado para genética poblacional. El marcador L4 mostró el mayor número de alelos (14) y el valor más alto de diversidad de Simpson (1-D = 0.88) indicando un elevado poder discriminante y variabilidad genética. En contraste, L7 presentó el menor número de alelos (3) y valores más bajos de diversidad de Simpson (0.53), sugiriendo una menor variabilidad genética relativa. Sin embargo, este locus registró el mayor valor de *evenness* (0.89), indicando que sus alelos se encuentran distribuidos de manera relativamente equilibrada dentro de la muestra analizada.

Estos resultados sugieren que los *loci* analizados presentan un nivel de polimorfismo suficiente para detectar diversidad genética en las poblaciones estudiadas, por lo que podrían ser útiles en futuros estudios de genética poblacional con tamaños de muestra más amplios.

Tabla 4. Caracterización general de locus para genética poblacional en *P. armatus* del POT

Locus	Alelos	1-D	*Evenness*
L1	10.00	0.84	0.76
L2	7.00	0.72	0.72
L3	7.00	0.75	0.75
L4	14.00	0.88	0.76
L5	7.00	0.77	0.81
L6	7.00	0.71	0.70
L7	3.00	0.53	0.89
media	7.86	0.74	0.77

Nota. Alelos = número total de alelos por locus; 1-D = índice de diversidad de Simpson (valores cercanos a 1 indican mayor diversidad); Hexp = heterocigosidad esperada (diversidad genética esperada bajo equilibrio Hardy-Weinberg); *Evenness* = equitatividad en la distribución de frecuencias alélicas (valores cercanos a 1 indican distribución más equitativa entre alelos). L1–L7 corresponden a los *loci* microsatélites amplificados con los siguientes pares de cebadores: L1: Par22; L2: Par25; L3: Par26; L4: Par30; L5: Par33; L6: Par34; L7: Par38.

b. *Equilibrio de Hardy - Weinberg (HWE)*

La evaluación del equilibrio de Hardy - Weinberg en los *loci* del presente estudio se realizó considerando el conjunto total de individuos del POT como una sola unidad poblacional, con el objetivo de identificar desviaciones generales asociadas a los *loci* analizados (Tabla 5). Los

resultados obtenidos deben considerarse como preliminares, ya que, el tamaño muestral por localidad fue reducido, lo que habría limitado la robustez estadística de las pruebas si estas se hubiesen realizado de manera independiente.

Para el análisis se emplearon tanto la prueba de chi-cuadrado (χ^2) como la prueba exacta, siendo esta última la más adecuada para tamaños muestrales pequeños, debido a que no dependen de supuestos de normalidad y reducen la probabilidad de falsos positivos asociados al chi-cuadrado en muestras reducidas (Guo & Thompson, 1992; Selkoe & Toonen, 2006).

Según la prueba exacta, seis de los siete *loci* presentaron desviaciones significativas del equilibrio ($p < 0.05$): L1 ($p = 0.000$), L2 ($p = 0.002$), L3 ($p = 0.000$), L4 ($p = 0.000$), L6 ($p = 0.000$) y L7 ($p = 0.000$) lo que indica que las frecuencias genotípicas observadas no coinciden con las esperadas bajo equilibrio.

Estas desviaciones podrían explicarse por el tamaño de muestra reducido, asociación no aleatoria entre *loci* o la inclusión de individuos provenientes de poblaciones geográficamente distantes y potencialmente diferenciadas genéticamente. De acuerdo con la filogeografía mitocondrial de Hiller & Lessios (2017), las poblaciones del Pacífico oriental de Panamá y Golfo de California se encuentran diferenciadas de las de Colombia y Ecuador. La combinación de poblaciones con distintas frecuencias alélicas puede generar un déficit aparente de heterocigotos, fenómeno conocido como efecto Wahlund (Wahlund, 1928), independientemente del comportamiento real de los marcadores. Por lo tanto, las desviaciones observadas no deben interpretarse como indicadores de mal funcionamiento de los *loci*, endogamia o selección, sino como una posible consecuencia de la estructura genética entre las localidades muestreadas.

El locus L5 fue el único que no presentó desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg según la prueba exacta ($p = 0.219$), lo que indica un mayor ajuste entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas bajo equilibrio en comparación con los demás *loci* analizados. Esto podría sugerir que L5 fue menos sensible a los efectos derivados de la combinación de poblaciones potencialmente diferenciadas genéticamente dentro de la muestra analizada. Sin embargo, debido al reducido tamaño muestral y al carácter preliminar del estudio, esta interpretación debe considerarse con cautela.

Cabe destacar que la prueba de Hardy-Weinberg idealmente debe realizarse por locus dentro de cada población, dado que, la combinación de poblaciones genéticamente diferenciadas viola el supuesto de apareamiento no aleatorio. No obstante, el hecho de que la mayoría de los *loci* presentaran desviaciones coherentes con el efecto Wahlund podría indicar indirectamente que los marcadores están captando diferenciación poblacional. Por lo tanto, estos resultados tienen un valor interpretativo preliminar sobre la estructura genética de las poblaciones analizadas.

Tabla 5. Prueba de Hardy-Weinberg para locus microsatélites de *P. armatus* del POT

Locus	p exacto
L1	0.000
L2	0.002
L3	0.000
L4	0.000
L5	0.219
L6	0.000
L7	0.000

Nota. p exacto = valor de probabilidad de la prueba exacta de Fisher, recomendada para tamaños muestrales pequeños. El análisis se realizó combinando todos los individuos disponibles como una sola unidad poblacional. Valores de $p < 0.05$ indican desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg. L1–L7 corresponden a los loci microsatélites amplificados con los siguientes pares de cebadores: L1: Par 22; L2: Par 25; L3: Par 26; L4: Par 30; L5: Par 33; L6: Par 34; L7: Par 38.

a. ***Desequilibrio de ligamiento***

El desequilibrio de ligamiento entre marcadores fue evaluado de manera independiente para cada población. Dado los tamaños muestrales reducidos, se utilizó el índice de asociación estandarizado r̄D, el cual permite evaluar la asociación global entre *loci* (Tabla 6) (Brown et al. 1980; Agapow & Burt 2001).

En Colombia (n = 5), el índice multilocus fue negativo y no significativos (r̄D = −0.16, p = 0.991), sugiriendo ausencia de asociación significativa entre *loci* y un patrón compatible con segregación independiente. En Ecuador (n = 3) los valores fueron positivos, pero no significativos (r̄D = 0.10, p = 0.284) sugiriendo, también ausencia de asociación no aleatoria entre *loci*. Para el Golfo de California no fue posible obtener estimaciones debido a la insuficiente variación genética disponible con n = 2 (Tabla 6).

Panamá fue la única población que presentó valores significativos para ambos índices multilocus de desequilibrio de ligamiento (r̄D = 0.11, p = 0.044) (Tabla 6), lo que sugiere la posible presencia de asociación no aleatoria entre *loci* en esta localidad. No obstante, los valores de *p* obtenidos fueron cercanos al límite de significancia estadística, por lo que no se puede asumir con precisión un desequilibrio de ligamiento. Igualmente, el tamaño muestral reducido (n = 6) limita la potencia estadística del análisis y puede influir en la estimación de los índices, incrementando la probabilidad tanto de detectar asociaciones falsas como de sobreestimar la magnitud del desequilibrio de ligamiento. El patrón observado podría reflejar efectos de muestreo o estructura poblacional, más que un ligamiento físico entre *loci* (Agapow & Burt, 2001).

La ausencia de desequilibrio de ligamiento significativo en Ecuador y Colombia, y la baja magnitud detectada en Panamá, sugieren que los siete *loci* microsatélites descritos para *P. armatus* del POT se comportan de manera estadísticamente independiente entre sí dentro de cada población, lo que podría indicar que no están físicamente ligados y, por tanto, son informativos de forma independiente, lo cual los hace adecuados para análisis de genética poblacional. Esto sugiere, además, que las desviaciones de HWE observadas en el análisis global (Tabla 6) se explican mejor por el efecto Wahlund que por problemas técnicos con los marcadores. Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con cautela debido a los tamaños muestrales reducidos, que limitan la potencia estadística del análisis, pudiendo aumentar la variabilidad de las estimaciones y la probabilidad de no detectar asociaciones existentes entre *loci*.

Tabla 6. Desequilibrio de ligamiento entre *loci* de *P. armatus* del POT

Población	r̄D	*p-value*
Golfo de California	NA	NA
Panamá	0.11	0.044
Colombia	-0.16	0.991
Ecuador	0.10	0.284

Nota. r̄D = índice de asociación estandarizado; *p-value* = probabilidad obtenida mediante prueba de permutaciones. NA = dato no disponible por insuficiente variación genética (n = 2). Los valores de $p < 0.05$ indican desequilibrio de ligamiento significativo.

4.3 Paternidad múltiple

Como parte de la validación de los marcadores microsatélites, se evaluó su utilidad para estudios de paternidad múltiple en *Petrolisthes armatus*, utilizando muestras de hembras ovígeras y su progenie recolectada en Punta Culebra, Panamá. A partir de los genotipos obtenidos en Geneious Prime, se construyó una matriz de datos con los tamaños alélicos de cada locus (Anexo J). Se evaluaron tres *loci* microsatélites (L6, L7 y L9) en cinco familias de *P. armatus*, cada una conformada por una hembra y su progenie.

a. Caracterización general de loci

La caracterización de los loci utilizados en los ensayos de paternidad múltiple se basó en la identificación de alelos según la longitud del producto de amplificación (pb) por locus (Tabla 7). Los resultados por familia mostraron un bajo número de alelos por locus y, por tanto, un bajo nivel de polimorfismo. Si bien no existe un umbral universalmente fijo, en la práctica de estudios de paternidad múltiple en invertebrados marinos se suelen considerar marcadores útiles aquellos con un número de alelo (Na) ≥ 5–6 por locus, y altamente polimórficos con Na ≥ 10 (Selkoe & Toonen, 2006; Jossart et al., 2015).

b. Número mínimo de padres

Se realizó una comparación entre los alelos maternos y los observados en la progenie para inferir el número mínimo de padres compatibles con los genotipos detectados (Tabla 7). En todas las familias, el número mínimo de machos estimado fue de uno, es decir, no se detectaron alelos no maternos que requirieran más de un padre para ser explicados bajo un criterio conservador. Sin embargo, este resultado no permite concluir monogamia, ya que el bajo polimorfismo de los marcadores reduce su probabilidad de exclusión de paternidad, haciendo posible que contribuciones de distintos machos no sean detectables si estos comparten alelos.

Por lo tanto, el conjunto de marcadores evaluados presenta un polimorfismo insuficiente para estudios de paternidad múltiple en *Petrolisthes armatus*.

Tabla 7. Alelos observados por locus microsatélites para paternidad múltiple en *P. armatus* del Pacífico panameño

Locus	Na	Ao (pb)
L 6	5	160, 162, 164, 176, 178
L 7	2	132, 134
L 9	4	178, 184, 194

Nota. Na = número total de alelos distintos observados en el conjunto de las cinco familias analizadas; Ao = alelos observados con sus tamaños en pares de bases (pb).

Tabla 8. Resumen de los datos de herencia alélica de las larvas incubadas de cada una de las 5 hembras (madres) de *P. armatus* del Pacífico panameño

Familia	L6		L7		L9		N.º mínimo de padres
	Madre	Progenie	Madre	Progenie	Madre	Progenie	
1	162	162,178	132	132	178	178,178	1
	178				178		
2	162	162,164,178	132	132	178	178,194	1
	178				178		
3	162	162,176,160	132	132	178	178,198	1
	176				178		
4	160	160,176	132	132,134	178	178,184	1
	176		134		184		
5	160	160,176	132	132	178	178,184	1
	176				184		

Nota. Composición alélica materna y de la progenie en los *loci* L6, L7 y L9. El número mínimo de padres fue inferido a partir de la compatibilidad de los alelos paternos requeridos para explicar los genotipos observados en la progenie. En cada caso, el nombre madre se refiere a la hembra de la que se recolectaron las larvas (progenie).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Los *loci* microsatélites evaluados demostraron capacidad de amplificación funcional en *Petrolisthes armatus*, con siete *loci* retenidos para genética poblacional y tres para paternidad múltiple tras excluir aquellos con perfiles CE-LIF no interpretables o patrón de *stuttering* pronunciado.

- La caracterización preliminar de los siete *loci* microsatélites en individuos del POT demostró un promedio de 7.86 alelos por locus y posible ausencia de desequilibrio de ligamiento en la mayoría de las poblaciones evaluadas. Las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg observadas sugieren ser atribuibles al efecto Wahlund, lo que podría reflejar estructura poblacional real en concordancia con la filogeografía mitocondrial previamente reportada para la especie (Hiller & Lessios, 2017). Por lo tanto, estos resultados sugieren que los marcadores evaluados podrían ser adecuados para estudios de genética poblacional en *P. armatus* del POT.

- La caracterización preliminar en ensayos de paternidad múltiple realizados en cinco familias de *Petrolisthes armatus* de Panamá revelan un bajo nivel de polimorfismo en los tres *loci* evaluados, lo que impide detectar contribuciones paternas adicionales, limitando la utilidad de estos *loci* para inferencias robustas sobre los sistemas de apareamiento de la especie.

- Aunque el tamaño muestral reducido limita la extrapolación de los resultados a la totalidad de cada población evaluada, los datos obtenidos corresponden a muestras originales colectadas en el entorno natural de cada localidad y reflejan fielmente la variación genética observada en los individuos analizados. Por ello, los resultados deben interpretarse como aproximaciones preliminares que sientan las bases metodológicas para estudios futuros con mayor representatividad muestral.

Recomendaciones

- Para la extracción de ADN de larvas de crustáceos con el DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN), se recomienda sustituir el paso de lisis con vórtex y baño María por agitación mecánica continua, que permita mejorar la cinética de la proteinasa K. Sería interesante si antes de la agitación mecánica continua se realiza un tipo de maceración manual para reducir el tiempo de lisis celular.

- Se sugiere seguir investigando kits o métodos que permitan mejorar los valores de pureza A260/280 y A260/230 en larvas de crustáceos, debido a que el material del exoesqueleto puede causar interferencias en las lecturas espectrofotométricas. Sin embargo, como los microsatélites no requieren altos grados de pureza como otras técnicas moleculares, recomendamos el uso del método de extracción simple con proteinasa K y termociclador, debido a su bajo costo y reproducibilidad en microsatélites.

- Para mejorar patrón de *stuttering* pronunciado, se aconseja explorar la reducción del número de ciclos de PCR o el ajuste de la concentración de $MgCl_2$, ya que, ambos factores influyen en la frecuencia del deslizamiento de la ADN polimerasa.

- Para obtener estimadores de diversidad y diferenciación genética con mayor precisión estadística y capacidad de extrapolación se propone incrementar el tamaño muestral en todas las poblaciones, con un mínimo de 25-30 individuos por localidad.

- Para los ensayos de paternidad múltiple, se recomienda aumentar el tamaño muestral por nidada y el número de familias analizadas. Asimismo, se sugiere explorar y caracterizar nuevos loci microsatélites en *Petrolisthes armatus* del Pacífico panameño para determinar si presentan mayor polimorfismo que los aquí evaluados.

Referencias bibliográficas

Agapow, P., & Burt, A. (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium. Molecular Ecology Notes, 1(1-2), 101-102. https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2000.00014.x

Álvarez-Fernández, R. (2013). Explanatory chapter. Methods In Enzymology On CD-ROM/Methods In Enzymology, 529, 1-21. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-418687-3.00001-x

Athanasio, C. G., Chipman, J. K., Viant, M. R., & Mirbahai, L. (2016). Optimisation of DNA extraction from the crustaceanDaphnia. PeerJ, 4, e2004. https://doi.org/10.7717/peerj.2004

Baeza, J., & Thiel, M. (2003b). Predicting territorial behavior in symbiotic crabs using host characteristics: a comparative study and proposal of a model. Marine Biology, 142(1), 93-100. https://doi.org/10.1007/s00227-002-0927-1

Baeza, J. A., & Thiel, M. (2007). The Mating System of Symbiotic Crustaceans. En he Mating System of Symbiotic Crustaceans. En Evolutionary Ecology of Social and Sexual Systems (pp. 249-268). https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195179927.003.0012

Beier, S., Thiel, T., Münch, T., Scholz, U., & Mascher, M. (2017). MISA-web: a web server for microsatellite prediction. Bioinformatics, 33(16), 2583-2585. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx198

Bennett, P. (2000). Demystified . . . Molecular Pathology, 53(4), 177-183. https://doi.org/10.1136/mp.53.4.177

Blouin, M. S., Parsons, M., Lacaille, V., & Lotz, S. (1996). Use of microsatellite *loci* to classify individuals by relatedness. Molecular Ecology, 5(3), 393-401. https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1996.tb00329.x

Bott, R. (1964). Decapoden aus Angola unter besonderer Berücksichtigung der Potamoniden (Crust. Decap.) und einem Anhang: die Typen von Thelphusa pelii Herklots, 1861. Publicações Culturais da Companhia de Diamantes de Angola. 69: 23-34

Brouwer, L., & Griffith, S. C. (2019). Extra-pair paternity in birds. Molecular Ecology, 28(22), 4864-4882. https://doi.org/10.1111/mec.15259

Brown, A. H. D., Feldman, M. W., & Nevo, E. (1980). MULTILOCUS STRUCTURE OF NATURAL POPULATIONS OF HORDEUM SPONTANEUM. Genetics, 96(2), 523-536. https://doi.org/10.1093/genetics/96.2.523

Chace, FA Expédition Océanographique Belge dans les Eaux Côtières Africaines de l' Atlantique Sud (1948-1949). Resultados científicos . vol. III, Fac. 5. Cangrejos Porcelánidos . 1–54 (Instituto Real de Ciencias Naturales de Bélgica 1956).

Canning-Clode, J., Fowler, A. E., Byers, J. E., Carlton, J. T., & Ruiz, G. M. (2011). 'Caribbean Creep' Chills Out: Climate Change and Marine Invasive Species. PLoS ONE, 6(12), e29657. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029657

Crow, JF y Kimura, M. (1970) Introducción a la teoría genética de poblaciones. Harper and Row, Nueva York.

Díaz-Ferguson, E., & Vargas-Zamora, J. A. (2001). Abundance of Petrolisthes armatus (Crustacea: Porcellanidae) on a tropical estuarine intertidal rocky beach, Gulf of Nicoya estuary, Costa Rica. Revista de Biología Tropical, 49(Supl. 2), 97–101.

Di Rienzo, A., Peterson, A. C., Garza, J. C., Valdes, A. M., Slatkin, M., & Freimer, N. B. (1994). Mutational processes of simple-sequence repeat *loci* in human populations. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 91(8), 3166-3170. https://doi.org/10.1073/pnas.91.8.3166

Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. Genome Research, 3(3), S30-S37. https://doi.org/10.1101/gr.3.3.s30

Diesel R. 1991. Sperm competition and the evolution of matting behavior in Brachyura, with special reference to spider crabs (Decapoda, Majidae). En: R.T. Bauer & J.W. Martín (eds.). Crustacean sexual biology. Columbia University Press, New York. pp. 145-160.

Eberhard, W. G. 1996. Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Ellegren, H. (2000). Microsatellite mutations in the germline: Trends In Genetics, 16(12), 551-558. https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)02139-9

Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics, 5(6), 435-445. https://doi.org/10.1038/nrg1348

Emlen, S. T., & Oring, L. W. (1977). Ecology, Sexual Selection, and the Evolution of Mating Systems. Science, 197(4300), 215-223. https://doi.org/10.1126/science.327542

Estoup, A., Jarne, P., & Cornuet, J. (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite *loci* and their consequences for population genetics analysis. Molecular Ecology, 11(9), 1591-1604. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01576.x

Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). *Analysis of Molecular Variance* inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131(2), 479-491. https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.479

Faircloth, B. C. (2007). msatcommander: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. Molecular Ecology Resources, 8(1), 92-94. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01884.x

Gerber, S., Mariette, S., Streiff, R., Bodénès, C., & Kremer, A. (2000). Comparison of microsatellites and *Amplified Fragment Length Polymorphism* markers for parentage analysis. Molecular Ecology, 9(8), 1037-1048. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00961.x

Gibbes, L. R. (1850). On the carcinological collections of the United States, and an enumeration of species contained in them, with notes on the most remarkable, and descriptions of new species. Proceedings of the American Association for the Advancement of Science, 3, 165–201.

Goldstein & Schlötterer, 1999 — libro clásico de microsatélites

Goldstein, M. y Dupré, E. (2010). Sistema reproductivo de hembras y machos en Cancer setosus (Molina, 1782) (Decapoda, Brachyura). Latin american journal of aquatic research. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-560X2010000200013&lng=es&tlng=es.

Gore, R. H. (1970). Petrolisthes Armatus: a Redescription of Larval Development Under Laboratory Conditions (Decapoda, Porcellanidae) 1). Crustaceana, 18(1), 75-89. https://doi.org/10.1163/156854070x00086

Gore, R. H., & Abele, L. G. (1976). Shallow water porcelain crabs from the Pacific coast of Panamá and adjacent Caribbean waters (Crustacea, Anomura, Porcellanidae). Smithsonian Contributions To Zoology, 237, 1-30. https://doi.org/10.5479/si.00810282.237

Gowaty, P. A. (2012). The evolution of multiple mating. Fly, 6(1), 3-11. https://doi.org/10.4161/fly.18330

Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Léger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., & Petit, R. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. Molecular Ecology Resources, 11(4), 591-611. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x

Guérin-Méneville, FE (1855-1856). Animales articulados con pies articulados. En: de la Sagra, R., Historia física política y natural de la isla de Cuba. Segunda Parte. Historia Natural. Tomo VII (Crustaceos, Aragnides é Insectos) [1856]. Tomo VIII (Atlas de Zoología) [1855]: i-xxxii, 1-371, pls. 1-20. París

Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics. 1992 Jun;48(2):361-72. PMID: 1637966.

Haig, J. Los Porcellanidae (Crustacea Anomura) del Pacífico oriental . (University of Southern California Press 1960).

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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045170

Hartl, Daniel L, and Andrew G Clark. 2007. Principles of Population Genetics. 4th. ed. Sinauer.

Hayden, M. J., Nguyen, T. M., Waterman, A., & Chalmers, K. J. (2008). Multiplex-Ready PCR: A new method for multiplexed SSR and SNP genotyping. BMC Genomics, 9(1), 80. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-80

Hedrick P. (2011). Genetics of Populations.

Heller, C. (1862). Neue Crustaceen, gesammelt während der Weltumseglung der kk Fregatte Novara. Zweiter vorläufiger Bericht. Verhandlungen der kaiserlich-königlichen zoologisch-botanischen Gesellschaft en Viena. 12: 519-528.

Henderson, JR (1888). Informe sobre los Anomura recolectados por el HMS Challenger durante los años 1873-76. Informe sobre los resultados científicos del viaje del HMS Challenger durante los años 1873-76. Zoología. 27 (parte 69): i-xi, 1-221, láms. 1-21. , disponible en línea en http://www.19thcenturyscience.org/HMSC/HMSC-Reports/Zool-69/README.htm

Hiller, A., & Lessios, H. A. (2017). Phylogeography of Petrolisthes armatus, an invasive species with low dispersal ability. Scientific Reports, 7(1), 3359. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03410-8

Hollebone, A., & Hay, M. (2007). Population dynamics of the non-native crab Petrolisthes armatus invading the South Atlantic Bight at densities of thousands m2. Marine Ecology Progress Series, 336, 211-223. https://doi.org/10.3354/meps336211

Holsinger, K. E., & Weir, B. S. (2009). Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. Nature Reviews Genetics, 10(9), 639-650. https://doi.org/10.1038/nrg2611

Hosseinzadeh-Colagar A, Haghighatnia MJ, Amiri Z, Mohadjerani M, Tafrihi M. Microsatellite (SSR) amplification by PCR usually led to polymorphic bands: Evidence which shows replication slippage occurs in extend or nascent DNA strands. Mol Biol Res Commun. 2016 Sep;5(3):167-174. PMID: 28097170; PMCID: PMC5219911.

Jarne, P., & Lagoda, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. Trends In Ecology & Evolution, 11(10), 424-429. https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10049-5

Jedrzejczak-Silicka M, Lepczynski A, Gołębiowski F, Dolata D, Dybus A. Application of PCR-HRM method for microsatellite polymorphism genotyping in the LDHA gene of pigeons (Columba livia). PLoS One. 2021 Aug 19;16(8):e0256065. doi: 10.1371/journal.pone.0256065. PMID: 34411134; PMCID: PMC8376019.

Jossart, Q., Wattier, R. A., Kastally, C., Aron, S., David, B., De Ridder, C., & Rigaud, T. (2014). Genetic Evidence Confirms Polygamous Mating System in a Crustacean Parasite with Multiple Hosts. PLoS ONE, 9(3), e90680. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090680

Kayser, M., Roewer, L., Hedman, M., Henke, L., Henke, J., Brauer, S., Krüger, C., Krawczak, M., Nagy, M., Dobosz, T., Szibor, R., De Knijff, P., Stoneking, M., & Sajantila, A. (2000). Characteristics and Frequency of Germline Mutations at Microsatellite *Loci* from the Human Y Chromosome, as Revealed by Direct Observation in Father/Son Pairs. The American Journal Of Human Genetics, 66(5), 1580-1588. https://doi.org/10.1086/302905

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: An integrated and extendable desktop *software* platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics, 28(12), 1647-1649. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199

Kimura, M., & Crow, J. F. (1964). THE NUMBER OF ALLELES THAT CAN BE MAINTAINED IN a FINITE POPULATION. Genetics, 49(4), 725-738. https://doi.org/10.1093/genetics/49.4.725

Kimura, M., & Ohta, T. (1978). *Stepwise mutation model* and distribution of allelic frequencies in a finite population. Proceedings Of The National Academy Of Sciences, 75(6), 2868-2872. https://doi.org/10.1073/pnas.75.6.2868

Kulibaba, R. A., & Liashenko, Y. V. (2016b). Influence of the PCR artifacts on the genotyping efficiency by the microsatellite *loci* using native polyacrylamide gel electrophoresis. Cytology And Genetics, 50(3), 162-167. https://doi.org/10.3103/s0095452716030087

Kruglyak, S., Durrett, R., Schug, M. D., & Aquadro, C. F. (2000). Distribution and Abundance of Microsatellites in the Yeast Genome Can Be Explained by a Balance Between Slippage Events and Point Mutations. Molecular Biology And Evolution, 17(8), 1210-1219. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026404

Lambert, C. T., Sabol, A. C., & Solomon, N. G. (2018). Genetic Monogamy in Socially Monogamous Mammals Is Primarily Predicted by Multiple Life History Factors: A Meta-Analysis. Frontiers In Ecology And Evolution, 6. https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00139

Leberg, P. L. (2002). Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. Molecular Ecology, 11(11), 2445-2449. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2002.01612.x

Levinson, G., & Gutman, G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. Molecular Biology And Evolution, 4(3), 203-221. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040442

Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am J Hum Genet. 1989 Mar;44(3):397-401. PMID: 2563634; PMCID: PMC1715430.

Liu, D., Keijzers, G., & Rasmussen, L. J. (2017). DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. Mutation Research/Reviews In Mutation Research, 773, 174-187. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.07.001

Li, Y. (2004). Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. Molecular Biology And Evolution, 21(6), 991-1007. https://doi.org/10.1093/molbev/msh073

Mattick, J., & Amaral, P. (2022). The Human Genome. En ARN, epicentro de la información genética: Una nueva comprensión de la biología molecular. (pp. 125-135). https://doi.org/10.1201/9781003109242-11

Mayo, O. (2008). A Century of Hardy–Weinberg Equilibrium. Twin Research And Human Genetics, 11(3), 249-256. https://doi.org/10.1375/twin.11.3.249

Martinez, J. L., Moran, P., Perez, J., De Gaudemar, B., Beall, E., & Garcia-Vazquez, E. (2000). Multiple paternity increases effective size of southern Atlantic salmon populations. Molecular Ecology, 9(3), 293-298. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00857.x

Marwal, A., & Gaur, R. K. (2020). Molecular markers: tool for genetic analysis. En Animal Biotechnology (Vol. 13, Número 4, pp. 353-372). https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811710-1.00016-1

Meglécz, E., Costedoat, C., Dubut, V., Gilles, A., Malausa, T., Pech, N., & Martin, J. (2009). QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design *Primers* from large sequencing projects. Bioinformatics, 26(3), 403-404. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp670

Meisner, J., & Albrechtsen, A. (2019). Testing for Hardy–Weinberg equilibrium in structured populations using genotype or low-depth next generation sequencing data. Molecular Ecology Resources, 19(5), 1144-1152. https://doi.org/10.1111/1755-0998.13019

Meirmans, P. G., & Hedrick, P. W. (2010). Assessing population structure: FST and related measures. Molecular Ecology Resources, 11(1), 5-18. https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x

Miller, M. J., & Yuan, B. (1997). Semiautomated Resolution of Overlapping Stutter Patterns in Genomic Microsatellite Analysis. Analytical Biochemistry, 251(1), 50-56. https://doi.org/10.1006/abio.1997.2234

Nash, C. S., Darby, P. C., Frazier, B. S., Hendon, J. M., Higgs, J. M., Hoffmayer, E. R., & Daly-Engel, T. S. (2021). Multiple paternity in two populations of finetooth sharks (Carcharhinus isodon) with varying reproductive periodicity. Ecology And Evolution, 11(17), 11799-11807. https://doi.org/10.1002/ece3.7948

Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press.

Nunney, L. (1993b). THE INFLUENCE OF MATING SYSTEM AND OVERLAPPING GENERATIONS ON EFFECTIVE POPULATION SIZE. Evolution, 47(5), 1329-1341. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb02158.x

Nyblade, C. F. (1987). Phylum or subphylum crustacea, class Malacostraca, order Decapoda, Anomura (pp. 441-450). Seattle: University of Washington Press.tps://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1993.tb02158.x

De Oliveira, D. B., Silva, D. C., & Martinelli-Lemos, J. M. (2013). Larval and adult density of the porcellanid crab Petrolisthes armatus (Anomura: Porcellanidae) in an Amazon estuary, northern Brazil. Zoologia (Curitiba), 30(6), 592-600. https://doi.org/10.1590/s1984-46702013005000002

Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., & Vieira, M. L. C. (2006b). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics And Molecular Biology, 29(2), 294-307. https://doi.org/10.1590/s1415-47572006000200018

Ortmann, AE (1897). Estudios Carcinológicos. Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Geographie und Biologie der Thiere. 10(3): 258-372, pl. 17.

Osawa, & McLaughlin. (2010). ANNOTATED CHECKLIST OF ANOMURAN DECAPOD CRUSTACEANS OF THE WORLD (EXCLUSIVE OF THE KIWAOIDEA AND FAMILIES CHIROSTYLIDAE AND GALATHEIDAE OF THE GALATHEOIDEA) PART II – PORCELLANIDAE. THE RAFFLES BULLETIN OF ZOOLOGY.

Parker, G. A. (1970). SPERM COMPETITION AND ITS EVOLUTIONARY CONSEQUENCES IN THE INSECTS. Biological Reviews/Biological Reviews Of The Cambridge Philosophical Society, 45(4), 525-567. https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1970.tb01176.x

Pauli, J. N., & Peery, M. Z. (2012). Unexpected Strong Polygyny in the Brown-Throated Three-Toed Sloth. PLoS ONE, 7(12), e51389. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051389

Pećina-Šlaus, N., Kafka, A., Salamon, I., & Bukovac, A. (2020). Mismatch Repair Pathway, Genome Stability and Cancer. Frontiers In Molecular Biosciences, 7, 122. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00122

Pemberton, J. M., Slate, J., Bancroft, D. R., & Barrett, J. A. (1995). Nonamplifying alleles at microsatellite *loci*: a caution for parentage and population studies. Molecular Ecology, 4(2), 249-252. https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1995.tb00214.x

Pompanon, F. et al. (2005). Genotyping errors: causes, consequences and solutions. Nature Reviews Genetics

Popp, T., Shervette, V., & Wilber, D. H. (2020). Residency and reproductive patterns of the green porcelain crab, Petrolisthes armatus, on an intertidal oyster reef in its non-native range. Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology, 529, 151399. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2020.151399

QIAGEN. PCR primer design. (2013). https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench-guide/pcr/introduction/pcr-primer-design?utm_source=chatgpt.com

Rassmann K, Schlštterer C, Tautz D (1991) Isolation of simple sequence *loci* for use in *Polymerase Chain Reaction*-based DNA fingerprinting. Electrophoresis, 12, 113Ð118.

Rodrigues, D., Hirose, G., De P.Barros, S., & Baeza, J. A. (2017). The mating system of the symbiotic pea-crab Dissodactylus crinitichelis (Brachyura, Pinnotheridae): monogamy or promiscuity? Marine Biology, 164(10). https://doi.org/10.1007/s00227-017-3234-6

Schoebel, C. N., Brodbeck, S., Buehler, D., Cornejo, C., Gajurel, J., Hartikainen, H., Keller, D., Leys, M., Říčanová, Š., Segelbacher, G., Werth, S., & Csencsics, D. (2013b). Lessons learned from microsatellite development for nonmodel organisms using 454 pyrosequencing. Journal Of Evolutionary Biology, 26(3), 600-611. https://doi.org/10.1111/jeb.12077

Schlötterer C., 2004 — revisión sobre evolución de microsatélites

Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. Chromosoma, 109(6), 365-371. https://doi.org/10.1007/s004120000089

Schlötterer, C., & Tautz, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. Nucleic Acids Research, 20(2), 211-215. https://doi.org/10.1093/nar/20.2.211

Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology, 18(2), 233-234. https://doi.org/10.1038/72708

Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. Ecology Letters, 9(5), 615-629. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x

Simpson E. (1949). Measurement of diversity. Nature.

Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science.

Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics, 139(1), 457-462. https://doi.org/10.1093/genetics/139.1.457

Slatkin M. (2008). Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future. Nature Reviews Genetics.

Stimpson, W. (1858). Prodromus descriptionis animalium evertebratorum quae in Expeditione ad Oceanum Pacificum Septentrionalem, a Republica Federata missa, Cadwaladaro Ringgold et Johanne Rodgers ducibus, observavit et descripsit. Pars VII. Crustacea Anomura. Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 10, 225–252.

Subramoniam, T. (2013). Origin and occurrence of sexual and mating systems in Crustacea: A progression towards communal living and eusociality. Journal Of Biosciences, 38(5), 951-969. https://doi.org/10.1007/s12038-013-9392-x

Sunde, J., Yıldırım, Y., Tibblin, P., & Forsman, A. (2020). Comparing the Performance of Microsatellites and RADseq in Population Genetic Studies: Analysis of Data for Pike (Esox lucius) and a Synthesis of Previous Studies. Frontiers In Genetics, 11, 218. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00218

Taberlet, P. (1996b). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. Nucleic Acids Research, 24(16), 3189-3194. https://doi.org/10.1093/nar/24.16.3189

Taheri, S., Abdullah, T. L., Yusop, M., Hanafi, M., Sahebi, M., Azizi, P., & Shamshiri, R. (2018). Mining and Development of Novel SSR Markers Using Next Generation Sequencing (NGS) Data in Plants. Molecules, 23(2), 399. https://doi.org/10.3390/molecules23020399

Thermo Fisher Scientific. (s.f.). Boletín técnico espectrofotómetros NanoDrop: Relaciones 260/280 y 260/230. https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf

Toonen, R. (2004). Genetic evidence of multiple paternity of broods in the intertidal crab Petrolisthes cinctipes. Marine Ecology Progress Series, 270, 259-263. https://doi.org/10.3354/meps270259

Urbani, N., Sainte-Marie, B., Sévigny, J., Zadworny, D., & Kuhnlein, U. (1998b). Sperm competition and paternity assurance during the first breeding period of female snow crab (Chionoecetes opilio)

(Brachyura: Majidae). Canadian Journal Of Fisheries And Aquatic Sciences, 55(5), 1104-1113. https://doi.org/10.1139/cjfas-55-5-1104

Verrill, A. E. (1908). Decapod Crustacea of Bermuda. Their distribution, variations, and habits. I, Brachyura and Anomura. En Yale University eBooks. https://doi.org/10.5962/bhl.title.36024

Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., & De Freitas Munhoz, C. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. Genetics And Molecular Biology, 39(3), 312-328. https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0027

Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genetics Selection Evolution, 34(3), 275-305. https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-3-275

Wahlund, S. (1928). Zusammensetzung von Populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. Hereditas, 11, 65–106.

Wang, C., Schroeder, K. B., & Rosenberg, N. A. (2012b). A Maximum-Likelihood Method to Correct for *Allelic dropout* in Microsatellite Data with No Replicate Genotypes. Genetics, 192(2), 651-669. https://doi.org/10.1534/genetics.112.139519

Wehrtmann, I. S., Miranda, I., Lizana-Moreno, C. A., Hernáez, P., Barrantes-Echandi, V., & Mantelatto, F. L. (2011). Reproductive plasticity in Petrolisthes armatus (Anomura, Porcellanidae): a comparison between a Pacific and an Atlantic population. Helgoland Marine Research, 66(1), 87-96. https://doi.org/10.1007/s10152-011-0250-7

Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). ESTIMATINGF-STATISTICS FOR THE ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE. Evolution, 38(6), 1358-1370. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1984.tb05657.x

Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. Evolution.

Xu, X., Peng, M., Fang, Z., & Xu, X. (2000). The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. Nature Genetics, 24(4), 396-399. https://doi.org/10.1038/74238

Yockachonis, T., McKeon, C. S., Windsor, A. M., & Stillman, J. H. (2020b). Multiple paternity in the intertidal zone porcelain crabPetrolisthes cinctipesRandall, 1840 (Decapoda: Anomura: Porcellanidae) is a life-history strategy that increases fitness during heat stress. Journal Of Crustacean Biology, 40(6), 684-691. https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruaa071

Zalapa, J. E., Cuevas, H., Zhu, H., Steffan, S., Senalik, D., Zeldin, E., McCown, B., Harbut, R., & Simon, P. (2011). Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) *loci* in the plant sciences. American Journal Of Botany, 99(2), 193-208. https://doi.org/10.3732/ajb.1100394

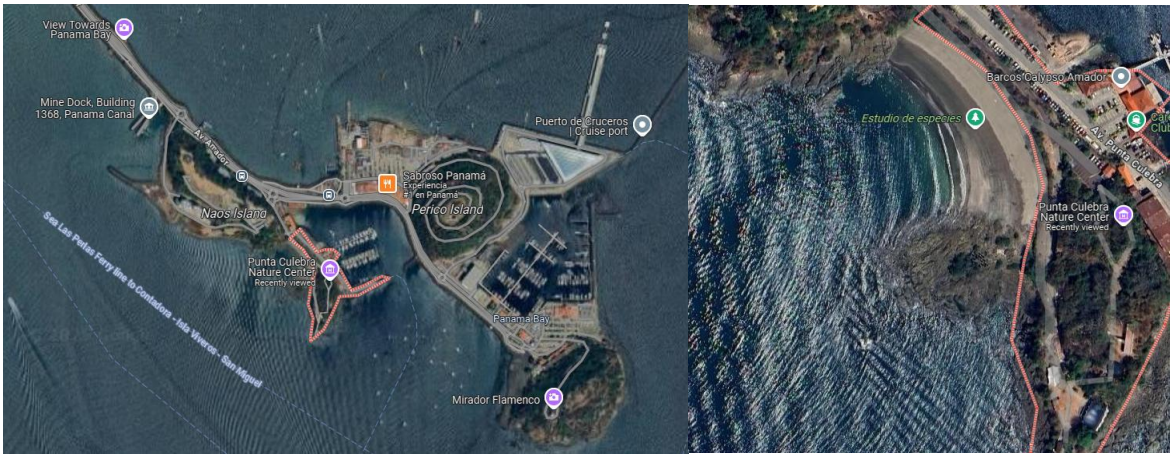
Zane, L., Bargelloni, L., & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology, 11(1), 1-16. https://doi.org/10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x

Ziegle, J. S., Su, Y., Corcoran, K. P., Nie, L., Mayrand, P. E., Hoff, L. B., McBride, L. J., Kronick, M. N., & Diehl, S. R. (1992). Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite *loci*. Genomics, 14(4), 1026-1031. https://doi.org/10.1016/s0888-7543(05)80126-0

Anexos



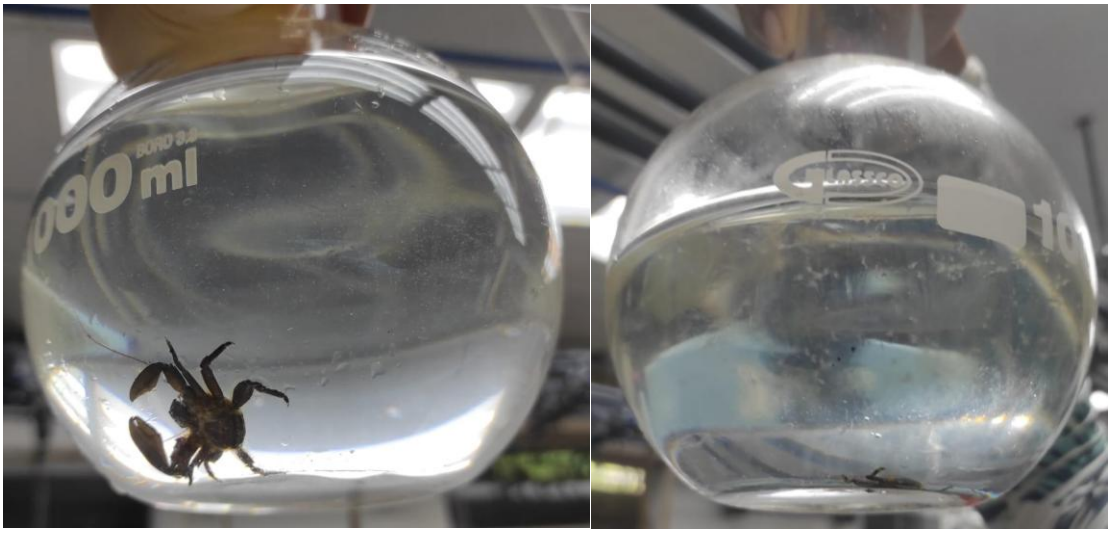
Anexo A. Playa de los Cangrejos en Punta Culebra donde se llevaron a cabo los muestreos de *Petrolisthes armatus*



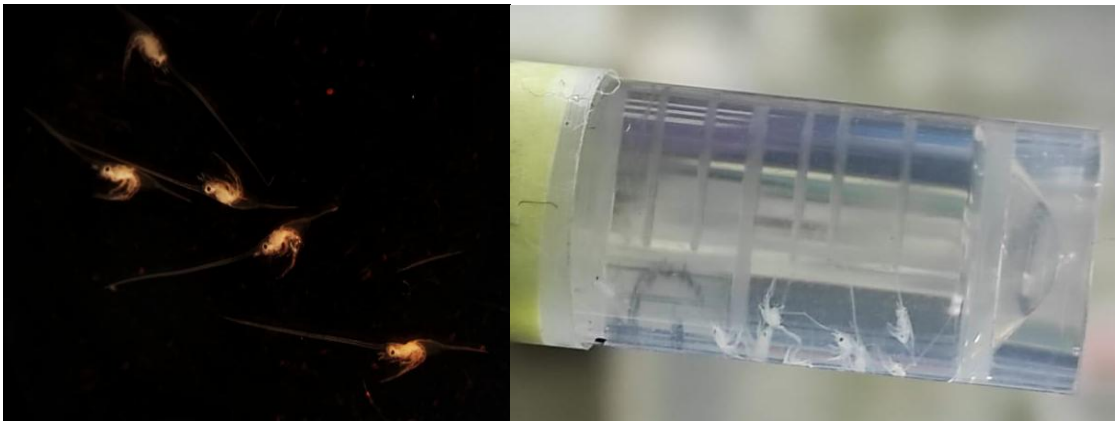
Anexo B. Localización de Punta Culebra. Foto satelital de Google Maps



Anexo C. Observación de estructuras genitales en porcelánidos, que permiten determinar si el individuo es macho o hembra



Anexo D. Hembra ovada de *Petrolisthes armatus* en cautiverio y eclosión de larvas



Anexo E. Observación bajo estereoscopio y preservación de larvas en etanol absoluto

Anexo F. Protocolo de extracción del kit de DNeasy ® Blood & Tissue (QIAGEN)

Materiales:

- Bata de laboratorio
- Guantes de nitrilo
- Papel absorbente o Kimwipes
- Gradillas para microtubos
- Marcador para rotular tubos
- Puntas de 10 ul, 200 ul y 1000 ul
- Micropipetas P 10, P 200 y P 1000
- Larvas y tejido blando de la quela de *P. armatus* adulto
- Tampones AL, ATL, AW1 y AW2 DNeasy
- Proteinasa K DNeasy
- Etanol absoluto (96-100 %)

- Agua desionizada Sigma Water
- Tubos de microcentrífuga de 1.5 ml
- Columnas de centrifugación DNeasy Mini
- Tubos de recolección de 2 ml DNeasy
- Vórtex
- Centrifugadora
- Baño María
- Contenedor para residuos con etanol y reactivos químicos

Antes de empezar:

1. Realice todos los pasos de centrifugación a temperatura ambiente (15-25 °C).
2. Redisuelva los precipitados en los tampones AL y ATL.
3. Añada etanol a los concentrados de los tampones AW1 y AW2.
4. Deje que el tejido congelado o los sedimentos celulares alcancen la temperatura ambiente. Precaliente la incubadora a 56 °C.
5. Consulte el manual para el pretratamiento de tejido fijado u otro material.

Procedimiento:

1. Colocar cada larva y tejido blando, sin preservante, en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml. Añadir 180 ul de tampón ATL y 20 ul de proteinasa K, mezcle mediante vórtex e incube a baño María a 56 °C durante 3 horas hasta lisar completamente.
2. Pasado ese tiempo, los tubos se deben agitar en vórtex durante 15 s y luego añadir 200 ul de tampón AL. Mezclar por vórtex.
3. Añadir 200 ul de etanol absoluto y mezclar por vórtex.
4. Pipetear la mezcla en una columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 ml. Centrifugar a 8 000 rpm durante 1 min, y luego desechar el tubo de recolección.
5. Colocar la columna de centrifugación en un tubo de recolección nuevo de 2 ml. Añadir 500 ul de tampón AW1. Centrifugar nuevamente durante 1 min a 8 000 rpm. Desechar el tubo de recolección.
6. Colocar la columna de centrifugación en un tubo de recolección nuevo de 2 ml. Añadir 500 ul de tampón AW2 y centrifugar durante 3 min a 13 000 rpm. Posteriormente desechar el tubo de recolección.
7. Finalmente, se transfiere la columna de centrifugación a un tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 ml. Se eluye el ADN añadiendo (en este caso) 50 ul de agua desionizada al centro de la membrana de la columna de centrifugación. Se incuba durante 1 min a temperatura ambiente (15-25 °C) y se centrifuga durante 1 min a 8 000 rpm. Se desecha la columna.

Anexo G. Concentración y pureza de ADN de hembras (madres) y su progenie. Comparación del kit DNeasy Blood & Tissue y el método simplificado basado en proteinasa K e incubación.

Muestra	Método	ng/uL	A260/280	A260/230
Madre 1	DNeasy® Blood & Tissue Kit	382	1.8	2.0
Larva_1	DNeasy® Blood & Tissue Kit	5.5	2.09	0.22
Larva_2	DNeasy® Blood & Tissue Kit	3.6	2.40	0.31
Larva_3	DNeasy® Blood & Tissue Kit	4.2	2.09	0.41
Larva_4	DNeasy® Blood & Tissue Kit	2.9	2.59	0.21
Larva_5	DNeasy® Blood & Tissue Kit	4.3	2.17	0.40
Larva_6	DNeasy® Blood & Tissue Kit	3.5	2.25	0.29
Larva_7	Proteinasa K e incubación	78.2	1.04	0.30
Larva_8	Proteinasa K e incubación	74.9	1.00	0.28
Larva_9	Proteinasa K e incubación	78.6	1.02	0.29
Larva_10	Proteinasa K e incubación	81.5	1.00	0.28
Larva_11	Proteinasa K e incubación	80.2	1.03	0.29
Larva_12	Proteinasa K e incubación	77.4	1.02	0.29
Madre 2	DNeasy® Blood & Tissue Kit	460	1.9	2.1
Larva_1	DNeasy® Blood & Tissue Kit	7.6	1.93	0.27
Larva_2	DNeasy® Blood & Tissue Kit	7.6	1.77	0.31
Larva_3	DNeasy® Blood & Tissue Kit	4.3	2.41	0.91
Larva_4	DNeasy® Blood & Tissue Kit	1.5	2.47	0.18
Larva_5	DNeasy® Blood & Tissue Kit	6.2	2.19	0.76
Larva_6	Proteinasa K e incubación	93.1	0.95	0.25
Larva_7	Proteinasa K e incubación	91.9	1.13	0.34
Larva_8	Proteinasa K e incubación	92.7	1.03	0.29
Larva_9	Proteinasa K e incubación	93.3	1.13	0.34
Larva_10	Proteinasa K e incubación	98.5	1.11	0.32
Madre 3	DNeasy® Blood & Tissue Kit	798	1.7	2.0
Larva_1	DNeasy® Blood & Tissue Kit	7.4	2.26	0.30
Larva_2	DNeasy® Blood & Tissue Kit	4.5	2.02	0.48
Larva_3	DNeasy® Blood & Tissue Kit	2.9	2.00	0.80
Larva_4	DNeasy® Blood & Tissue Kit	4.8	2.53	0.22
Larva_5	Proteinasa K e incubación	41.0	1.40	0.83
Larva_6	Proteinasa K e incubación	96.8	1.09	0.31
Larva_7	Proteinasa K e incubación	95.9	1.08	0.31
Larva_8	Proteinasa K e incubación	95.5	1.05	0.30
Madre 4	DNeasy® Blood & Tissue Kit	309	1.8	2.1
Larva_1	Proteinasa K e incubación	67.4	0.83	0.22
Larva_2	Proteinasa K e incubación	109.1	0.93	0.25
Larva_3	Proteinasa K e incubación	86.3	1.06	0.29
Larva_4	Proteinasa K e incubación	100.0	0.89	0.22
Larva_5	Proteinasa K e incubación	135.8	1.18	0.36
Larva_6	Proteinasa K e incubación	101.3	1.11	0.32
Larva_7	Proteinasa K e incubación	93.1	1.08	0.31
Larva_8	Proteinasa K e incubación	98.7	1.07	0.31

Larva_9	Proteinasa K e incubación	99.6	1.11	0.32
Larva_10	Proteinasa K e incubación	103.5	1.10	0.32
Madre 5	DNeasy® Blood & Tissue Kit	166	1.9	2.2
Larva_1	Proteinasa K e incubación	99.4	1.01	0.27
Larva_2	Proteinasa K e incubación	89.3	1.03	0.29
Larva_3	Proteinasa K e incubación	98.0	1.11	0.32
Larva_4	Proteinasa K e incubación	83.7	1.04	0.28
Larva_5	Proteinasa K e incubación	93.5	1.03	0.27
Larva_6	Proteinasa K e incubación	100.5	1.09	0.33
Larva_7	Proteinasa K e incubación	92.7	1.05	0.30
Larva_8	Proteinasa K e incubación	80.7	0.85	0.22
Larva_9	Proteinasa K e incubación	117.7	0.99	0.27
Larva_10	Proteinasa K e incubación	111.9	0.90	0.24

Anexo H. Cuantificación y pureza de ADN obtenido tras la modificación del paso de lisis del kit DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) en larvas de *P. armatus*

Muestra	Método	ng/uL	A260/280	A260/230
1	DNeasy® Blood & Tissue Kit	6.6	1.93	0.54
2	DNeasy® Blood & Tissue Kit	7.3	1.90	0.77
3	DNeasy® Blood & Tissue Kit	7.3	1.88	0.99
4	DNeasy® Blood & Tissue Kit	5.7	1.85	0.52
5	DNeasy® Blood & Tissue Kit	7.1	1.88	0.75
6	DNeasy® Blood & Tissue Kit	7.5	1.94	0.54
7	DNeasy® Blood & Tissue Kit	6.3	1.94	0.36
8	DNeasy® Blood & Tissue Kit	7.6	1.93	0.62
9	DNeasy® Blood & Tissue Kit	8.7	1.94	0.59
10	DNeasy® Blood & Tissue Kit	11.2	1.87	0.28
11	DNeasy® Blood & Tissue Kit	7.6	1.91	0.46
12	DNeasy® Blood & Tissue Kit	3.9	1.76	0.67
13	DNeasy® Blood & Tissue Kit	5.3	1.80	0.46
14	DNeasy® Blood & Tissue Kit	4.9	1.88	0.59
15	DNeasy® Blood & Tissue Kit	4.7	1.95	0.44
16	DNeasy® Blood & Tissue Kit	5.4	1.90	0.37
17	DNeasy® Blood & Tissue Kit	5.5	2.0	0.36
18	DNeasy® Blood & Tissue Kit	8.3	1.92	0.55
19	DNeasy® Blood & Tissue Kit	6.2	1.89	0.57

20	DNeasy® Blood & Tissue Kit	8.3	2.23	0.69
21	DNeasy® Blood & Tissue Kit	10.6	2.08	0.49
22	DNeasy® Blood & Tissue Kit	8.8	2.49	0.28
23	DNeasy® Blood & Tissue Kit	6.5	2.65	0.28
24	DNeasy® Blood & Tissue Kit	6.5	2.35	0.75
25	DNeasy® Blood & Tissue Kit	5.8	2.59	0.30
26	DNeasy® Blood & Tissue Kit	5.9	2.54	0.29
27	DNeasy® Blood & Tissue Kit	6.3	2.26	0.47
28	DNeasy® Blood & Tissue Kit	12.3	2.15	0.87
29	DNeasy® Blood & Tissue Kit	7.4	2.45	0.54
30	DNeasy® Blood & Tissue Kit	10.0	2.19	0.72
31	DNeasy® Blood & Tissue Kit	7.6	2.35	0.65
32	DNeasy® Blood & Tissue Kit	8.2	2.34	0.68
33	DNeasy® Blood & Tissue Kit	11.6	2.18	1.26

Nota. Para la optimización del protocolo se emplearon 33 larvas adicionales, enfocándose en la modificación del paso de lisis celular en *P. armatus*

Anexo I. Matriz de genotipos por locus en individuos de *P. armatus* del POT

IND	POP	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
1	*1*	*206 / 206*	*198 / 218*	*230 / 230*	*186 / 186*	*174 / 176*	*162 / 170*	*132 / 132*
2	*1*	*222 / 222*	*198 / 218*	*234 / 234*	*200 / 200*	*174 / 174*	*170 / 178*	*132 / 132*
3	*2*	*208 / 208*	*192 / 218*	*NA*	*198 / 198*	*176 / 180*	*160 / 176*	*132 / 132*
4	*2*	*170 / 194*	*194 / 218*	*NA*	*NA*	*164 / 170*	*160 / 176*	*132 / 132*
5	*2*	*NA*	*NA*	*234 / 234*	*196 / 196*	*174 / 174*	*160 / 160*	*134 / 134*
6	*2*	*NA*	*NA*	*214 / 214*	*192 / 192*	*176 / 180*	*160 / 160*	*132 / 132*
7	*2*	*188 / 188*	*NA*	*214 / 214*	*184 / 184*	*174 / 176*	*160 / 176*	*134 / 134*
8	*2*	*NA*	*NA*	*NA*	*196 / 196*	*174 / 180*	*160 / 160*	*134 / 134*
9	*3*	*222 / 222*	*192 / 218*	*NA*	*198 / 214*	*182 / 194*	*182 / 182*	*134 / 134*
10	*3*	*188 / 208*	*218 / 218*	*222 / 222*	*190 / 230*	*176 / 182*	*182 / 182*	*134 / 134*

11	*3*	*176 / 176*	*192 / 218*	*214 / 218*	*200 / 218*	*174 / 182*	*182 / 182*	*126 / 134*
12	*3*	*168 / 168*	*184 / 218*	*NA*	*192 / 206*	*174 / 176*	*182 / 182*	*132 / 132*
13	*3*	*216 / 216*	*218 / 218*	*NA*	*208 / 256*	*174 / 182*	*NA*	*132 / 132*
14	*4*	*NA*	*180 / 180*	*212 / 214*	*NA*	*174 / 180*	*182 / 182*	*134 / 134*
15	*4*	*176 / 176*	*NA*	*214 / 214*	*NA*	*176 / 180*	*182 / 182*	*134 / 134*
16	*4*	*NA*	*218 / 218*	*212 / 214*	*NA*	*176 / 180*	*182 / 182*	*134 134*

Nota. IND = individuo; Pop = población (Pop 1: Golfo de California; Pop 2: Panamá; Pop 3: Colombia; Pop 4: Ecuador); L = locus. L1–L7 corresponden a los *loci* microsatélites amplificados con los siguientes pares de cebadores: L1: Par 22; L2: Par 25; L3: Par 26; L4: Par 30; L5: Par 33; L6: Par 34; L7: Par 38.

Anexo J. Matriz de genotipos por locus en hembras (madres) y sus progenies de *P. armatus* del Pacífico panameño

IND	L6	L7	L9
Madre 1	162 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_1	162 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_2	162 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_3	178 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_4	162 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_5	162 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_6	178 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_7	178 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_8	162 / 162	132 / 132	178 / 178
Madre 2	162 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_1	164 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_2	164 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_3	162 / 164	132 / 132	178 / 178
Larva_4	164 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_5	162 / 178	132 / 132	178 / 178
Larva_6	164 / 178	132 / 132	178 / 194
Larva_7	162 / 178	132 / 132	178 / 194
Larva_8	162 / 162	132 / 132	178 / 178
Larva_9	162 / 178	132 / 132	178 / 178
Madre 3	162 / 176	132 / 132	178 / 178
Larva_1	162 / 176	132 / 132	178 / 178
Larva_2	160 / 162	132 / 132	178 / 178
Larva_3	160 / 176	132 / 132	178 / 178
Larva_4	160 / 176	132 / 132	178 / 178

Larva_5	162 / 176	132 / 132	178 / 178
Larva_6	160 / 162	132 / 132	178 / 198
Larva_7	160 / 176	132 / 132	178 / 178
Madre 4	160 / 176	134 / 132	178 / 184
Larva_1	160 / 160	132 / 132	178 / 178
Larva_2	160 / 160	132 / 132	178 / 178
Larva_3	176 / 176	134 / 134	178 / 184
Larva_4	176 / 176	134 / 134	178 / 184
Larva_5	176 / 176	132 / 132	178 / 184
Larva_6	160 / 176	132 / 132	178 / 178
Larva_7	160 / 176	134 / 134	178 / 178
Madre 5	160 / 176	132 / 132	178 / 184
Larva_1	160 / 160	132 / 132	178 / 178
Larva_2	160 / 160	NA	178 / 178
Larva_3	176 / 176	NA	178 / 184
Larva_4	176 / 176	NA	178 / 178
Larva_5	176 / 176	NA	178 / 178
Larva_6	176 / 176	NA	178 / 178
Larva_7	160 / 176	NA	178 / 178
Larva_8	NA	NA	178 / 178
Larva_9	NA	NA	178 / 178

Nota. IND = individuo; L = locus. L6–L9 corresponden a los *loci* microsatélites amplificados con los siguientes pares de cebadores: L6: Par 34; L7: Par 38; L9: Par 23. NA= datos no disponibles