



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**ESTRUCTURA POBLACIONAL Y DIVERSIDAD  
GENETICA DEL OSTIÓN DE PLACER  
*Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) EN LA  
COSTA ORIENTAL DEL GOLFO DE  
CALIFORNIA**

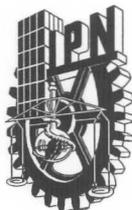
**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN  
MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

**PRESENTA**

**CLAUDIA GABRIELA RIVERA APODACA**

La Paz B.C.S, Octubre de 2009



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

## SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

### ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las 12:00 horas del día 10 del mes de Noviembre del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

“ESTRUCTURA POBLACIONAL Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL OSTIÓN DE PLACER

Crassostrea corteziensis (Hertlein, 1951) EN LA COSTA ORIENTAL DEL GOLFO DE CALIFORNIA”

Presentada por el alumno:

RIVERA

Apellido paterno

APODACA

materno

CLAUDIA GABRIELA

nombre(s)

Con registro:

B	0	7	1	2	0	6
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISION REVISORA

Director de tesis  
PRIMER VOCAL

DR. PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ

PRESIDENTE

DR. BERNARDO SHIRASAGO GERMÁN

SECRETARIO

DRA. BERTHA PATRICIA CEBALLOS VÁZQUEZ

SEGUNDO VOCAL

DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ  
2º. DIRECTOR DE TESIS

TERCER VOCAL

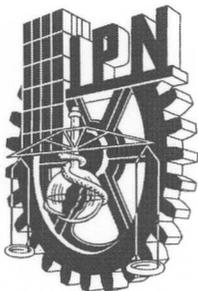
DR. FRANCISCO JAVIER GARCÍA RODRÍGUEZ

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



IPN  
CICIMAR  
DIRECCION



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 18 del mes Noviembre del año 2009, el (la) que suscribe BIOL. CLAUDIA GABRIELA RIVERA APODACA alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro B071206 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: DR. PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ y DR. MARCIAL ARELLANO MARTÍNEZ y cede los derechos del trabajo titulado: "ESTRUCTURA POBLACIONAL Y DIVERSIDAD GENÉTICA DEL OSTIÓN DE PLACER *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) EN LA COSTA ORIENTAL DEL GOLFO DE CALIFORNIA" al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: shapita arteaga@hotmail.com pcruzher@hotmail.com marellam@ipn.mx Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

BIOL. CLAUDIA GABRIELA RIVERA APODACA

nombre y firma

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>ii</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>I. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>5</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>11</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
<b>V. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>13</b>
5.1. Área de estudio.	<b>13</b>
5.2. Obtención de muestras.	<b>14</b>
5.3. Extracción de ADN.	<b>15</b>
5.4. Análisis de microsatélites.	<b>16</b>
5.5. Análisis estadístico.	<b>17</b>
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>20</b>
6.1. Variabilidad genética.	<b>20</b>
6.2. Déficit de heterocigotos y alelos nulos.	<b>25</b>
6.3. Diferenciación genética intrapoblacional.	<b>26</b>
6.4. Flujo genético.	<b>30</b>
6.5. Número de migrantes y tamaño efectivo poblacional.	<b>31</b>
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
7.1. Variabilidad genética intrapoblacional.	<b>33</b>
7.2. Déficit de heterocigotos y alelos nulos.	<b>35</b>
7.3. Diferenciación genética interpoblacional.	<b>37</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>IX. RECOMENDACIONES</b>	<b>44</b>
<b>X. LITERATURA CITADA</b>	<b>45</b>
<b>XI ANEXOS</b>	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

## PÁGINA

- Figura 1.** Ejemplo representativo de A) un área no estructurada, y B) un área con estructura poblacional genética. 3
- Figura 2.** Área de estudio y localidades de recolecta de las muestras de *C. corteziensis* en la costa oriental del Golfo de California. Las líneas punteadas indican la división del Golfo de California en diferentes zonas según Lavin & Marinone (2003): A) zona superior, B) zona norte, C) el archipiélago, D) zona sur, y E) zona de entrada. 15
- Figura 3.** Gráficas de heterocigosidades esperadas (negro) y esperadas (gris) en las cuatro localidades del área se estudio. Se pueden apreciar las diferencias entre  $H_O$  y  $H_E$  entre todas las localidades y todos los loci. 23
- Figura 4.** Variabilidad genética promedio para cada localidad: A) Número de alelos ( $N_a$ ) - número efectivo de alelos ( $n_e$ ); B) Heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) - Heterocigosidad observada ( $H_O$ ). 25
- Figura 5.** Análisis factorial de correspondencia. 29
- Figura 6.** Prueba de asignamiento. Los números representan las localidades en orden latitudinal; la gama de colores: la probabilidad de cada individuo de pertenecer a determinada población. 30
- Figura 7.** Gráfica de la correlación entre distancias geográficas y distancias genéticas. 31
- Figura 8.** Flujo genético entre las cuatro localidades de recolecta en la costa oriental del Golfo de California. La línea continua representa el mayor flujo genético y así sucesivamente hasta la línea punteada de menor valor. 32

## LISTA DE TABLAS

## PÁGINA

<b>Tabla 1.</b> Características de los seis loci microsatélites analizados.	<b>16</b>
<b>Tabla 2.</b> Variabilidad genética para seis loci microsatélites de <i>Crassostrea corteziensis</i> , en cuatro localidades de la costa oriental del Golfo de California.	<b>21</b>
<b>Tabla 3.</b> Valores de $F_{IS}$ con y sin el locus Ccor21.	<b>26</b>
<b>Tabla 4.</b> Valores de $F_{IS}$ y $F_{ST}$ de las cuatro localidades en <i>C. corteziensis</i> . En la tabla se muestran los seis loci utilizados en este trabajo.	<b>27</b>
<b>Tabla 5.</b> Valores $F_{ST}$ pareados entre las cuatro localidades de la zona de estudio. El orden de las localidades va de norte a sur.	<b>28</b>
<b>Tabla 6.</b> AMOVA basado en 6 loci microsatélites de <i>C. corteziensis</i> . Tres grupos: Bahía de lobos vs. Las Glorias - Bahía de Ceuta vs. Boca de Camichín.	<b>29</b>
<b>Tabla 7.</b> Numero de migrantes entre localidades.	<b>31</b>

## GLOSARIO

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico. Cualquiera de los ácidos nucleicos que dan desoxirribosa como producto de hidrólisis.

**Alelo:** Una de dos o más formas alternativas de un gen, cada uno con una secuencia de nucleótidos única. El término es usado también para denotar las variantes de los marcadores moleculares genéticos codominantes como los microsatélites.

**Ambiente:** Es un conjunto de elementos físico-químicos, geológicos y biológicos interrelacionados que producen los diferentes recursos que requieren los organismos para perpetuarse a través del tiempo.

**Gen:** Unidad hereditaria que contiene información genética (ADN) que es transcrita a ARN y traducida a una cadena polipeptídica (proteína). En el genoma de un organismo, una secuencia de nucleótidos a la que se le puede asignar una función específica.

**Genotipo:** La constitución genética de un organismo, que estará dada por la información heredada por ambos padres. Específicamente para un solo locus, el genotipo estará dado por los alelos heredados por ambos padres (ver homocigoto, heterocigoto).

**Heterocigosidad:** La proporción de individuos heterocigotos para un locus o en promedio para varios loci. Es un estimador de variabilidad genética en poblaciones naturales o domesticadas.

**Heterocigoto.** Un individuo diploide o poliploide que ha heredado diferentes alelos en uno o más de sus loci.

**Homocigoto.** Un individuo que ha heredado el mismo alelo de ambos padres para un determinado locus.

**Locus:** La posición que un gen tiene en un cromosoma o dentro de un segmento de ADN genómico. Por convencionalismo, se aplica el término para referirse a genes o marcadores moleculares aun cuando no se conozca su lugar en el genoma.

**Loci:** Plural de locus

**Moluscos:** Son invertebrados protóstomos celomados, triblásticos con simetría bilateral (aunque algunos pueden tener una asimetría secundaria) y no segmentados, de cuerpo blando, desnudo o protegido por una concha.

**Nucleótido:** Unidad que conforma los ácidos nucleicos, cada nucleótido se compone de una base nitrogenada (Purina o pirimidina), un azúcar pentosa (D-ribosa o 2-deoxy-ribosa) y un ácido fosfórico.

**Ostión:** Los ostiones (*Crassostrea* spp.) son un género de moluscos del grupo de los lamelibranquios o bivalvos. Se distingue por presentar una concha de forma irregular y asimétrica, cuya cara exterior es áspera y oscura, contrastando con la interior.

**Surgencias:** Movimientos ascendentes mediante los cuales las aguas de los niveles subsuperficiales son llevadas hasta la superficie, desde profundidades generalmente menores de 100-200 metros, y removidas desde el área de transporte por el flujo horizontal, produciéndose así un aporte de nutrientes a las aguas superficiales empobrecidas por el consumo biológico.

**Variabilidad genética:** se refiere a la variación en el material genético de una población o especie, e incluye los genomas nuclear y mitocondrial. La variabilidad genética nueva puede estar causada por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo (el número, forma, tamaño y ordenación interna de los cromosomas). Los procesos que eliminan variabilidad genética son la selección natural y la deriva genética.

## RESUMEN

El ostión de placer *Crassostrea corteziensis*, es un molusco bivalvo nativo que habita en estuarios y lagunas a lo largo de la costa oriental del Golfo de California (México). Posee una demanda importante en la región Noroeste del país, esto junto con su reducida explotación pesquera, lo convierten en un candidato para el desarrollo de un manejo sustentable del recurso, tanto en el ámbito pesquero como en la acuicultura. El Golfo de California es un mar con numerosos fenómenos oceanográficos, como el rango de temperatura anual de la superficie del mar, que va de 16°C (Norte) a 9°C (Sur), surgencias estacionales, así como la dirección de la corriente superficial a lo largo de la costa oriental, que muestra un patrón norte-sur en la primavera y el otoño, mientras que el patrón es sur-norte en el verano, contribuyendo estas características a la dispersión larval de la especie, lo cual se convierte en un elemento importante en la mezcla de poblaciones. En el presente trabajo se realizó un análisis de la variabilidad y estructura genética de *C. corteziensis*, en cuatro localidades de la costa oriental del Golfo de California: Bahía de lobos (Sonora), Las Glorias (Sinaloa), Bahía de Ceuta (Sinaloa), Boca de Camichín (Nayarit), utilizando seis loci de microsatélites. Se encontró que esta especie presenta una alta variabilidad genética dentro el área de estudio ( $A= 25-35$ ,  $ne= 13.8-20.6$ ,  $H_o= 0.620- 0.693$ ,  $H_E= 0.908 - 0.931$ ). Bahía de Lobos fue la localidad de mayor variabilidad genética ( $A=35$ ,  $ne=20.6$ ) y Las Glorias la de menor ( $A= 25$ ,  $ne= 13.8$ ). Se observó un amplio flujo genético, el cual puede deberse a factores oceanográficos, puesto que no se observó aislamiento por distancia entre el total de localidades. Los menores flujos genéticos se dieron entre la localidad más sureña (Boca de Camichín) y el resto de las localidades. Los valores pareados de  $F_{ST}$  indicaron sutiles diferencias estadísticamente significativas entre las localidades, a excepción de las localidades más próximas: Bahía de Ceuta y Las Glorias, las cuales no estuvieron genéticamente diferenciadas. Se observó cierto grado de estructuración genética de *C. corteziensis* en el área evaluada; sin embargo las diferencias entre localidades fueron escasas, posiblemente debido a un intercambio de migrantes en etapas larvales mediante las corrientes imperantes en el Golfo de California.

## ABSTRACT

The pleasure oyster *Crassostrea corteziensis*, is a native bivalve mollusk, that lives in estuaries and lagoons along the coast of Gulf of California (México). The high demand in the northwest of the country of this natural resource, and the small fishing operations, makes it a candidate for the development of a sustainable resource management, both in fisheries and in aquaculture. The Gulf of California is a sea with many oceanographic phenomena, such as the annual temperature range of the sea surface, which ranges from 16°C (North) at 9°C (South); seasonal upwelling; and the direction of the surface current along the east coast, which shows a north-south pattern in spring and autumn, while the pattern is south-north in the summer. These features contribute to the larval dispersal of the species, which is an important element in the mix of populations. In this study genetic variation of *C. corteziensis* was evaluated, in four localities on the east coast of the Gulf of California: Bahía de lobos (Sonora), Las Glorias (Sinaloa), Bahía de Ceuta (Sinaloa), Boca de Camichín (Nayarit), using six microsatellite loci. A high genetic variability was found within the study area ( $A= 25-35$ ,  $ne= 13.8-20.6$ ,  $H_o= 0.620-0.693$ ,  $H_E= 0.908 - 0.931$ ). Bahía de Lobos was the site of greater genetic variability ( $A = 35$ ,  $ne = 20.6$ ) and Las Glorias of lower ( $A = 25$ ,  $ne = 13.8$ ). There was an extensive gene flow, which can be attributed to oceanographic factors, because no isolation by distance was observed between total locations. The lower gene flow occurred between the southernmost locality (Boca de Camichín) with the other localities. The paired values of  $F_{ST}$  indicated subtle statistical differences between the localities, except for the nearest localities: Bahía de Ceuta and Las Glorias, which were not genetically differentiated. There was some degree of genetic structure of *C. corteziensis* in the area, but the differences between locations were limited, possibly due to an exchange of migrants in larval stages by the prevailing currents in the Gulf of California.

## I. INTRODUCCIÓN

Los ostiones son moluscos del grupo de los bivalvos (Cifuentes-Lemus *et al.*, 1997), al que pertenecen gran número de especies comestibles que el hombre aprovecha como alimento por su alto valor nutritivo y por las grandes posibilidades que tiene el cultivarlos (Cifuentes-Lemus *et al.*, 1997). En México hay una importante explotación de estos recursos, y en el año 2006 aportó 46,576 toneladas (SEMARNAT, 2008), por lo que se mantiene entre los siete primeros recursos pesqueros por volumen y precio en este país.

El ostión de placer *Crassostrea corteziensis* es una especie nativa que se distribuye desde las costas de la cabecera del Golfo de California hasta Panamá, siendo muy abundante, principalmente desde Sonora hasta Nayarit (Mazon-Suastegui, 1996). Se encuentran en áreas cercanas a la costa, dentro de la zona intermareal y en los esteros, asociados generalmente a las raíces del mangle rojo *Rizophora mangle*, o adheridos a sustratos duros como rocas, en fondos someros o directamente sobre el fango y en áreas de influencia estuarina (Cáceres-Puig, 2007). El ostión de placer se ha capturado tradicionalmente en Sonora, Sinaloa y Nayarit principalmente, a nivel de pesquerías artesanales. Tiene una posición importante en el mercado regional y nacional, por su alto valor nutricional, excelente sabor y por ser fuente de empleo, además de tener un gran potencial para la acuicultura, debido a su rápido crecimiento y aceptación, por lo que a la fecha ya se está cultivando en el sur de Sinaloa y Nayarit (Cáceres-Puig, 2007). Recientemente se ha puesto especial interés en el ostión de placer, ya que representa una alternativa para la industria del ostión y para especies introducidas como *Crassostrea gigas* (Cáceres-Puig, 2007). Por lo anterior, es importante llevar a cabo estudios basados en genética poblacional de esta especie, para conocer si existen diferentes poblaciones en su rango de distribución, y con ello contribuir a una mejor administración del recurso dentro de su pesquería y cultivo.

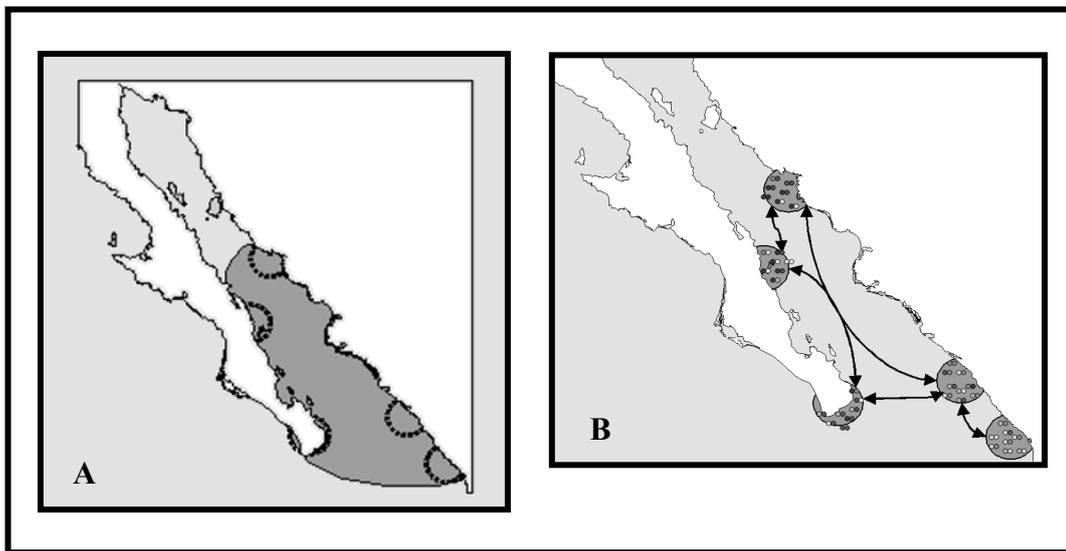
En términos pesqueros, es muy importante determinar la extensión de un “stock” pesquero dentro de un rango geográfico, ya que es necesario definir si la extracción de organismos en una localidad afectará a los organismos existentes en

otras áreas. De manera más clara, si se llega a sobreexplotar un recurso, es necesario conocer la magnitud del área afectada, y por lo tanto si se tiene conocimiento claro del tamaño de la población, se pueden implementar mejores estrategias de manejo, como lo son vedas espaciales y temporales, dependiendo de la estructura poblacional de la especie.

Así mismo, en términos de acuicultura se ha enfatizado que los organismos que vayan a ser usados deberían de ser estudiados para determinar si existen diferencias suficientes entre las poblaciones, de tal manera que se favorezca alguna en particular para el cultivo bajo determinadas condiciones (Lightner, 1994). Las poblaciones naturales pueden diferir en su tasa de crecimiento y resistencia a enfermedades, entre otras características importantes. Por lo tanto, es importante determinar si existen diferentes poblaciones naturales disponibles, y en caso de que existan diferencias genéticas entre éstas, seleccionar a la más adecuada para determinado cultivo. En este sentido, se sabe que la mejor alternativa, en términos de producción a largo plazo y menor impacto ambiental, siempre lo será la población más cercana al sitio donde se pretenda implementar su cultivo, ya que las poblaciones nativas tendrán una mejor adaptación a las condiciones locales que las poblaciones foráneas o en casos extremos, especies exóticas. Por otro lado, las especies exóticas pueden ser vectores potenciales para la introducción de patógenos que infecten a las nativas (Lightner, 1994).

En este sentido, el análisis de la estructura y diversidad genética es de vital importancia para el manejo y conservación de las especies. La diversidad genética se entiende como la variación de los genes entre las especies y dentro de las poblaciones y en esencia, depende de las variaciones de las bases nucleotídicas con que se constituye el código genético (Hartl & Clarck, 1997), y su función es la de mantener un reservorio de condiciones de variación de respuesta al medio, que permita la adaptación y la supervivencia de las poblaciones; ante ello, la importancia de cualquier alteración en la diversidad genética (reservorio) es incierta (Hartl & Clarck, 1997). La frecuencia de genes dentro de la población total es la resultante de varios efectos aislados o combinados como: reproducción azarosa, selección natural, deriva genética y endogamia (Hartl & Clarck, 1997). El estudio de la estructura genética de las poblaciones de una especie examina si

en la continuidad aparente de su distribución geográfica existen o no poblaciones aisladas genéticamente y el flujo genético entre ellas (Dujardin *et al.*, 2002). Se dice que no existe estructura genética poblacional cuando no se detectan diferencias entre localidades en un área geográfica, implicando un elevado flujo genético; y por el contrario, de una estructura genética poblacional cuando existen poblaciones diferenciadas genéticamente, que en el caso del medio oceánico puede existir cierto flujo genético entre localidades aledañas, debido a la ausencia de fuertes barreras geográficas (Fig. 1). En la práctica, un problema común es determinar si existen intercambios frecuentes de individuos entre ciertas poblaciones propiciando un flujo genético.



**Figura 1.** Ejemplo representativo de A) un área no estructurada, y B) un área con estructura genética poblacional.

La utilización de marcadores genéticos con un elevado grado de polimorfismo, como los microsatélites, en estudios de diversidad genética y de estructura genética de poblaciones se ha generalizado tanto en especies de animales domésticos como silvestres. Asociado a estas aplicaciones ha surgido un interés creciente sobre la posibilidad de utilizar estos marcadores para asignar o rechazar animales o grupos de animales a determinadas poblaciones (Shriver *et al.*, 1997; Götz & Thaller, 1998; MacHugh *et al.*, 1998).

Los microsatélites son marcadores moleculares de tipo neutral con un elevado polimorfismo, lo que permite un análisis directo de las variaciones de ADN y proporcionan una mejor medida de la variabilidad genética, para así analizar la estructura en poblaciones (Launey *et al.*, 2002). Los marcadores moleculares neutros no se ven afectados por la selección a diferencia de otros como las alozimas, por ello es posible detectar cambios de la deriva génica y por lo tanto cuellos de botella en las poblaciones de interés (Galindo-Sánchez *et al.*, 2008).

Aprovechando las ventajas del uso de los marcadores neutros y la relevancia del aprovechamiento del recurso ostión del placer, el objetivo de este estudio fue Identificar si existen diferencias genéticas y estructura poblacional de *C. corteziensis* en la costa oriental del Golfo de California mediante marcadores de ADN (microsatélites).

## II. ANTECEDENTES

### *Biología y ecología de Crassostrea corteziensis*

Actualmente existen varios estudios del ostión de placer enfocados a su biología y ecología, entre los que destaca el de Stuardo & Martínez (1975) quienes estudiaron las relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología de poblaciones de *C. corteziensis*, en San Blas, Nayarit. En este estudio se concluye, en primer lugar, que existe una variación cíclica anual de temperatura caracterizada por una disminución entre noviembre y marzo con un mínimo a los 23 °C y un aumento posterior hasta un máximo de 32 °C. La salinidad es relativamente uniforme, cercana a la del agua de mar, excepto en años muy lluviosos en que puede llegar a 0.00 ups en las partes alejadas de las bocas de los esteros. La madurez gonádica, y en particular el desove con la presencia consiguiente de larvas velíferas (estadio que dura aproximadamente 18-22 días) en el plancton, parecen seguir a la variación cíclica de la temperatura. El crecimiento de *C. corteziensis* en esta área es rápido, alcanzando 70 y 75 mm de longitud en los primeros 7 meses de vida, pero el ritmo es particularmente rápido durante los dos primeros meses, llegando a ser de aproximadamente 40 mm de crecimiento máximo. Hasta los 100 ó 110 mm el ritmo puede ser igual a 10 mm de crecimiento máximo por mes. Además se menciona que la depredación sobre las poblaciones estudiadas parece ser considerable en ciertos tamaños críticos, siendo efectuada principalmente por el pez *Sphoeroides annulatus*, denominado vulgarmente "botete", y en segundo término por jaibas del género *Callinectes*. Por otra parte, Cáceres-Puig (2007) llevó a cabo un estudio del efecto de la temperatura en el crecimiento y supervivencia de semilla de ostión de placer *C. corteziensis*, en condiciones de laboratorio, donde observó un crecimiento mayor de juveniles a temperaturas medias de 24, 26, 28 y 30 °C, y el crecimiento fue sensiblemente menor a 32 °C.

Existen estudios a cerca de la reproducción del ostión de placer, tales como el de Cuevas-Guevara (1978), quien realizó un estudio gonádico en San Blas, Nayarit, donde además de *Palmula carpenter* y *Crassostrea iridescens*, incluye a *C. corteziensis*. Este autor encontró que el desove de esta especie inicia

en mayo, y que en el ciclo de las especies estudiadas se distinguieron 5 etapas, que siguen en gran medida la diferenciación de fases establecidas por Stuardo & Martínez (1975), caracterizada por la estructura de la gónada y la cantidad y el estado de los gametos. Frías-Espericueta *et al.* (1997), estudiaron los cambios temporales del estado gonádico de *C. iridescens* y *C. corteziensis* en la costa noroeste de México, en el cual encontraron que las variaciones estacionales en el estado gonádico fueron evidentes para las dos especies, *C. iridescens* presentó sólo un periodo máximo en el año, mientras que *C. corteziensis* presentó dos periodos máximos. Señalaron que posiblemente esta situación está relacionada con las contrastables condiciones ambientales que prevalecen en cada sitio en donde cada especie habita.

Páez-Osuna (1991), estudió la variación estacional de la composición química del ostión de mangle o de placer, en la parte meridional del Puerto de Mazatlán, México, de octubre de 1987 a julio de 1988, y encontró que la composición química de la porción comestible de *C. corteziensis* es: 83.6% de humedad; 3.0% de minerales, 7.3% de proteínas, 1.7% de grasas, 4.5% de carbohidratos, 0.8% de calcio, y 0.1% de magnesio, lo cual indica el importante valor alimenticio de este molusco.

En un estudio sobre identificación y cuantificación de larvas pediveliger de *C. corteziensis* y balánidos en el plancton de dos esteros de San Blas, Nayarit, Cortés-Guzmán (1978), reportó que existen claramente dos periodos de presencia y abundancia de las larvas pediveliger, los cuales comprenden de octubre a marzo y durante julio, mientras que las larvas de balánidos aparecieron casi todo el año, excepto agosto y septiembre, con máxima abundancia en mayo. El autor constata alternancia con respecto a la presencia de las larvas de balánidos con las de ostión, y menciona que comúnmente a un incremento de larvas de ostión corresponde un descenso de larvas de balánidos y viceversa.

También se han realizado trabajos en cultivo de *C. corteziensis*, como el de Mazon-Suastegui, *et al.* (2002), quien llevo a cabo un cultivo a partir de semilla producida en laboratorio, en el cual señala que a los diez meses de cultivo, el 97.5% de los ostiones sembrados en junio superaron los 8 cm de longitud,

aunque se obtuvieron los primeros individuos cosechables a partir de los 6 meses de iniciado el cultivo.

### *Variabilidad y diferenciación genética en ostiones (Crassostrea sp)*

Existen varios estudios recientes en genética poblacional, referentes al género *Crassostrea*, entre estos está el de Colin *et al.* (2006) quienes examinaron la estructura poblacional de *Crassostrea virginica* en la Bahía de Chesapeake, utilizando ocho loci microsatelites. Se observó un déficit de heterocigotos en relación con las expectativas de Hardy-Weinberg en todos los loci, atribuyendolo a la presencia de alelos nulos. Sin embargo, las pruebas genotípicas demostraron niveles significativos de diferenciación geográfica en general, y fue observado un patrón sutil de aislamiento por distancia. También se realizaron comparaciones entre grupos de edad, las cuales no mostraron diferencias en la frecuencia de los genotipos, la riqueza alélica, la diversidad de genes o la diferenciación según lo medido por  $F_{ST}$ . El patrón de aislamiento por distancia refleja un equilibrio evolutivo, debido al flujo genético local predominante, o a la influencia, en cualquier dirección de las recientes actividades antropogénicas.

Posteriormente, Galindo-Sánchez, *et al.* (2008) realizaron un estudio de diversidad genética de *C. virginica* en seis lagunas costeras del estado de Veracruz, México, usando microsátélites donde se demuestra que estos marcadores moleculares son una herramienta muy eficiente para detectar la variabilidad genética. En este trabajo se obtuvo una alta variabilidad genética, a pesar de un déficit de heterocigotos en dos de cinco loci, debido a la presencia de alelos nulos. Se observó una moderada estructura genética poblacional sin un claro patrón geográfico, mismo que se asemeja más al modelo de “parqueo genético caótico”, asumiendo que se encuentra modelada por un sistema de corrientes temporal, por efecto del movimiento de organismos debido a actividades humanas, y por el aislamiento de algunas lagunas debido a factores físicos, en combinación con la variación estocástica en la reproducción, sobrevivencia y dispersión larval.

Hong & Ruihai (2008), llevaron a cabo un análisis de la diferenciación genética y las relaciones entre *Crassostrea plicatula* y *C. gigas* en poblaciones de China por medio de la técnica de microsatélites. Siete loci se utilizaron para evaluar cinco poblaciones para cada especie. Todos los loci mostraron polimorfismo para todas las poblaciones, como se observa en el número promedio de alelos por locus (19.1-28.1), y el promedio de heterocigosidad esperada (0.891-0.954). Reportaron desviaciones significativas al equilibrio de Hardy-Weinberg, debido a la deficiencia de heterocigotos que se observaron en la mayoría de las poblaciones, causada por la presencia de alelos nulos. Los valores de  $F_{ST}$  mostraron diferenciación genética significativa entre las poblaciones de *C. plicatula* y *C. gigas*. De acuerdo con la distancia genética, las diez poblaciones se dividen en dos grupos distintos (*C. plicatula* y *C. gigas*). Los resultados aquí presentados sugieren que los marcadores de microsatélites tienen un gran potencial para la diferenciación de las poblaciones de *C. plicatula* y *C. gigas*. Finalmente agregan que la información obtenida en este estudio tiene importantes implicaciones para el manejo adecuado y la conservación de estos recursos.

Huvet *et al.* (2000), observaron alta variabilidad genética de *C. gigas*, dentro de la zona. Asimismo, analizaron si *C. gigas* y *C. angulata* deben ser agrupadas dentro de la misma especie. Además, estudiaron mediante marcadores de microsatélites, así como ADN mitocondrial las poblaciones de *C. gigas* y *C. angulata* de Europa y Asia, con el fin de estimar su diversidad genética y la diferenciación. El análisis de distancias genéticas y la distribución de frecuencias alélicas y haplotipos reveló importantes diferencias genéticas entre los taxones, mostrando dos grupos: 1) las poblaciones de *C. gigas* en Francia y Japón, y 2) las poblaciones taiwanesa y portuguesa de *C. angulata*. Con este estudio se confirmó el origen asiático de *C. angulata*. Además, a diferencia de estudios previos basados en alozimas, se observaron diferencias significativas de genoma nuclear entre *C. angulata* y *C. gigas*.

Buroker *et al.* (1979) estudiaron los niveles de variación genética, estimaciones de similitud genética y la distancia en poblaciones de *C. gigas* y *Saccostrea commercialis*, utilizando alozimas. En este estudio encontraron que la similitud genética entre las diferentes poblaciones geográficas de ambas especies

fue de aproximadamente 99%. La distancia genética y la similitud de los datos derivados de esta investigación, dio lugar a algunas reclasificaciones provisionales. La ostra portuguesa *C. angulata* se consideró como una reciente colonización aislada de *C. gigas*.

Entre otros estudios de aportación y beneficio a la genética de poblaciones, está el de Sekino *et al.* (2003) quienes argumentan el potencial de los microsatélites como una herramienta genética para la comprensión de la estructura genética de *C. gigas*. En este trabajo identificaron nueve loci microsatelites, de los cuales 8 mostraron una variación alélica (número de alelos, 2-20; heterocigosidad observada, 0.119-0.925; heterocigosidad esperada, 0.139-0.914). Se observó desequilibrio de Hardy-Weinberg en un locus, debido a una deficiencia de heterocigotos aparente. Varios loci fueron amplificados con éxito en 3 especies relacionadas: 6 loci en *C. sikamea*, 4 loci en *C. ariakensis*, y 5 loci en *C. nippona*.

Li *et al.* (2003) llevaron a cabo un estudio donde identificaron 79 marcadores de ADN (microsatélites), para *C. gigas*. Detectaron alelos nulos en 41 (51,9%) de los 79 loci. Estos marcadores amplificaron en otras especies como *C. angulata*, *C. sikamea*, *C. ariakensis* y *C. virginica*. Posteriormente Li *et al.* (2009) identificaron 15 loci microsatélites polimórficos para *C. gigas*, donde el número de alelos por locus varió de dos a 24 con un promedio de 8.7, y los valores de la heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada fueron de 0.026 a 0.750 y 0.120 a 0.947, respectivamente. No se encontró desequilibrio significativo de ligamiento entre pares de loci, y ocho loci se ajustaban a equilibrio de Hardy-Weinberg. Examinaron la transferibilidad de los marcadores en otras cinco especies y todos amplificaron con éxito en al menos una de ellas. Además añaden que estos microsatélites son útiles para genética de poblaciones, análisis de paternidad, así como estudios de mapeo del genoma de *C. gigas* y especies relacionadas.

Para *C. corteziensis* en particular, los pocos estudios genéticos realizados se han llevado a cabo por medio de alozimas. A pesar de que estas proteínas han sido de gran utilidad para analizar variabilidad genética en moluscos bivalvos,

se ha observado también que esta puede ser subestimada debido al bajo polimorfismo que presentan (Launey *et al.*, 2002). Entre estos se encuentra el estudio de Hedgecock & Okazaki (1984), quienes realizaron un análisis filogenético en especies de *Crassostrea*. Reportaron que una población de *C. corteziensis* de San Blas, Nayarit, presentó valores moderadamente altos de diversidad genética con un promedio de 2.07 alelos por locus, un 67% de loci polimórficos y una heterocigosidad esperada del 20%. Por otra parte, Rodríguez-Romero *et al.* (1988), mediante un análisis basado en electroforesis de proteínas entre poblaciones de dos lagunas costeras de Nayarit con condiciones de salinidad distintas, indicaron una baja diferenciación genética entre localidades, sin descartarse la posibilidad de diferenciación en un rango geográfico más amplio.

El único estudio previo al presente, es el de Perez-Enriquez *et al.* (2008), quienes llevaron a cabo un análisis de diversidad y estructura genética de la población natural de *C. corteziensis* en cinco localidades entre Sonora y Nayarit, en el Golfo de California. El análisis con alozimas mostró un amplio flujo genético en el área de estudio, que indica que la población no se encuentra estructurada, además de una gran diversidad genética. Ellos mencionaron que el elevado flujo genético detectado con el análisis alozimático indica que esta especie está conformada por una sola población panmíctica a lo largo del área de estudio. El tiempo de vida en estado larvario, de aproximadamente 18–22 días aunado al régimen de corrientes de la región, se puede considerar la causa del elevado flujo genético. Además señalaron que la diversidad genética observada indica un importante potencial de manejo, tanto para la selección como para la recuperación de las poblaciones naturales.

Por último, para estudios de este tipo, el desarrollo de marcadores polimórficos como loci microsatélites es importante para entender la estructura y variabilidad genética de estas especies. Ya que los microsatélites revelan mayor polimorfismo que los métodos antes mencionados. Cruz *et al.* (2007), identificaron diez microsatélites polimórficos para *C. corteziensis* a partir de la conformación de genotecas enriquecidas, señalando su potencial aplicación para estudios poblacionales para esta especie.

### III. JUSTIFICACIÓN

El ostión de placer *C. corteziensis*, tiene una demanda importante en el mercado regional y nacional, su reducida explotación pesquera y su potencial para acuicultura lo convierten en un candidato para su aprovechamiento, así como la alta fecundidad de este molusco, que puede llegar a producir hasta 60 millones de huevecillos, le otorga un enorme potencial para su explotación industrial. Esta especie es ampliamente aprovechada por el ser humano como alimento por su alto valor nutritivo, debido a la facilidad con que se obtiene y los múltiples métodos para lograrlo, desde la captura a mano, hasta grandes cultivos ostrícolas. Los mayores productores de ostión en el mundo son Japón, Francia, Estados Unidos, España, Chile, Australia y México.

La pesca y el cultivo de ostiones comerciales es una práctica común en las lagunas costeras de los golfos de México y de California. Este producto pesquero resulta ser uno de los invertebrados estuarinos con mayores beneficios para el país. Ha sido capturado artesanalmente desde hace años en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, ya que de las ostras más abundantes y comunes en la costa del Pacífico mexicano destaca *C. corteziensis*, sin embargo su cultivo todavía está en desarrollo.

Por lo tanto, tomando en cuenta la relevancia del recurso, es necesario realizar estudios para conocer si existen diferentes poblaciones en su rango de distribución, lo cual tiene implicaciones para el manejo pesquero, cultivo y repoblamiento de la especie, con el fin de utilizar la especie como recurso sustentable.

## **IV. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Identificar si existen diferencias genéticas poblacionales (estructura poblacional) y niveles de variabilidad genética apropiados en *C. corteziensis* en la costa oriental del Golfo de California mediante marcadores de ADN (microsatélites).

### **Objetivos específicos**

1. Determinar la diversidad genética por localidad de *C. corteziensis*.
2. Determinar la estructura poblacional de *C. corteziensis*.
3. Determinar el flujo genético entre las localidades.
4. Establecer la correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas de *C. corteziensis*.

## **V. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1 Área de estudio**

El área de estudio es la costa oriental del Golfo de California, conformada por los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit; específicamente cuatro localidades: Bahía de Lobos (Guaymas, Sonora), Las Glorias (Guasave, Sinaloa), Bahía de Ceuta (Culiacán, Sinaloa) y Boca de Camichín (Nayarit), que se encuentran entre dos de las áreas en que se divide el Golfo de acuerdo a sus características oceanográficas: la zona de entrada y la zona sur (Lavin & Marinone, 2003) ó también llamadas: región central y la región sur, respectivamente (Hubbs & Roden, 1964; Case & Cody, 1983) (Fig. 2).

En general el Golfo de California se distingue por ser una transición de zonas geográficas y cualidades hidrodinámicas singulares, la costas de los estados antes mencionados, presenta una característica muy importante que son las surgencias estacionales; y a lo largo de ellas se encuentran numerosos esteros, así como lagunas costeras (Lavin & Marinone, 2003). Las lagunas situadas en la región norte reciben muy poca agua dulce proveniente de la precipitación sobre el continente (Case & Cody, 1983). Su desarrollo está relacionado con las mareas (Case & Cody, 1983). En la parte media-sur continental, desde Guaymas, Sonora a San Blas, Nayarit, hay una serie continua de estas lagunas costeras, con presencia de manglar, que reciben agua dulce proveniente de la precipitación pluvial y del escurrimiento de drenes agrícolas, así como de unos pocos ríos en el caso de Nayarit (Case & Cody, 1983).

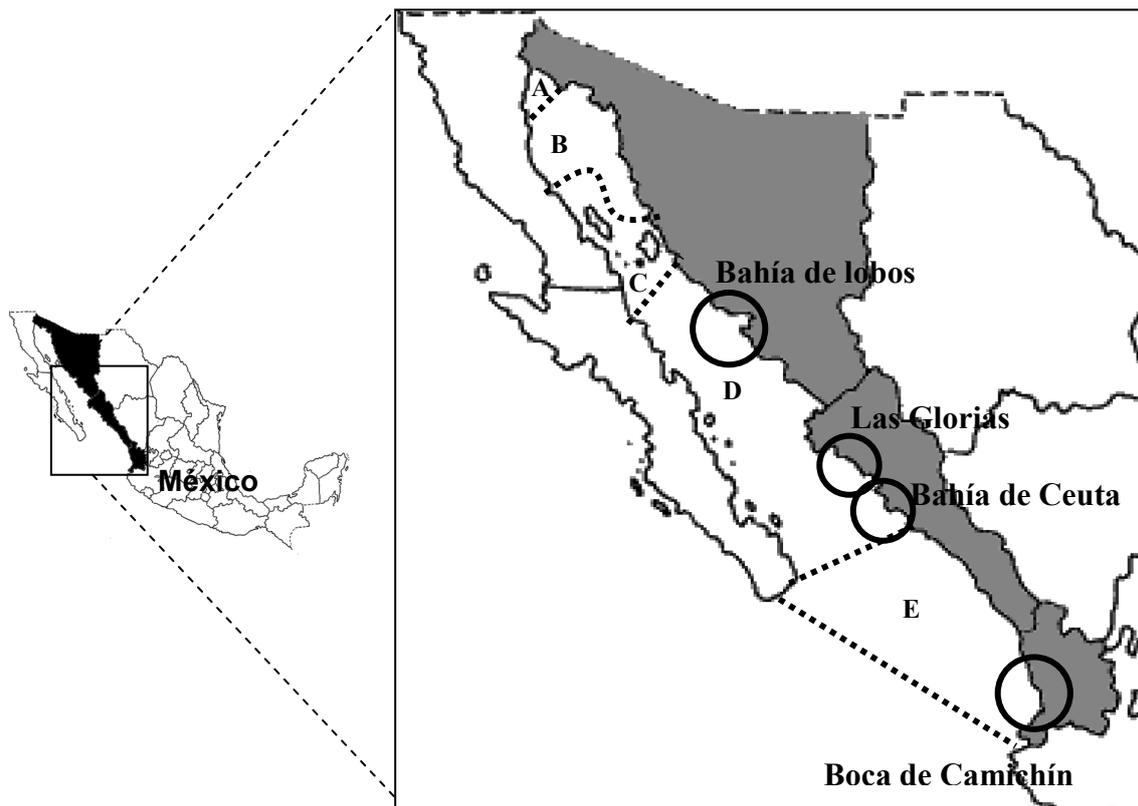
La zona del golfo central se encuentra entre el límite sur de la región de las grandes islas hasta la bahía de Topolobampo en el este, y la bahía de la Paz al oeste. Sus cuencas marinas son profundas. La mayor depresión en todo el golfo de California es la cuenca de Guaymas, con una longitud cercana a los 220 Km y con profundidades de hasta 2,000 m. La amplitud de mareas en el golfo Central es menor que en la parte norteña del golfo, con un promedio de 1.5 m. Las

corrientes de marea son menos importantes que las creadas por el efecto de los vientos. Esta región, donde se localiza el mayor número de islas, presenta importantes zonas de surgencias estacionales en ambas costas. Se registra una fuerte estacionalidad en la temperatura superficial con valores de 16 °C de febrero a marzo, y de 31 °C en agosto, cuando alcanza diferencias de temperatura de alrededor de 16 °C, entre la superficie y los 150 m de profundidad (Hubbs & Roden, 1964; Case & Cody, 1983).

La región sur está en comunicación abierta con el océano Pacífico tropical oriental a través de la boca de aproximadamente 200 Km. de ancho y de cuencas cuya profundidad excede a los 3,600 m. Su estructura hidrográfica es complicada debida a la confluencia de distintas masas de agua en la boca del golfo. Es un hecho que el extremo sur de esta región del Golfo de California está fuertemente influenciada por las aguas del Océano Pacífico; ahí tienen lugar los mayores oleajes. La amplitud de mareas en la zona es de 1 m, la más baja que se registra en el golfo. La influencia de las tormentas tropicales también provoca grandes olas. En julio y agosto las tormentas viajan del oeste al noreste y azotan el sureste de la península de Baja California o las islas de Revillagigedo. En los otros meses, la mayoría de las tormentas se dirigen hacia el noreste y afectan la línea costera desde el Golfo de Tehuantepec hasta el norte de Guaymas (Hubbs & Roden, 1964; Case & Cody, 1983).

## **5.2 Obtención de muestras**

Se recolectaron entre 40 y 50 organismos de *C. corteziensis* en cuatro localidades de la región noroeste de México: Bahía de Lobos (Guaymas, Sonora), Las Glorias (Guasave, Sinaloa), Bahía de Ceuta (Culiacán, Sinaloa) y Boca de Camichín (Nayarit) (Fig. 2). Los organismos se transportaron vivos o congelados al Laboratorio de Genética Acuícola del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) de acuerdo con el método propuesto por Hegdecock & Okazaki (1984), en donde se procedió a su disección. Una pieza de músculo aductor se removió de cada organismo, las cuales se preservaron en etanol al 95%, y se almacenaron a 4°C hasta la extracción de ADN. En el anexo I se incluye la localización georeferenciada de las zonas de recolecta.



**Figura. 2.** Área de estudio y localidades de recolecta de las muestras de *C. corteziensis* en la costa oriental del Golfo de California. Las líneas punteadas indican la división del Golfo de California en diferentes zonas según Lavin & Marinone (2003): A) zona superior, B) zona norte, C) el archipiélago, D) zona sur, y E) zona de entrada.

### 5.3 Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN total de cada organismo usando el kit de purificación Wizard® SV 96, el cual es un sistema de placas de 96 pozos con filtros, permitiendo obtener ADN puro en un tiempo estimado de una hora y en gran cantidad de muestras en función del número de placas utilizadas. Finalmente se obtuvieron 400µl de ADN genómico total de cada individuo y se almacenaron a 4 °C.

## 5.4 Análisis de microsatélites (ADN nuclear)

### *Amplificación de los microsatélites*

Se analizaron seis loci microsatélites polimórficos, previamente descritos por Cruz *et al.* (2007): Ccor8, Ccor10, Ccor 11, Ccor 21, Ccor26 y Ccor28 (Tabla 1) mediante amplificación por *PCR* (Reacción en Cadena de la Polimerasa). La amplificación se realizó en una mezcla de reacción de 6.0µl como volumen total, conteniendo 1 µl de DNA, 0.18 µM MgCl<sub>2</sub>, 0.12 mM cada dNTP, 0.025 U *Taq* polimerasa (Invitrogen) y 0.6 de buffer para polimerasa 1X. Las condiciones de amplificación fueron: 5 minutos de desnaturalización a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a la temperatura de alineamiento (50 °C) y un minuto de extensión a 72 °C; y finalmente una extensión a 4 °C por 15 min (Cruz *et al.*, 2007).

**Tabla 1.** Características de los seis loci microsatélites analizados (Cruz *et al.*, 2007).

Locus	Repetición	Secuencia de primers (5' - 3')	Rango de tamaño (pares de bases)
<b>Ccor8</b>	(CT) <sub>29</sub>	F: TGACGCAAGCATCTGTCAGT R: GAGACCTAGAGGGGTGTTTCAA	176-200
<b>Ccor10</b>	(CT) <sub>8</sub>	F: TCCAGGGAGACGAAGCTTTA R: TGAAGTTGAATGACGCAGAGA	185-221
<b>Ccor11</b>	(GT) <sub>13</sub>	F: TCTCTGCGTCATTCAACTTCA R: GAATCACGAACGAATGCTTG	209-259
<b>Ccor21</b>	(GT) <sub>11</sub>	F: CCCCCTTTCTGATGTTTATT R: TGGCTTGTTTACAGCCAATG	129-184
<b>Ccor26</b>	(CA) <sub>28</sub> (GA) <sub>24</sub>	F: CGGTGACCTGTATTGACAGC R: AAATGAACTGCAGGTATATTGTTCA	136- 213
<b>Ccor28</b>	(CT) <sub>31</sub>	F: TTTGTGTGTGTTGATCCAATCAT R: TTCGAATATCTGTGACTAGAATCCA	134-186

## *Electroforesis y visualización*

Los productos amplificados se corrieron por electroforesis en geles de poliacrilamida 7.5 M, 5% de Urea (Anexo II). Los fragmentos de ADN se visualizaron mediante un analizador de imágenes (FMBIO III), después de la tinción del gel en SYBR Gold (Rodzen *et al.*, 1998) (Anexo II). Los alelos se asignaron usando una escalera de secuenciado del kit SequiTherm Cycle Sequencing (Epicentre Tech).

## **5.5 Análisis estadístico**

### *Variabilidad genética*

A partir de los datos de los genotipos de los seis loci microsatélites y con la ayuda de la utilidad MsTools (Park, 2001) para el programa Excel de Microsoft Office 2003, se crearon las bases de datos para los diferentes formatos de los programas empleados en el análisis estadístico.

Para cada población y locus, se calcularon las frecuencias alélicas, número de alelos ( $A$ ), heterocigosidad observada ( $H_O$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_E$ ), usando el software ARLEQUIN 3.1. El número efectivo de alelos ( $n_e$ ) se calculó según Hartl & Clark (1997). El índice de endogamia ( $F_{IS}$ ) se calculó según Weir & Cockerham (1984) mediante el software GENEPOP 4.0 (10,000 permutaciones). Se evaluó si las muestras se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg (EH-W) en base a las estimaciones del índice de fijación  $F_{IS}$ , utilizando el software GENEPOP 4.0. Los niveles de significancia se establecieron a 10,000 permutaciones. Se determinó si existía desequilibrio de ligamiento entre pares de loci analizados, usando el programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

Se revisaron los errores genotípicos (alelos nulos, “bandas fantasma” o stutters, “allelic drop out”) mediante el programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004), el cual utiliza bases de datos con formato GENPOP.

### *Estructura genética poblacional*

Como método exploratorio para visualizar si existían diferencias genéticas entre las localidades se realizó un análisis factorial de correspondencia, utilizando el programa GENETIX 5.05.2 (Belkhir, 2004).

Se evaluó la estructura genética poblacional mediante estimaciones de  $F_{ST}$  (índice de fijación) (Weir & Cockerham, 1984), en donde  $F_{ST}$  es una medida de la reducción proporcional de genotipos heterocigotos entre localidades, esto mediante el software GENEPOP 4.0. Se analizaron los  $F_{ST}$  utilizando 10,000 permutaciones con el software ARLEQUIN 3.1. Se realizó un análisis factorial de correspondencia, para observar la agrupación del total de individuos en el área de estudio, mediante el software GENETIX 4.0. Con el software STRUCTURE 2.2 se evaluó también la estructura genética poblacional

Los niveles de significancia para valores de variabilidad genética se ajustaron usando correcciones secuenciales de Bonferroni (Rice, 1989).

Los niveles de estructura poblacional fueron determinados mediante un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) utilizando el estadístico  $F$ , a través del programa ARLEQUIN 3.1, separando en tres grupos diferentes el total de localidades: Bahía de Lobos vs Las Glorias-Bahía de Ceuta vs Boca de Camichín, esto tomando en cuenta las distancias geográficas entre cada una de las localidades siguiendo el criterio de que a mayor distancia geográfica, mayor distancia genética.

### *Aislamiento genético por distancia geográfica*

Mediante el software GENEPOP 4.0, se aplicó una prueba de Mantel con 1000 permutaciones para evaluar la posible correlación entre diferenciación genética y distancia geográfica, usando los valores de  $F_{ST}$  pareados y distancias geográficas linearizadas entre pares de muestras (Rousset, 1997).

### *Número de migrantes y tamaño efectivo poblacional*

Se estimó el número de migrantes ( $Nm$ ) de cada localidad a partir del modelo propuesto por Wright (1931), donde se considera una relación entre los migrantes que recibe una población por generación con los valores de  $F_{ST}$  a partir de la fórmula  $Nm = (1-F_{ST})/(4F_{ST})$ , esto asumiendo equilibrio entre migración y deriva. La estimación de  $Nm$  se realizó de manera pareada entre localidades, considerando los valores de  $F_{ST}$  linearizados:  $F_{ST}/(1-F_{ST})$  (Slatkin, 1995). El tamaño efectivo poblacional se calculó a partir del modelo de Ohta y Kimura (1973) de acuerdo con García de León *et al.* (1997).

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Variabilidad genética

La variabilidad genética de *C. corteziensis* en cuatro localidades de la costa oriental del Golfo de California con seis loci microsatélites se muestra en la tabla 2, y se describe a continuación.

#### *Análisis por locus*

El rango en el número medio de alelos por locus ( $A$ ) considerando todas las poblaciones fue de 16 (Ccor21) a 39 (Ccor26), mientras que el número efectivo de alelos ( $ne$ ) fue de 3.6 (Ccor21) a 26.6 (Ccor28).

La heterocigosidad media observada ( $H_O$ ) fue de 0.078 (Ccor21) a 0.860 (Ccor28), mientras que la esperada ( $H_E$ ) por locus se encontró en el rango de 0.779 (Ccor21) a 0.973 (Ccor26).

De acuerdo con lo anterior, considerando tanto el número de alelos, el número efectivo de alelos y la heterocigosidad, el locus menos polimórfico fue Ccor21 ( $A= 16$ ,  $ne= 3.6$ ,  $H_O= 0.078$ ,  $H_E= 0.779$ ), por el contrario los loci más polimórficos fueron Ccor28 ( $A= 38$ ,  $ne= 26.6$ ,  $H_O= 0.860$ ,  $H_E= 0.972$ ), Ccor26 ( $A= 39$ ,  $ne= 26.5$ ,  $H_O= 0.814$ ,  $H_E= 0.973$ ) y Ccor11 ( $A= 34$ ,  $ne= 24.0$ ,  $H_O= 0.758$ ,  $H_E= 0.968$ ).

**Tabla 2.** Variabilidad genética para seis loci microsátélites de *Crassostrea corteziensis*, en cuatro localidades de la costa oriental del Golfo de California. Bahía de Lobos (BLo), Las Glorias (LGI), Bahía de Ceuta (BCe) y Boca de Camichín (BCa).

A = Número de alelos; (n) = tamaño de muestra; ne = número efectivo de alelos;  $H_O$  = heterocigosidad observada;  $H_E$  = heterocigosidad esperada y  $F_{IS}$  = en negritas desviaciones significativas al EH-W de acuerdo a Weir y Cockerman (1984).  $p < 0.05$  después de la corrección secuencial de Bonferroni.

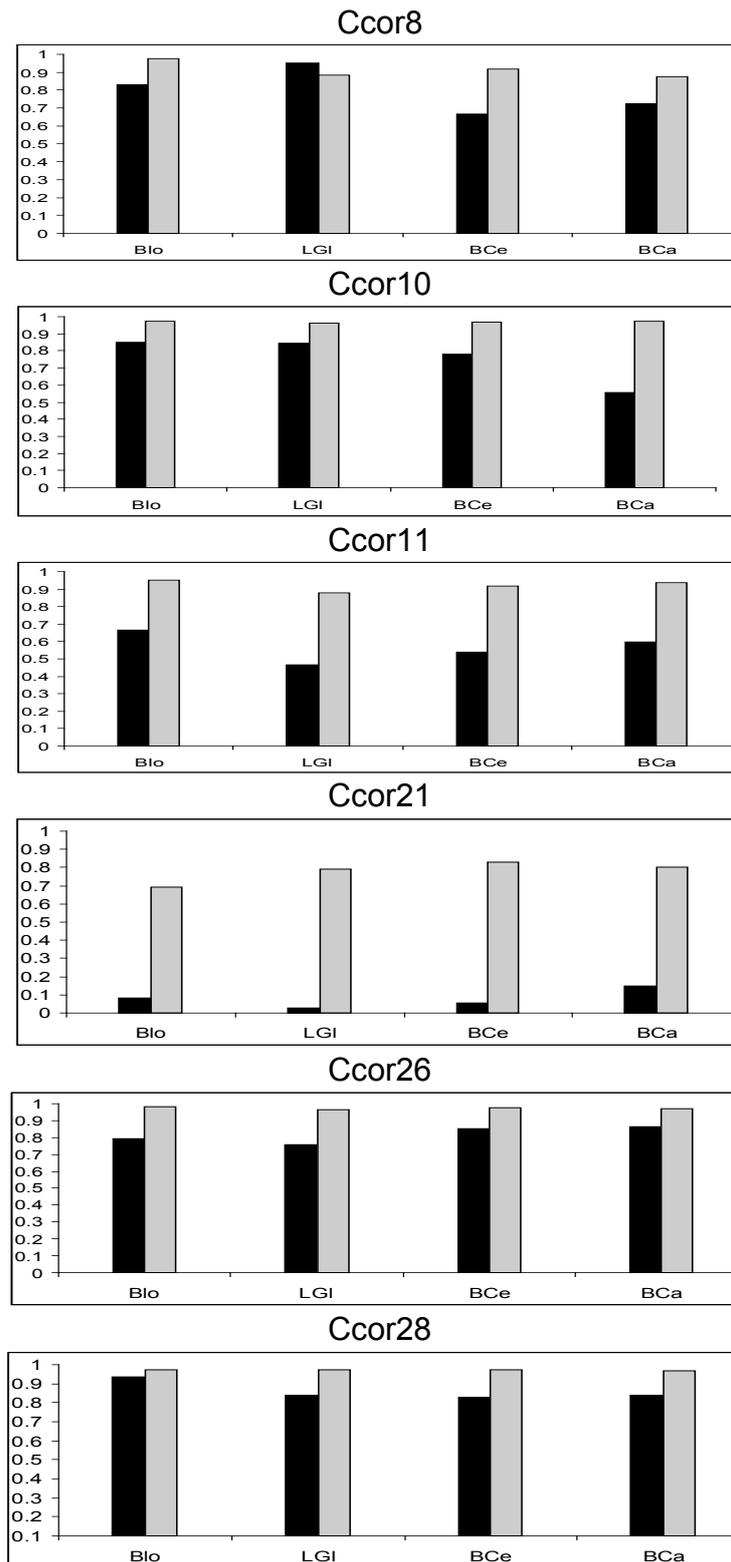
Locus	Población					Promedio
	BLo	LGI	BCe	BCa		
<b>Ccor8</b>	<i>A(n)</i>	27(50)	20(42)	21(48)	17(40)	21(45)
	<i>ne</i>	13.8	8	11.2	7.4	10.1
	$H_O$	0.829	0.952	0.666	0.725	0.793
	$H_E$	0.975	0.885	0.920	0.876	0.914
	$F_{IS}$	<b>0.233</b>	-0.076	<b>0.277</b>	<b>0.175</b>	<b>0.152</b>
<b>Ccor10</b>	<i>A(n)</i>	36(45)	22(43)	30(50)	32(42)	30 (45)
	<i>ne</i>	16.9	7.6	10.7	13.4	12.1
	$H_O$	0.666	0.465	0.540	0.595	0.566
	$H_E$	0.951	0.879	0.916	0.936	0.920
	$F_{IS}$	<b>0.301</b>	<b>0.473</b>	<b>0.412</b>	<b>0.367</b>	<b>0.388</b>
<b>Ccor11</b>	<i>A(n)</i>	39(47)	30(40)	33(50)	35(43)	34 (45)
	<i>ne</i>	27.9	19.1	24.0	25.1	24.0
	$H_O$	0.851	0.846	0.780	0.558	0.758
	$H_E$	0.974	0.960	0.968	0.971	0.968
	$F_{IS}$	<b>0.128</b>	0.120	<b>0.195</b>	<b>0.428</b>	<b>0.217</b>
<b>Ccor21</b>	<i>A(n)</i>	19(47)	9(37)	15(36)	20(41)	16 (40)
	<i>ne</i>	3.1	2.2	4.5	4.6	3.6
	$H_O$	0.085	0.027	0.055	0.146	0.078
	$H_E$	0.693	0.789	0.831	0.803	0.779
	$F_{IS}$	<b>0.878</b>	<b>0.953</b>	<b>0.93</b>	<b>0.817</b>	<b>0.894</b>
<b>Ccor26</b>	<i>A(n)</i>	46(43)	29(34)	41(40)	38(36)	39 (31)
	<i>ne</i>	34.2	19.2	28.3	24.4	26.5
	$H_O$	0.790	0.757	0.85	0.861	0.814
	$H_E$	0.982	0.962	0.976	0.972	0.973
	$F_{IS}$	<b>0.196</b>	<b>0.215</b>	<b>0.131</b>	<b>0.116</b>	<b>0.164</b>
<b>Ccor28</b>	<i>A(n)</i>	40(48)	39(43)	36(47)	38(43)	38 (45)
	<i>ne</i>	27.9	26.6	28.6	23.5	26.6
	$H_O$	0.937	0.837	0.829	0.837	0.860
	$H_E$	0.974	0.973	0.975	0.968	0.972
	$F_{IS}$	0.038	<b>0.141</b>	<b>0.150</b>	<b>0.137</b>	<b>0.116</b>
<b>Promedio</b>	<i>A(n)</i>	35 (47)	25(40)	29(45)	30 (41)	30 (42)
	<i>ne</i>	20.6	13.8	17.9	16.4	17.2
	$H_O$	0.693	0.647	0.62	0.620	0.645
	$H_E$	0.924	0.908	0.931	0.921	0.921
	$F_{IS}$	<b>0.295</b>	<b>0.304</b>	<b>0.349</b>	<b>0.340</b>	<b>0.322</b>

### *Análisis por localidad*

El número de alelos observados entre localidades y por cada locus, varió de 9 (Ccor21, Las Glorias) a 46 (Ccor26, Bahía de Lobos), el número efectivo de alelos fue de 2.2 (Ccor21, Las Glorias) a 34.2 (Ccor26, Bahía de Lobos). La heterocigosidad observada se encontró entre 0.027 (Ccor21, Las Glorias) y 0.952 (Ccor8, Las Glorias), la heterocigosidad esperada fue de 0.789 (Ccor21, Las Glorias) a 0.982 (Ccor26, Bahía de Lobos) (Tabla 2).

En 21 de 24 posibles pruebas se observaron desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg (E H-W). Las desviaciones al E H-W fueron causadas por un déficit de heterocigotos, es decir los valores de heterocigosidad observada fueron menores a los esperados. Solamente se presentó E H-W con los loci Ccor8 y Ccor11 en la localidad de Las Glorias y con el locus Ccor28 en Bahía de Lobos (Tabla 2). En la figura 3 se pueden observar las diferencias entre las heterocigosidades observadas y esperadas para dichos loci. Además no se encontró desequilibrio significativo de ligamiento entre pares loci.

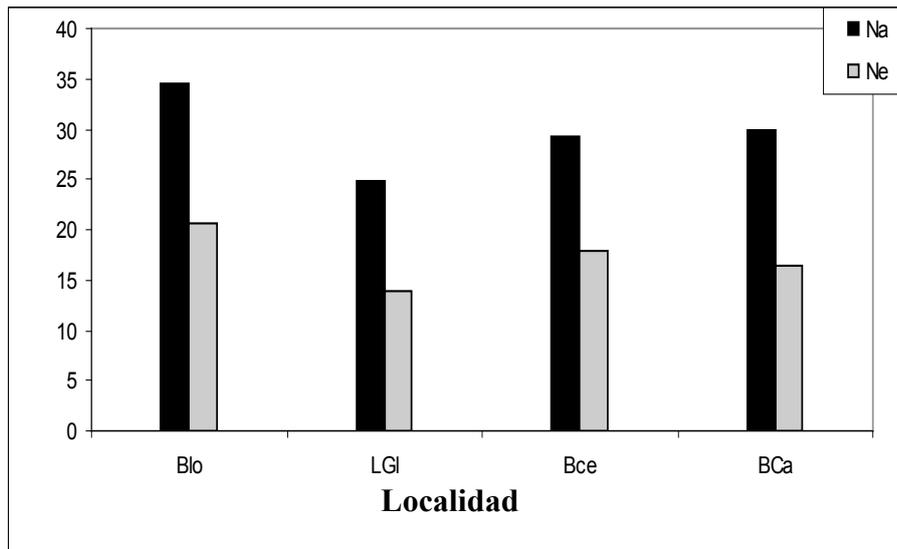
Los loci Ccor10, Ccor21, Ccor26 y Ccor28 presentan desviaciones al E H-W en todas las localidades (Tabla 2). El locus Ccor21 se distingue por tener los valores más altos de  $F_{IS}$  entre todas las localidades ( $F_{IS}$ = 0.817 a 0.953) y en el análisis global con todas las localidades ( $F_{IS}$ = 894), lo cual se observa claramente en las diferencias entre  $H_O$  y  $H_E$  (Fig. 4).



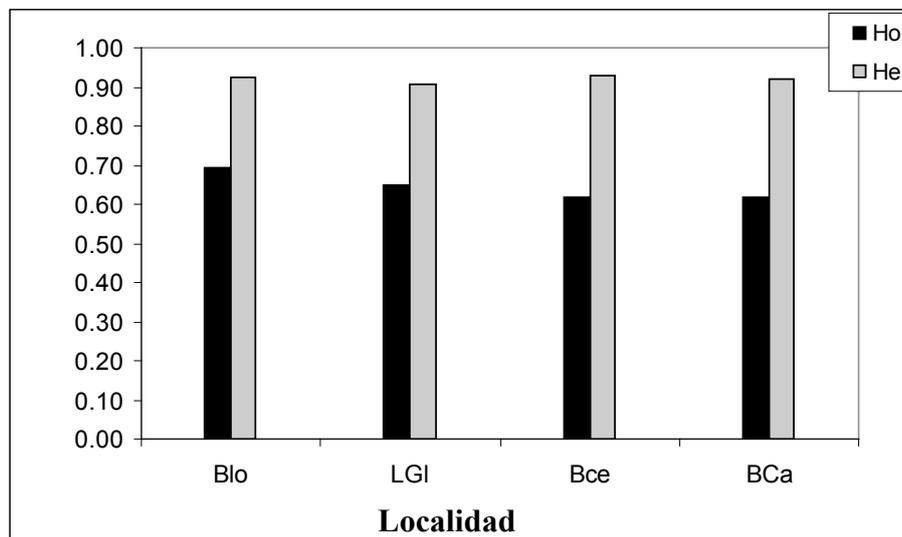
**Figura 3.** Heterocigosidades esperadas (negro) y esperadas (gris) en las cuatro localidades del área de estudio. Se pueden apreciar las diferencias entre  $H_0$  y  $H_E$  entre todas las localidades y todos los loci.

Considerando los valores medios de número de alelos ( $N_a$ ) y número efectivo ( $n_e$ ) para todos los loci entre las localidades, se observó que Las Glorias fue la localidad con la menor variabilidad genética ( $N_a = 25$ ,  $n_e = 13.8$ ) y Bahía de Lobos la de mayores valores ( $N_a = 35$ ,  $n_e = 20.6$ ) (Tabla 2, Fig. 4). Las heterocigosidades promedio mostraron valores cercanos entre localidades, la  $H_o$  fue de 0.620 (Bahía de Ceuta y Boca de Camichín) a 0.693 (Bahía de Lobos), mientras que la  $H_e$  solo varió entre 0.908 (Las Glorias) a 0.931 (Bahía de Ceuta) (Tabla 2, Fig. 4).

De acuerdo con lo anterior, los mejores indicadores de la variabilidad genética entre las localidades en este estudio fueron el número medio de alelos y el número efectivo de alelos.



A)



B)

**Figura 4.** Variabilidad genética promedio para cada localidad: A) Número de alelos ( $N_a$ ) - número efectivo de alelos ( $n_e$ ); B) Heterocigosidad esperada ( $H_E$ ) - Heterocigosidad observada ( $H_O$ ).

## 6.2 Déficit de heterocigotos y alelos nulos

Como se mencionó anteriormente al analizar el total de loci (Tabla 2), con excepción de algunos casos, se observó un déficit de heterocigotos en la mayoría de localidades. Se sospecho la presencia de alelos nulos como una de las causas de este déficit en el locus *Ccor21*, ya que en algunos individuos no se logró la

amplificación después de varios intentos, aun cambiando los parámetros en la PCR. Estos mismos individuos si dieron productos de PCR para el resto de los microsatélites analizados.

El programa MICRO-CHECKER sugirió la posible existencia de alelos nulos en todos los loci a excepción del locus Ccor28. En el caso del Ccor21 fue evidente la posibilidad de alelos nulos, por lo que se repitió el cálculo de los valores de  $F_{IS}$  en todas las localidades excluyendo a este locus. En la tabla 3 se muestran los valores de  $F_{IS}$  sin Ccor21, y se comparan los valores obtenidos anteriormente considerando todos los loci.

**Tabla 3.** Valores de  $F_{IS}$  con y sin el locus Ccor21.

<b>Localidad</b>	<b><math>F_{IS}</math> Todos los loci</b>	<b><math>F_{IS}</math> Sin Ccor21</b>
BLo	0.295	0.179
LGI	0.304	0.183
BCe	0.349	0.233
BCa	0.340	0.244

### 6.3 Diferenciación genética interpoblacional

El valor de  $F_{ST}$  multilocus, aun cuando fue bajo (0.010) fue significativamente diferente de cero ( $p < 0.05$ ), lo que indica que hay una distribución heterogénea de la variabilidad genética de esta especie dentro del total de las localidades (Tabla 4).

**Tabla 4.** Valores de  $F_{IS}$  y  $F_{ST}$  de las cuatro localidades en *C. corteziensis*. En la tabla se muestran los seis loci utilizados en este trabajo. Los valores en negritas son significativamente diferentes de cero,  $p < 0.05$ .

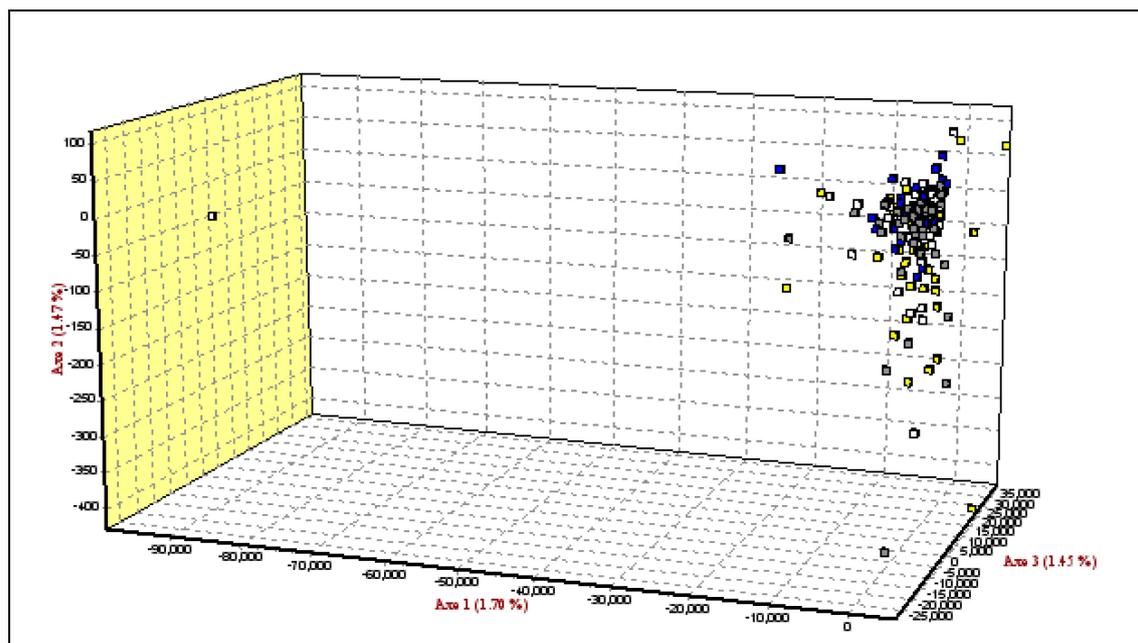
<b>Locus</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b><math>F_{ST}</math></b>
Ccor8	<b>0.152</b>	0.004
Ccor10	<b>0.388</b>	<b>0.010</b>
Ccor11	<b>0.217</b>	<b>0.011</b>
Ccor21	<b>0.894</b>	<b>0.010</b>
Ccor26	<b>0.973</b>	<b>0.011</b>
Ccor28	<b>0.116</b>	<b>0.011</b>
Total	<b>0.322</b>	<b>0.010</b>

Los valores pareados de  $F_{ST}$  con la corrección secuencial de Bonferroni fueron significativos ( $p < 0.05$ ) en nueve de las diez comparaciones interpoblacionales (Tabla 5). No se observaron diferencias significativas entre las localidades más cercanas: Las Glorias y Bahía de Ceuta ( $F_{ST} = 0.005$ ,  $P = 0.072$ ). Los valores de  $F_{ST}$  significativos fueron muy bajos, del rango de 0.007 (BCe vs BLo) a 0.022 (BCa vs LGI), demostrando ligera diferenciación genética entre las localidades comparadas.

**Tabla 5.** Valores de  $F_{ST}$  pareados (bajo la diagonal) entre las cuatro localidades de la zona de estudio. El orden de las localidades va de norte a sur. Sobre la diagonal los valores de significancia estadística (P). En negritas se denotan las diferencias significativas ( $P < 0.05$  después de la corrección secuencial de Bonferroni).

	BLo	LGI	BCe	BCa
BLo	-	0.00		
LGI	<b>0.017</b>	-	0.072	
BCe	<b>0.007</b>	0.005	-	
BCa	<b>0.012</b>	<b>0.022</b>	<b>0.014</b>	-

En el análisis factorial de correspondencia, se observa que el total de individuos de todas las localidades conforman un solo grupo de acuerdo con las frecuencias alélicas en cada locus, esto se observa en la figura 5, donde los datos agrupados están sobre el mismo eje de gravedad.



**BLo** ■ **LGI** ■ **BCe** □ **BCa** ■

**Figura 5.** Análisis factorial de correspondencia

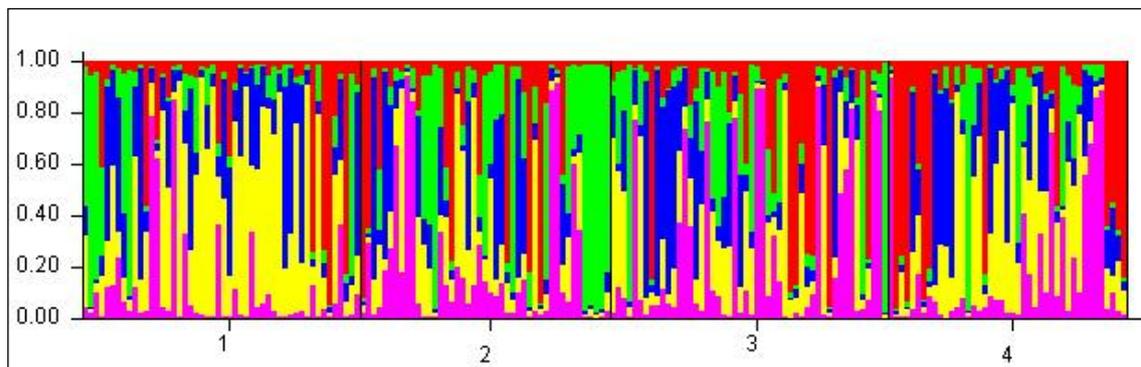
Con el Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) (Tabla 6) no se detectó una diferencia significativa entre los grupos probados (BLo vs LGI-BCe vs BCa) ( $F_{CT} = 0.002$ ,  $P = 0.170$ ), ni tampoco una diferencia entre localidades dentro de grupos (específicamente entre LGI y BCe, que son las localidades más cercanas) ( $F_{SC} = 0.009$ ,  $P = 0.0912$ ), solamente se observó una variación significativa al interior de las localidades ( $F_{ST} = 0.014$ ,  $P = 0.000$ ).

**Tabla 6.** AMOVA basado en 6 loci microsatélites de *C. corteziensis*. Tres grupos: Bahía de Lobos vs. Las Glorias - Bahía de Ceuta vs. Boca de Camichín.

Estructura probada	Porcentaje de variación	Fst	Varianza	P
<b>Entre grupos</b>	0.90	$F_{CT} = 0.002$	0.015	0.170
<b>Entre poblaciones dentro de grupos</b>	0.53	$F_{SC} = 0.011$	0.009	0.0912
<b>Dentro de poblaciones</b>	98.57	$F_{ST} = 0.014$	1.730	<b>0.000</b>

**En negritas valores estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ )**

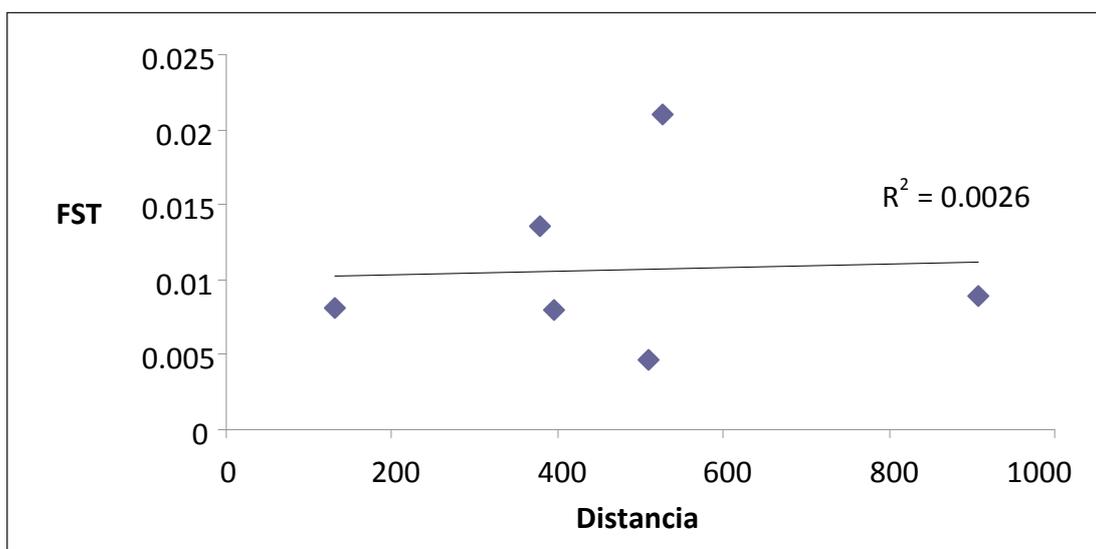
La prueba de asignamiento de individuos a diferentes poblaciones, indicó que no existen diferentes grupos genéticos, dicho de otra manera, no se observa una elevada estructura poblacional, si no una mezcla de los organismos de las diferentes localidades en el área de estudio, de acuerdo a sus genotipos multilocus (Fig. 6). Esta prueba indica que los individuos en promedio tienen la misma probabilidad de pertenecer a cualquier localidad.



**Figura 6.** Prueba de asignamiento. Los números representan las localidades en orden latitudinal y la gama de colores la probabilidad de cada individuo de pertenecer a determinada población.

#### 6.4 Flujo genético

La prueba de Mantel indicó que no existe ninguna asociación significativa entre los valores de  $F_{ST}$  y la distancia geográfica ( $r^2= 0.0026$ ,  $P= 0.41$  (Fig. 7).



**Figura 7.** Correlación entre distancias geográficas y distancias genéticas.

### 6.5 Número de migrantes y tamaño efectivo poblacional

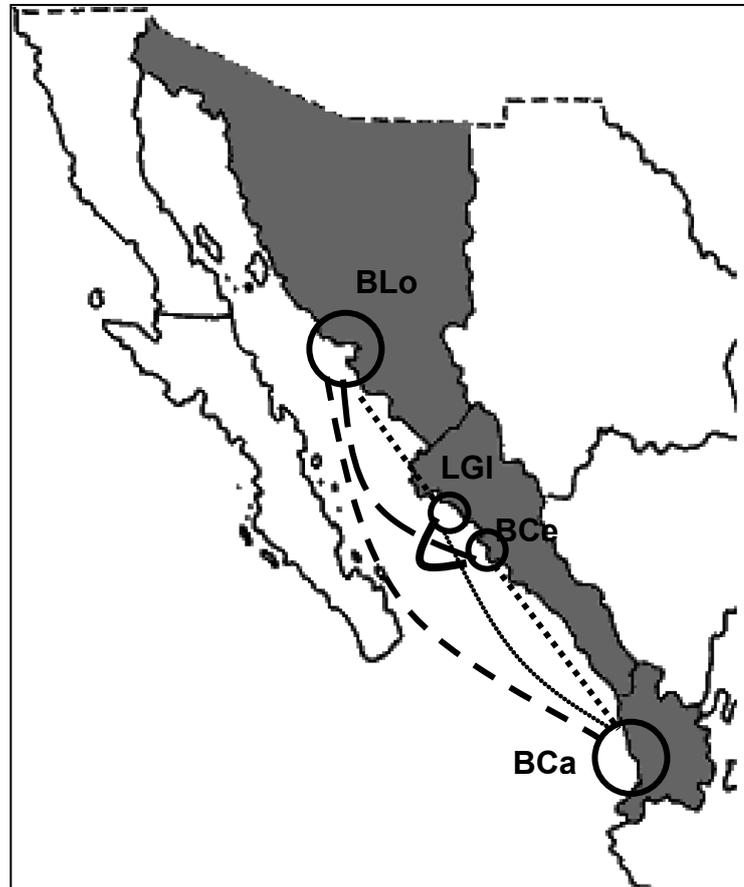
El flujo genético está dado por el número de migrantes por generación ( $Nm$ ) entre las localidades (Tabla 7, Fig. 8).

**Tabla 7.** Numero de migrantes entre localidades

Localidad	BLo	BCe	LGI	BCa
<b>BLo</b>	-			
<b>BCe</b>	35.163	-		
<b>LGI</b>	14.077	43.904	-	
<b>BCa</b>	19.975	16.403	10.858	-

Bahía de Ceuta presentó un mayor flujo genético, expresado como número de migrantes, con las localidades del norte (Las Glorias y Bahía de Lobos). Los menores flujos genéticos se dieron entre la localidad más sureña (Boca de Camichín) y el resto de las localidades. Es decir, que el mayor número de migrantes se observó entre Las Glorias y Bahía de Ceuta, que son las localidades más cercanas geográficamente, seguido por el valor de  $Nm$  entre Bahía de Lobos y Bahía de Ceuta (35.1). Cabe mencionar que la localidad de Las Glorias está aún más cercana de Bahía de Lobos, pero el valor de  $Nm$  (14.07) es mucho menor

que el antes mencionado. El menor  $N_m$  (10.8) se encontró entre Las Glorias y Boca de Camichín.



**Figura 8.** Flujo genético entre las cuatro localidades de recolecta en la costa oriental del Golfo de California. La línea continua representa el mayor flujo genético y así sucesivamente hasta la línea punteada de menor valor.

El tamaño efectivo poblacional fue mayor para Bahía de Ceuta ( $N_e=261,299.88$ ), seguido por Bahía de Lobos ( $N_e=215,162.74$ ). Los valores más bajos se encontraron en Boca de Camichín ( $N_e=199,038.4$ ) y Las Glorias ( $N_e=146,434.3$ ).

## VII. DISCUSIÓN

### 7.1 Variabilidad genética intrapoblacional

La alta variabilidad genética reportada en este estudio ( $A= 16-39$ ,  $H_E= 0.908-0.931$ ) se ha observado en otras especies de bivalvos, utilizando a los microsatélites como marcadores moleculares, tal es el caso de *C. gigas* ( $H_E= 0.890-0.96$  Huvet *et al.*, 2000), *Dreissena polymorpha* ( $A= 10-15.2$ ,  $H_E= 0.790-0.789$ , Astanei *et al.*, 2005), *C. virginica* ( $A= 12-21$ ,  $H_E= 0.800-0.845$  Galindo-Sánchez *et al.*, 2008). La variabilidad genética intrapoblacional obtenida en los seis loci microsatélites del presente trabajo ( $H_E= 0.908-0.931$ ), es más alta que la encontrada en el único estudio genético-poblacional previo (Perez-Enriquez *et al.*, 2008) para *C. corteziensis*, en las mismas poblaciones naturales, donde se utilizaron como marcadores moleculares a las alozimas ( $A= 2.5-3.3$ ,  $H_E= 0.126-0.089$ ). Esta diferencia es debida principalmente al mayor número de alelos presentes en los loci microsatélite, debido a las diferencias en sus tasas y procesos mutacionales, lo que da como resultado valores más altos de variabilidad genética (Estoup *et al.*, 1998). Por lo que estas diferencias son comúnmente observadas cuando se comparan valores de variabilidad genética de alozimas vs microsatélites (Estoup *et al.*, 1998).

Los loci más polimórficos fueron: Ccor28 ( $A= 38$ ,  $ne= 26.6$ ,  $H_O= 0.86$ ,  $H_E= 0.972$ ), Ccor26 ( $A= 39$ ,  $ne= 26.5$ ,  $H_O= 0.81$ ,  $H_E= 0.973$ ) y Ccor11 ( $A= 34$ ,  $ne= 24.0$ ,  $H_O= 0.75$ ,  $H_E= 0.968$ ), contribuyendo así a la alta variabilidad genética intrapoblacional. Estos marcadores, serán útiles también en estudios de parentesco y seguimiento de pedigríes en poblaciones cultivadas, ya que por su elevado polimorfismo es posible que se obtengan genotipos multilocus específicos que permitan distinguir entre individuos o familias.

Se puede considerar que el número medio de alelos y el número efectivo de alelos, indican mejor las diferencias de la variabilidad genética intrapoblacional, ya que se encuentran entre rangos de 25-35 y 13.8-20.6 respectivamente, mientras que los valores de heterocigosidad esperada se mantuvieron en intervalos muy similares entre las localidades ( $H_E= 0.908-0.931$ ).

Tomando en cuenta lo anterior, las localidades con menor variabilidad genética fueron Las Glorias ( $A= 25$ ,  $ne= 13.8$ ) y Bahía de Ceuta ( $A= 29$ ,  $ne=17.9$ ), las dos localidades intermedias dentro del área de estudio; mientras que la localidad de mayor variabilidad genética fue Bahía de Lobos, ( $A= 35$ ,  $ne= 20.6$ ), la más norteña, seguida por Boca de Camichín ( $A= 30$ ,  $ne= 16.4$ ), siendo esta la localidad más sureña. Haciendo una comparación entre las localidades de Las Glorias y Bahía de Ceuta (ambas de menor polimorfismo) con Bahía de Lobos (mayor polimorfismo), podemos observar que las localidades de menor variabilidad presentan de 10 a 6 alelos menos y de 6.8 a 2.7 alelos efectivos menos que la de mayor variabilidad. Además, estas dos localidades de menor variabilidad genética resultaron ser estadísticamente similares ( $P>0.05$ ) en base a los valores de  $F_{st}$  pareados, y no así el resto de las localidades. De esta manera se observa que el número de alelos es una medida más sensible, que la heterocigosidad, a los cambios genéticos derivados ya sea de acciones antropogénicas como de las características oceanográficas predominantes en el área.

La localidad de Bahía de Lobos además de ser la de mayor variabilidad, presenta el valor más bajo de  $F_{IS}$ , el cual es el índice de fijación medido por la relación entre la heterocigosidad observada y la esperada ( $H_E-H_O/H_E$ ) (Hart & Clark, 1997), indicando la cantidad de individuos homocigotos presentes en cada localidad, lo cual se puede interpretar en el caso de Bahía de Lobos como una menor endogamia (consanguinidad). Las Glorias también presentó un valor bajo cercano a Bahía de Lobos, a pesar de ser la localidad de menor variabilidad genética, en las dos localidades restantes, se obtuvo un valor del índice de fijación más alto y muy similar entre ambas, a pesar de que Boca de Camichin posee alta variabilidad genética al igual que Bahía de Lobos, se mantiene con mayor número de individuos homocigotos. El índice de fijación ( $F_{IS}$ ), es un estimador que se debe de manejar con cautela para estimar el grado de endogamia en una población, sobre todo cuando se desconoce la relación de parentesco, es decir la ausencia de pedigríes. El  $F_{IS}$  es también un estimador del déficit de heterocigotos ( $H_E<H_O$ ), que no necesariamente es debido a la presencia

de endogamia, sino también a artefactos de la técnica, como lo son los alelos nulos.

## 7.2 Déficit de heterocigotos y alelos nulos

El déficit de heterocigotos observados con respecto a los esperados bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg, es común encontrarse en bivalvos y ya se ha reportado con alozimas (Gaffney, 1992; Rodriguez-Romero, 1998), así como con microsatélites en poblaciones naturales (Huvet *et al.*, 2000; Sekino *et al.*, 2003; Astanei *et al.*, 2005; Colin *et al.*, 2006; Galindo-Sánchez, 2008; Hong & Ruihai 2008). En este estudio se encontró déficit de heterocigotos en todos los loci en todas las localidades, con excepción de tres casos (Ccor8 y Ccor11 en Las Glorias; y Ccor28 en Bahía de Lobos). El locus Ccor21 fue el que presentó el mayor valor de  $F_{IS}$  en todas las localidades.

El déficit de heterocigotos es provocado por varios factores como: la selección natural, endogamia, efecto Walhund, así como artefactos técnicos (alelos nulos y errores de conteo) (Gaffney, 1992). Por medio de la reproducción entre individuos emparentados, se crea una población endogámica, trayendo consigo un déficit de heterocigotos, lo cual puede ocurrir en especies con sexos separados.

La selección natural como factor causante del déficit de heterocigotos, en este estudio, implicaría que cada locus de microsatélite estuviera sujeto a selección o ligado a un locus específico bajo presión selectiva. Los microsatélites a pesar de ser marcadores neutrales, puesto que se encuentran en zonas no codificantes (Jarne & Lagoda, 1996), posiblemente pudieran estar ligados a loci bajo selección. El hecho de que se presentó un déficit de heterocigotos en todos los loci, podría implicar que estos estén ligados a loci sujetos a selección y que a su vez los microsatélites estén ligados entre sí, sin embargo el análisis de ligamiento entre loci nos indicó que ninguno de éstos se encontraban ligados, es decir que se segregaron de manera independiente, específicamente que las frecuencias alélicas y genotípicas de un locus no son afectadas por las observadas en otro locus.

En este estudio no se encontró influencia del efecto Wahlund, debido a que los valores de  $F_{ST}$  son menores que los valores de  $F_{IS}$ , lo que significa una distribución heterogénea de la variabilidad genética de esta especie dentro del total de las localidades (Astaneï *et al.*, 2005). Ya que el efecto Wahlund se presenta cuando una muestra se compone por la mezcla de individuos de dos o más poblaciones con diferentes frecuencias alélicas (Astaneï *et al.*, 2005), de este modo, se forman subgrupos diferenciados con un limitado flujo genético dentro de las poblaciones, lo que trae consigo que se observen homocigotos con alelos característicos de cada subgrupo, pero no así los heterocigotos esperados de la combinación de estos alelos.

La presencia de alelos nulos se debe a mutaciones en las regiones flanqueantes de microsatélites, donde se diseñan los “primers” para la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), mismas que impiden el alineamiento de los “primers” y por ende la amplificación del fragmento de ADN deseado. Por otra parte, los alelos nulos representan un problema común en el uso de microsatélites, lo que podría implicar un alto déficit de heterocigotos en una muestra. Lo cual se ha reportado para otras especies de bivalvos en poblaciones naturales como *D. polymorpha* (Astaneï *et al.*, 2005), y *C. virginica* (Galindo-Sánchez *et al.*, 2008).

El análisis realizado con el programa MICRO-CHECKER indicó la presencia de alelos nulos en todos los loci a excepción del locus Ccor28. En el caso del locus Ccor21 fue evidente la presencia de alelos nulos, ya que no se logró amplificar ningún producto en la PCR para muchas de las muestras que ya habían sido amplificadas con otros loci. Además, que presentó el más alto déficit de heterocigotos, y un alto valor de  $F_{IS}$  (0.894). Por lo que se repitió el cálculo de los valores de  $F_{IS}$  en todas las localidades excluyendo a este locus, para comprobar si la ausencia de éste en el análisis alteraría de alguna manera los resultados obtenidos, a pesar de ello no se observó un cambio en el orden de los valores de  $F_{IS}$ , por lo cual finalmente se decidió no excluirlo del análisis.

Durante el análisis de las muestras de los loci Ccor8, Ccor10, Ccor11, y Ccor26, se obtuvieron productos de PCR de manera consistente para la mayoría de las muestras de cada localidad, observándose en promedio de 21 a 39 alelos en muestras de 31 a 45 organismos en promedio. Por tanto, es probable que el déficit de heterocigotos, además de la posible presencia de alelos nulos, se deba a un efecto azaroso de la deriva genética al evaluar loci con elevado polimorfismo en muestras con número de organismos ( $n$  promedio = 42) cercanos al número de alelos ( $A= 21-39$ ). En el trabajo previo en el que se identificaron los microsatélites para *C. corteziensis* (Cruz et al., 2007), con una muestra de 30 organismos se observó un menor número de alelos (11-21) en la mayoría de los loci, con excepción de Ccor26 con 30 alelos, y solamente se observó déficit de heterocigotos en los loci Ccor10 y Ccor11, razón por la cual se consideró que un tamaño de 50 individuos por localidad era el apropiado para el presente estudio.

### *7.3 Diferenciación interpoblacional*

Uno de los factores más importantes que modela la estructura genética poblacional en bivalvos son las barreras oceanográficas como temperatura, salinidad y sistema de corrientes, así como las actividades antropogénicas; los cuales pueden afectar o influir en *C. corteziensis*, ya que es una especie con elevada fecundidad, y una gran dispersión en estadios larvales, que se prolonga de 18 a 22 días, y la reproducción es predominantemente de julio a noviembre, es decir en verano y otoño (Stuardo & Martínez, 1975).

Una de las características principales del Golfo de California es el rango de temperatura anual de la superficie del mar: la cual al norte de Puerto Peñasco es de 16 °C; mientras que al sur de Cabo San Lucas es de 9 °C (Case & Cody, 1983). Los vientos que cambian estacionalmente de dirección y las mareas, son los causantes de fuertes surgencias, que generalmente se presentan en invierno en la costa oriental del Golfo, misma que presenta esteros y lagunas costeras (Maluf, 1983). La dirección de la corriente superficial a lo largo de la costa oriental del Golfo de California muestra un patrón norte-sur en la primavera y el otoño, mientras que en el verano el patrón es sur-norte (Marinone, 2003).

Dichas condiciones oceanográficas favorecen la amplia dispersión larval, lo cual hace probable el intercambio genético a lo largo del área de estudio, esto se ve reflejado en un valor de  $F_{ST}$  multilocus, que aunque es significativo, es muy bajo (0.010), implicando una ligera diferenciación genética y la presencia de flujo genético entre las localidades, sobre todo las dos más próximas (Las Glorias y Bahía de Ceuta). Como ya se mencionó, el ostión del placer, *C. corteziensis* es una especie con elevada fecundidad, y con una gran dispersión en estadios larvales, que se prolonga de 18 a 22 días, además de una reproducción predominantemente de julio a noviembre es decir en verano y otoño (Stuardo & Martínez, 1975), condiciones que favorecen la migración de las larvas sujetas a las corrientes imperantes durante el periodo reproductivo.

En este estudio, los resultados sugieren que *C. corteziensis* no presenta una fuerte estructura genética poblacional dentro del área de estudio, ya que no existen marcadas diferencias entre las localidades, puesto que los valores pareados de  $F_{ST}$  indicaron sutiles diferencias entre las localidades del norte y sur, y nula diferenciación genética entre las más próximas: Bahía de Ceuta y Las Glorias. Los resultados de la prueba de asignación realizada con el programa STRUCTURE, confirman la ausencia de una fuerte estructura, ya que en base al análisis multilocus, todos los organismos son asignados a un solo grupo o población. Existen trabajos previos con mamíferos (Cegelski *et al.*, 2003), peces dulceacuícolas (Duftner *et al.*, 2006) y aves (Friesen *et al.*, 2006) en donde se ha observado una fuerte estructuración genética constatada por valores elevados de  $F_{ST}$  (0.04 a 0.2) y detección de diferentes poblaciones con el programa STRUCTURE. En el presente estudio el valor global de  $F_{ST}$  fue muy bajo (0.010) por lo que el programa STRUCTURE no detectó diferencias poblacionales.

La baja diferenciación genética entre las localidades de *C. corteziensis*, se puede atribuir al movimiento de organismos durante la fase larval estableciendo un amplio flujo genético a lo largo de la costa oriental del Golfo de California. Anteriormente, Pérez-Enríquez (2008), ya había encontrado un elevado flujo genético a partir de un análisis con alozimas, lo cual sugiere que esta especie está conformada por una sola población panmíctica a lo largo de esta misma zona. El tiempo de vida en estado larvario, aunado al régimen de corrientes de la

región, se puede considerar la causa del elevado flujo genético. A pesar de haber utilizado una técnica más sensible en el presente estudio, debido al elevado polimorfismo de los microsatélites, los resultados de ambos estudios son concordantes.

Para *C. virginica* en el Atlántico, también se ha observado una reducida estructuración genética. Colin *et al.* (2006) observaron una baja diferenciación genética de *C. virginica*, debido al flujo genético local predominante y a las recientes actividades antropogénicas en la Bahía de Chesapeake en E.U. Galindo-Sanchez *et al.* (2008) observaron para la misma especie de bivalvo en el estado de Veracruz, una moderada estructura genética poblacional sin un claro patrón geográfico, lo cual también lo relacionan a actividades humanas, así como a un sistema de corrientes temporal, por efecto del movimiento de organismos y el aislamiento de algunas lagunas debido a factores físicos, en combinación con la variación estocástica en la reproducción, sobrevivencia y dispersión larval.

En el presente estudio no se observó un patrón definido que estructure en diferentes poblaciones, y cabe mencionar que la heterogeneidad de las frecuencias alélicas de los microsatélites se puede considerar como un “parqueo caótico genético” (*Chaotics genetic patchiness*), es decir que la heterogeneidad efímera localizada (mayores diferencias entre las localidades extremas con respecto a la localidad central) se encuentra presente a pesar de una homogeneidad a gran escala (menor diferenciación entre las localidades extremas) (Ruzzante *et al.*, 1996). El parqueo caótico genético se puede deber a un éxito reproductivo diferencial de la especie, de manera que en cada temporada de desove no se estén reproduciendo los mismos genotipos, específicamente organismos de bancos diferentes o cohortes. La variación en la temperatura superficial del mar o ausencia de alimento de las larvas durante el periodo reproductivo (So *et al.*, 2006) pueden contribuir a una supervivencia diferencial de grupos de organismos (Johnson & Black, 1982) produciendo una heterogeneidad en la estructura genética entre cohortes o entre diferentes periodos de reproducción (Ruzzante *et al.*, 1996).

La estructura genética de las localidades de *C. corteziensis* no guarda relación entre distancias geográficas y distancias genéticas, ya que no existe ninguna asociación significativa entre los valores de  $F_{ST}$  y la distancia geográfica ( $r^2= 0.0026$ ), es decir que no hay un patrón claro del flujo genético, probablemente debido a su amplitud, esto se ve reflejado en el número de migrantes que hay entre una localidad y otra sin seguir una línea geográfica. Puesto que, descartando que hay un mayor flujo entre las dos localidades más cercanas (Las Glorias-Bahía de Ceuta), existe un flujo importante entre Bahía de Lobos y Boca de Camichín, aun siendo las dos localidades más alejadas, más que el que pudiera presentarse con las adyacentes a cada una de ellas. Por otro lado, podría decirse que el flujo genético va de norte a sur, si se toma como referencia el número de migrantes en relación a Bahía de Lobos con Bahía de Ceuta y posteriormente la adyacente a ésta (Boca de Camichín).

El tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ) de todas las localidades se encontró en el rango de 146,434.3 (Las Glorias) a 261,299.88 (Bahía de Ceuta). Estos valores deben de tomarse con cautela, por las siguientes razones: 1) El tamaño efectivo poblacional, por definición se refiere a los organismos que efectivamente están dejando descendencia y por tanto no es equivalente al número de organismos por censo. Frankham *et al.* (2004) mencionan que el tamaño efectivo poblacional es por lo general un 11% del tamaño real de la población, sin embargo esta estimación es a partir de estudios con especies principalmente terrestres. 2) La estimación de  $N_e$  a partir de la fórmula depende completamente del valor de heterocigosidad calculada ( $H_e$ ), la cual puede variar entre los diferentes *loci* y tener un margen de error debido al déficit de heterocigotos antes mencionado por efecto de alelos nulos y deriva genética. 3) Por lo tanto, estos valores de tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ) deben de tomarse con fines comparativos entre localidades, pero no así como un valor directo para estimar el tamaño real de la población. De esta manera, podemos mencionar que Las Glorias presenta una menor variabilidad genética debido principalmente a un menor tamaño efectivo poblacional.

El hecho de que la localidad de Las Glorias, presente una menor variabilidad genética y no diferenciación de la localidad cercana de Bahía de Ceuta, hace sospechar que los individuos analizados no provengan de una muestra silvestre tomada al azar, sino muy probablemente se trate de organismos cultivados originarios de Bahía de Ceuta. Esta muestra fue colectada en Las Glorias de un encierro inter-mareal a un permissionario que afirmo que se trataba de una muestra silvestre colectada en la misma zona. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que los organismos sean cultivados y provengan de semilla colectada en zonas cercanas a Bahía de Ceuta, trayendo esto consigo el que tenga una menor variabilidad genética, posiblemente por originarse de una sola cohorte. De hecho la muestra de las Glorias es la que contribuye principalmente al parcheo genético antes mencionado, ya que es la que presenta el menor flujo genético con Bahía de Lobos y Boca de Camichín. Un análisis de parentesco con el programa IDENTIX 1.0 (Belkhir et al., 2002), demostró que los organismos de Las Glorias presentan mayor relación genética (índice de parentesco  $r_{xy}$  de Queller & Goodnight, 1989), que el resto de las localidades, y específicamente el doble de parentesco que los organismos de Bahía de Ceuta, en tanto que las demás localidades presentan valores muy aproximados (Bahía de Lobos 0.021, Las Glorias 0.036, Bahía de Ceuta 0.017, Boca de Camichín, 0.020). La presencia de un mayor índice de parentesco, es propio de las poblaciones que han sufrido un cuello de botella, como lo que ocurre al establecerse un cultivo a partir de organismos más emparentados derivados del desove de un menor número de reproductores, ya sea un desove en cautiverio o una cohorte natural originaria de un solo banco. Galindo-Sánchez *et al.* (2008), observaron indicios de parcheo genético caótico en el ostión del Atlántico *C. virginica* en el estado de Veracruz, en donde una de las localidades más sureñas posiblemente contenía organismos de una localidad más norteña debido a que se asume que se han realizado movilizaciones artificiales de organismos de una localidad a otra con fines de repoblamiento.

## VIII. CONCLUSIONES

- La variabilidad genética de *C. corteziensis* en las localidades muestreadas en el estudio fue alta ( $A= 25-35$ ,  $ne= 13.8-20.6$ ,  $H_o= 0.620- 0.693$ ,  $H_E= 0.908 - 0.931$ ).
- Las localidades de mayor variabilidad genética fueron Bahía de Lobos ( $A= 35$ ,  $ne= 20.6$ ) y Boca de Camichín ( $A= 30$ ,  $ne= 16.4$ ).
- La localidad de menor variabilidad genética fue Las Glorias ( $A= 25$ ,  $ne= 13.8$ ).
- Los bajos valores de variabilidad de Las Glorias, su elevada similitud con Bahía de Ceuta al sur, y su mayor aislamiento con Bahía de Lobos al norte, hacen suponer que se trata de una población posiblemente cultivada a partir de organismos de Bahía de Ceuta.
- Se observó desviación al desequilibrio de Hardy-Weinberg en todas las localidades y en todos los loci, a excepción de los loci Ccor8 y Ccor11, lo cual fue causado por un déficit de heterocigotos.
- El déficit de heterocigotos fue debido a la presencia de alelos nulos en uno de los seis loci analizados.
- El mayor flujo genético se dio entre las dos localidades intermedias (Las Glorias y Bahía de Ceuta).
- Bahía de Ceuta presentó un mayor flujo genético, expresado como número de migrantes, con las localidades del norte (Las Glorias y Bahía de Lobos).
- Los menores flujos genéticos se dieron entre la localidad más sureña (Boca de Camichín) y el resto de las localidades.

- Se observó cierto grado de estructuración genética de *C. corteziensis* en el área evaluada; sin embargo las diferencias entre localidades fueron escasas, debido a un intercambio de migrantes en etapas larvales mediante las corrientes imperantes en el Golfo de California.
- Se observó que las distancias geográficas entre localidades, no implican que estas se encuentren más diferenciadas genéticamente entre si.

## IX. RECOMENDACIONES

A pesar de la alta variabilidad genética encontrada mediante el análisis de microsatélites, se recomienda prestar atención al cuidado y protección de los bancos ostrícolas existentes a lo largo de la costa oriental del Golfo de California, pues en una de las localidades de muestreo (Las Glorias) se obtuvo una muy baja variabilidad genética en comparación con el resto.

Se recomienda realizar un plan de manejo para *C. corteziensis* como especie comercial con alto potencial de explotación, tomando en cuenta los niveles de variabilidad genética y las relaciones (flujo genético) entre las distintas zonas de pesca. Si se requiere llevar a cabo un cultivo de esta especie, es recomendable tomar ejemplares de una población natural que cuente con un alto nivel de variabilidad genética y que el cultivo se mantenga en las mismas condiciones ambientales que las del lugar de origen de la semilla.

Es necesario ampliar la zona de estudio y el número de muestra para obtener un panorama más completo de la estructura poblacional y las relaciones genéticas interpoblacionales.

## X. LITERATURA CITADA

- Astaneï, J., E. Gosling, J. Wilson & E. Powell. 2005. Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Mol. Ecol.*, 14:1655–1666.
- Belkhir, K., V. Castric & F. Bonhomme. 2002. IDENTIX, a software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Mol. Ecol.*, 2: 611-614.
- Buroker, N.E , W.K Hershberger & K.K Chew K.K. 1979. Population Genetics of the Family Ostreidae. I. Intraspecific Studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Mar. Biol.*, 54: 157-169.
- Cáceres-Puig, J.I. F. Abasolo-Pacheco, J.M. Mazón-Suástegui, A. Maeda-Martínez & P.E. Saucedo. 2007. Effect of temperature on growth and survival of *Crassostrea corteziensis* spat during latenursery culturing at the hatchery. *Aquac. Mag.*, 272: 417-422.
- Case T.J. & L.M Cody. Island biogeography of the sea of Cortéz. Oxford University Press, 41 p.
- Cegelski, C.C., L.P. Waits & J. Anderson. 2003. Assesing population structure and gene flow in *Montana wolverines* (*Gulo gulo*) using assignment-based approaches. *Mol. Ecol.*, 12: 2907-2918.
- Cifuentes-Lemus, J.L, P. Torres-García & M.Frías. 1997. El océano y sus recursos X, Pesquerías. Librerías del fondo, 245 p.
- Cortés-Guzmán, A.S. 1978. Identificación y cuantificación de larvas pediveliger de *Crassostrea corteziensis*, Hertlein y balánidos, en el plancton de dos esteros de San Blas, Nayarit, Pacífico de México. *An. Cen. Cienc. Mar Limnol.* 8: 67-74.

- Creste, S., A. Tulmann & A. Figueira. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 19: 299–306.
- Cuevas-Guevara, C.A. 1878. Estudio gonádico de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, c. *Palmula carpenter* y *C. iridescens* Hanley, de San Blas, Nayarit, México (bivalvia: ostreidae). *An. Cen. Cienc. Mar Limnol.* 5: 88-102.
- Duftner, N., K.M. Sefc, S. Koblmüller, B. Nevado, E. Verheyen, H. Phiris & C. Sturmbauer. 2006. Distinct population structure in a phenotypically homogeneous rock-dwelling cichlid fish from Lake Tanganyika. *Mol. Ecol.*, 15: 2381-2395.
- Dujardin, J.P., F. Panzera, & C.J. Schofield. 2002. Triatominae: estructura poblacional y estudios de re-infestación, CETIFAC – Bioing. UNER.
- Woody, D. & Avise J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.*, 56: 461-473.
- Estopu, A., F. Rousset, Y. Michalakis, J.M. Cournuet., M. Adriamanga, & R. Guyomard. 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Mol. Ecol.* 7: 339-353.
- Frankham, R., J.D. Ballou y D.A. Briscoe. 2004. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. U.K. 65p.
- Friesen, V., J.A. González & F. Cruz Delgado. 2006. Population genetic structure and conservation of the Galapagos petrel (*Pterodroma phaeopygia*). *Cons. Genetics.* 7: 105-115.
- Frías-Espéricueta, M.G., F. Páez-Osuna & I. Osuna-López. 1997. Seasonal changes in the gonadal state of the oysters *Crassostrea iridescens* and *Crassostrea corteziensis* (Filibranchia: Ostreidae) in the Northwest coast of Mexico. *Inst. An. Cienc. Mar Limnol.* 15: 124-131.

- Galindo-Sánchez, C.E., P.M Gaffney, C.I.Pérez-Rostro, J. De la Rosa-Vélez, J. Candela & P. Cruz. Assessment of genetic diversity of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in Veracruz, Mexico using microsatellite markers. *J. Shellfish Res.*, 4: 721–727.
- Götz, K.-U & G.Thaller. 1998. Assignment of individuals to populations using microsatellites. *J. Anim. Breed. Genet.*, 115:53-62.
- Hartl, D.L. & A.G. Clarck. 1997. *Principles of Population Genetics*, Sinauer Associates, Sunderland, A. 542 p.
- Hedgecock, D., G. Li, S. Hubert, K. Bucklin & V. Ribes. 2004. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 23:379–385.
- Hubbs, C.L. & G.I. Roden, 1964. *Oceanography and marine life along the pacific.* 34 pp.
- Huvet, A., S. Lape`gue, A. Magoulas & P. Boudry. 2000. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Conserv. Genet.* 1:251–262.
- Jarne, P. & Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.*, 11:424-429.
- Johnson, M.S. & R. Black. 1982. Chaotic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria* sp. *Mar. Biol.*, 70:57–164.
- Launey, S., M. Barre, A. Gerard & Y. Naciri .2001. Population bottleneck and effective size in Bonamia ostreae-resistant populations of *Ostrea edulis* as inferred by microsatellite markers. *Genet. Res. Camb.* 78: 259-270.

- Li, G., S.Hubert, K. Bucklin, V. Ribes & D.Hedgecock. 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Mol. Ecol., 3: 228 – 232.
- Li, Q., S. Liu & L. Kong. 2009. Microsatellites within genes and ESTs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and their transferability in five other *Crassostrea* species. Elect. J. Biotech. 8: 0717-3458.
- Lightner, D. V. 1994. Enfermedades del camarón. En: Camaronicultura: Bases técnicas y científicas para el cultivo de camarones peneidos. Martínez-Córdoba, L.R. (ed). AGT Ed. México. 3: 161-220.
- MacHugh, D.E., R.T Loftus, P. Cunningham, D.G Bradley.1998. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. Anim. Genet., 29: 333-340.
- Mazón-Suastegui, J.M. 1996. Cultivo de ostión japonés *Crassostrea gigas*. En: Casas-Valdez, M y G. Ponce-Díaz (eds.). Estudio del potencial pesquero y acuícola de Baja California Sur. Vol. II.650.
- Mazón-Suastegui, J.M. M. Robles-Mugaray, F. Flores-Higuera & S. Aviles-Quevedo, 2002. Experiencias en la producción de semilla de ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en el laboratorio. Memorias del IV Simposio Nacional de Acuicultura y Pesca. Antigua, Guatemala 16-18 octubre 2002. 16-18 pp.
- Páez-Osuna, F.1991. Variación estacional de la composición química del ostión *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) en Mazatlán Sinaloa, México. An. Cienc. Cen. Mar Limnol. 10: 176-180.
- Park, Stephen. 2001. MS Tools v 3.1 Smurfit Institute of Genetics, Trinity College, Dublin 3, Irelandsparc@tcd.ie /sdepark@hotmail.com;  
<http://acer.gen.tcd.ie/~sdepark/ms-toolkit/>

- Pérez-Enríquez, R., S. Avila & A. M. Ibarra (2008) .Genética poblacional de ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) en el noroeste de México. *Cienc. Mar.*, 34(4): 479–490.
- Queller, D.C. & K.F. Goodnight. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evol.*, 43: 258-275.
- Raymond, M. & F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 3.3): population genetics for 459 exact test ecumenism. *J. Hered.* 86:248-249.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evol*, 41:223-235.
- Rodríguez-Romero, F., C. García-Saez & A. Laguarda-Figueras.1988. Electrophoretic patterns variation in two oyster populations of *Crassostrea corteziensis* from the Mexican coast. *An. Gen. Cienc. Mar Limnol.* 15: 177-184.
- Rodzen, J.A., Agresti J.J., Tranah G. & May B., 1998. Agarose Overlays Allow Simplified Staining of Polyacrylamide Gels. *Biotechniques*, 25: 584.
- Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistic under isolation by distance. *Genetics*, 145:1219-1228.
- Ruzzante, D.E., C.T. Taggart y D. Cook. 1996. Spatial and temporal variation in the genetic composition of larval cod (*Gadus morhua*) aggregation: Cohort contribution and genetic stability. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53(12): 2695-2705.
- SEMARNAT. 2008. Anuario estadístico de pesca 2002. SEMARNAT-CONAPESCA. <http://www.sagarpa.gob.mx>.

- Sekino, M., M.Hamaguchi, F Aranishi & K. Okoshi. 2003. Development of Novel Microsatellite DNA Markers from the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Mar. Biotech., 5: 227-233.
- Shriver, M.D., M.W. Smith, L. Jin , A. Marcini , J.M. Akey, R. Deka & R.E.Ferrell. 1997. Ethnic-Affiliation Estimation by use of population-specific DNA markers. Am. J. Hum. Genet., 60:957-964.
- So, M., G. E. Maes y F.A. Volckaert. 2006. Intra-annual genetic variation in the downstream larval drift of sutchi catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in the Mekong river. Biol. J. Linnean Soc. 89: 719-728.
- Stuardo J. & A. Martínez (1975). Relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología de poblaciones de *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951), en San Blas, Nayarit, México. An. Cienc. Mar Limnol. 9: 94-117.
- Sweijd, NA, Bowie RCK, Lopata AL, Marinaki AM, Harley EH, Cook P (1998) A PCR technique for forensic, species-level identification of abalone tissue. J. Shellfish Res., 17: 889–895.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills & P. Shipley. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol. Ecol., 4:535-538.
- Weir, B.S. & C.C. Cockerham. 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure. Evol., 38:1358-1370.

## XI. ANEXOS

### Anexo I

En la tabla se muestran las coordenadas de cada localidad y el número de muestras recolectadas (*n*).

Localidad	Ubicación	No. de muestras
Bahía de Lobos	27°20' N, 110°30' O	50
Las Glorias	25°17' N, 108°31' O	46
Bahía de Ceuta	24°05' N, 107°09' O	50
Boca de Camichín	21°45' N, 105°30' O	40

---

## **Anexo II**

### **Protocolo**

#### **Electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% y urea al 7.5%M.**

#### **Soluciones stock:**

- Acrilamida refrigerada (Urea 7.5 M, acrilamida: bis-acrilamida 19:1 5%, TBE 1X).
- TBE 10 X (Tris-acido bórico 0.09 M, EDTA 0,002M).
- APS 10%.
- TEMED.
- Escalera de secuenciado (SequiTherm Cycle Sequencing Kit-Epicentre Tech).

#### **Materiales y equipo:**

- Vidrios, peines y separadores para preparar geles.
- Cámaras de electroforesis verticales para secuenciado manual.
- Fuente de poder.
- Termociclador o Incubadora a 95 °C.

#### **Procedimiento:**

- 1.- Colocar boca arriba un par de vidrios, limpiar con alcohol al 70% utilizando un pañuelo desechable el vidrio sin muesca, y frotar solución Ranix al vidrio con muesca usando pañuelo desechable.
- 2.- Agregar en un vaso de precipitado de 50-100 ml, 80 ml de solución stock de acrilamida refrigerada (Urea 7.5M, acrilamida: bis-acrilamida 19:1 5 %, TBE1X= Tris ácido bórico 0.09 M, EDTA 0.002M).
- 3.- Agregar 400 µl de APS 10%, y 40 µl de TEMED, agitar ligeramente.
- 4.- Colocar el vidrio sin muesca boca arriba con los separadores. Verter lentamente la acrilamida a la mitad del vidrio y deslizar pausadamente sobre este el vidrio de muesca, conforme se agrega la acrilamida, tratando siempre que no

se formen burbujas. Una vez que los vidrios queden empalmados, colocar el "peine" con los dientes hacia fuera, en el extremo con muesca. Dejar polimerizar el gel alrededor de 30 minutos.

**5.-** Enjuagar con agua de la llave la cara exterior de los vidrios y retirar el peine. Montar correctamente en la cámara de electroforesis. Llenar las celdas con solución amortiguadora TBE 1X.

**6.-** Conectar la cámara a la fuente de poder (1600-1800 volts) y pre-calentar el gel hasta alcanzar los 50-55° C (de 15 a 30 mins).

**7.-** Poco antes de que el gel se ha pre-calentado, desnaturalizar los productos de *PCR* calentando por 5 min a 95° C, colocar en hielo posteriormente.

**8.-** Enjuagar a presión con una pipeta Pasteur en el espacio ocupado anteriormente por el peine, posteriormente colocar el peine con los dientes hacia abajo hasta que se introduzcan ligeramente en el gel.

**9.-** Colocar 3-4 µl de las muestras en cada carril del gel, reservando carriles para la escalera de secuenciado (SequiTherm Cycle Sequencing Kit-Epicentre Tech).

**10.-** Correr la electroforesis, hasta que el azul de bromofenol del tinte alcance 30 cm. De avance (2-3 horas aproximadamente a 1600-1800 volts).

**11.-** Desmontar el gel. Una vez apoyado de manera horizontal remover el vidrio de la muesca cuidadosamente.

## **Anexo III**

### **Protocolo**

#### **Visualización de microsátélites en geles de poliacrilamida.**

#### **Tinción en SYBR Gold (Rodzen *et al.*, 1998)**

#### **Soluciones stock:**

- SYBR Gold

#### **Materiales y equipo:**

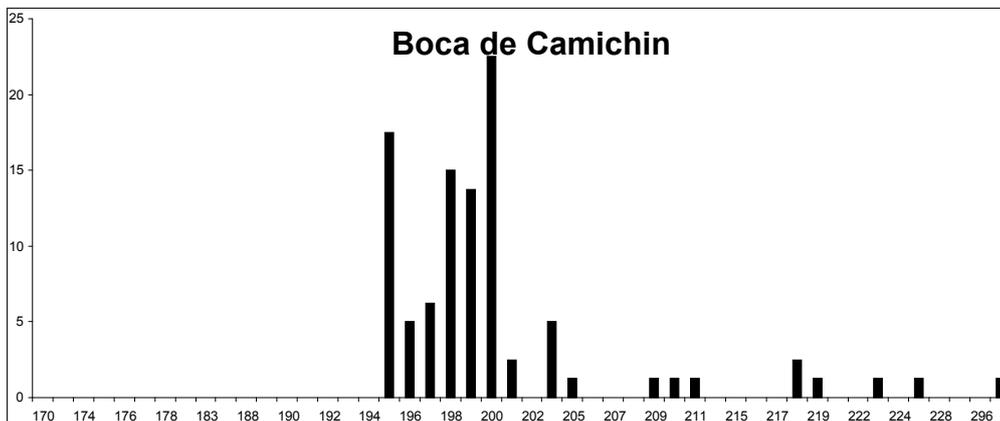
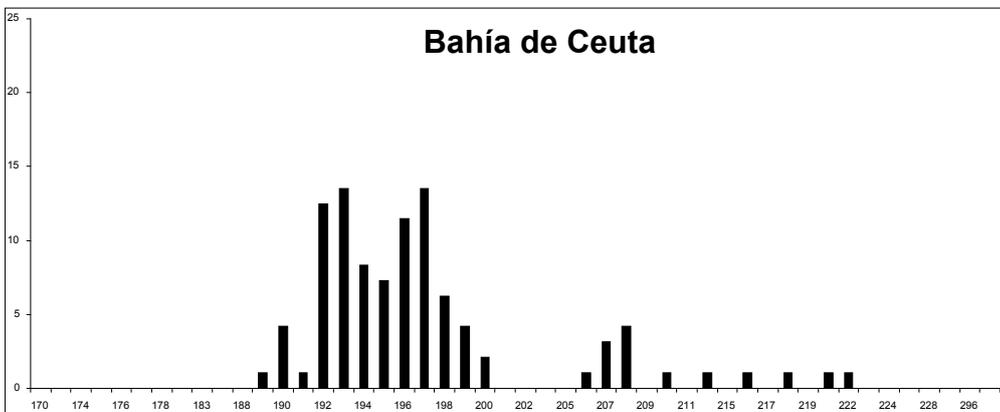
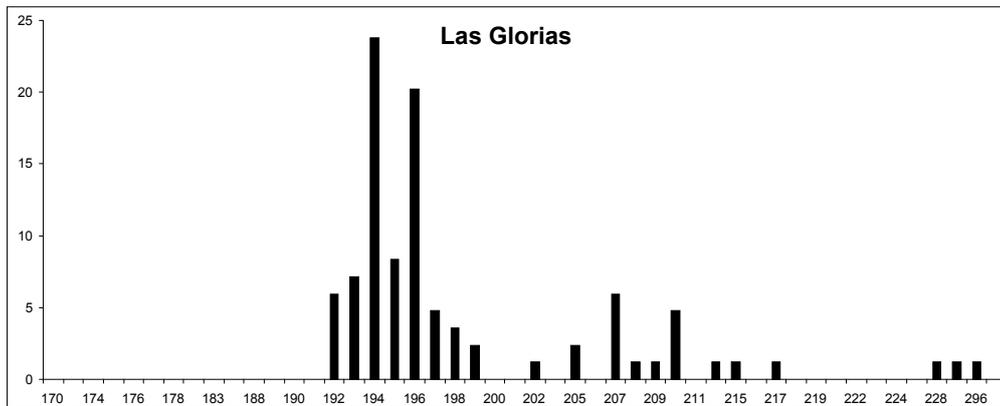
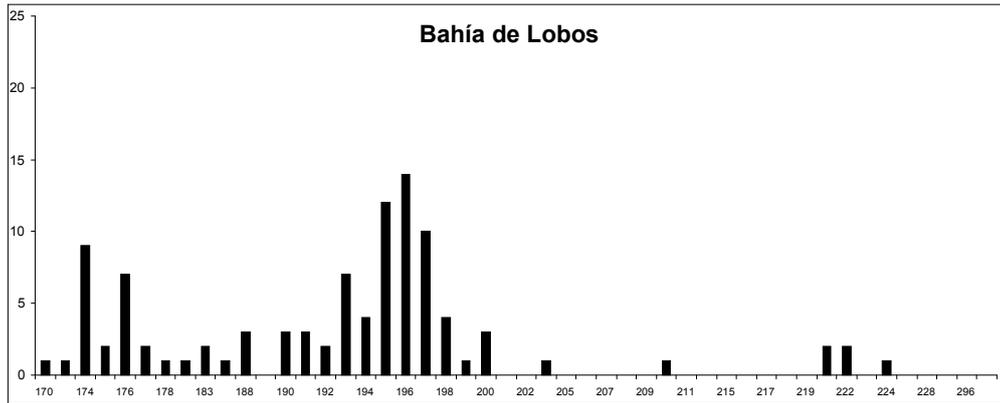
- Caja oscura para revelado.
- Analizador de imágenes (FMBIO III).

#### **Procedimiento:**

- 1.- Preparar Agarosa al 2%, en un vaso de precipitado de 50-100 ml, agregando 80 ml de agua destilada y 1.6 g. de agarosa, calentar durante 2.5 min.
- 2.- Agregar a la agarosa 0.5 µl de SYBR gold y agitar suavemente dentro de un tubo cubierto con papel aluminio, para evitar la entrada de luz.
- 3.- Colocar el vidrio con el gel de poliacrilamida dentro de la caja para revelado.
- 4.- Añadir la mezcla al vidrio, sobre el área que se desee revelar.
- 5.- Tapar la caja, y dejar polimerizar la agarosa con SYBR gold, durante 20 mins.
- 6.- Colocar el vidrio en el analizador de imágenes FMBIO III, y observar.

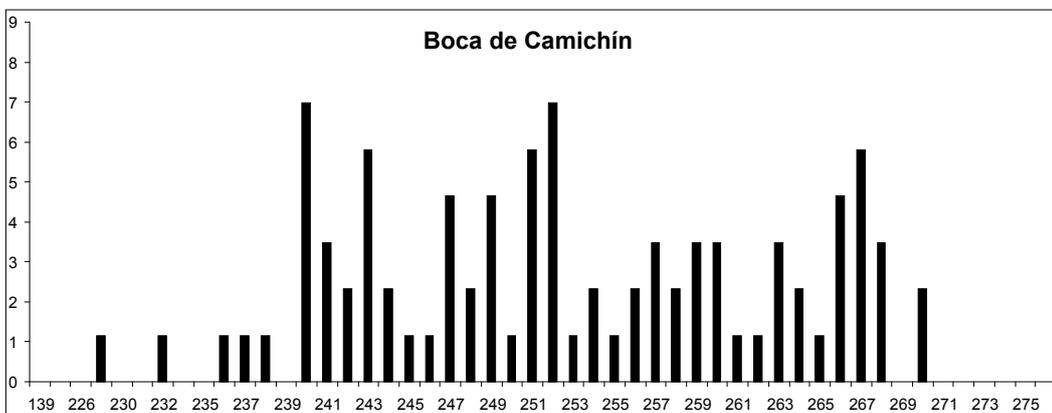
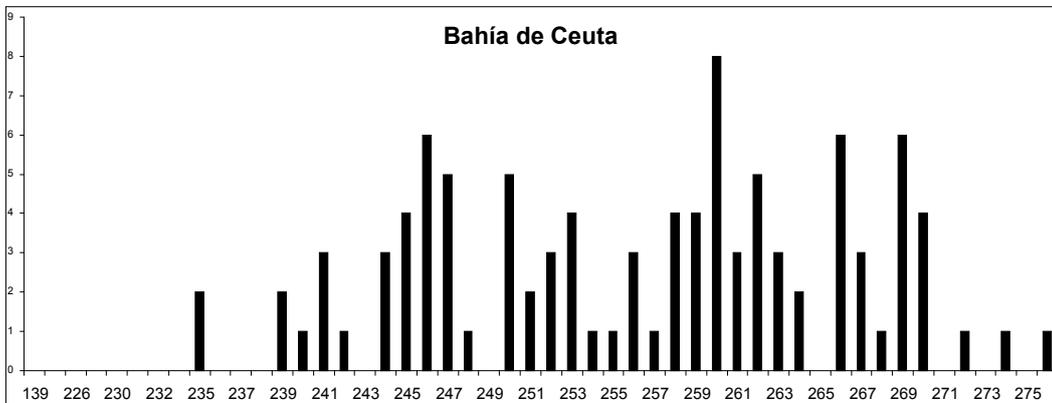
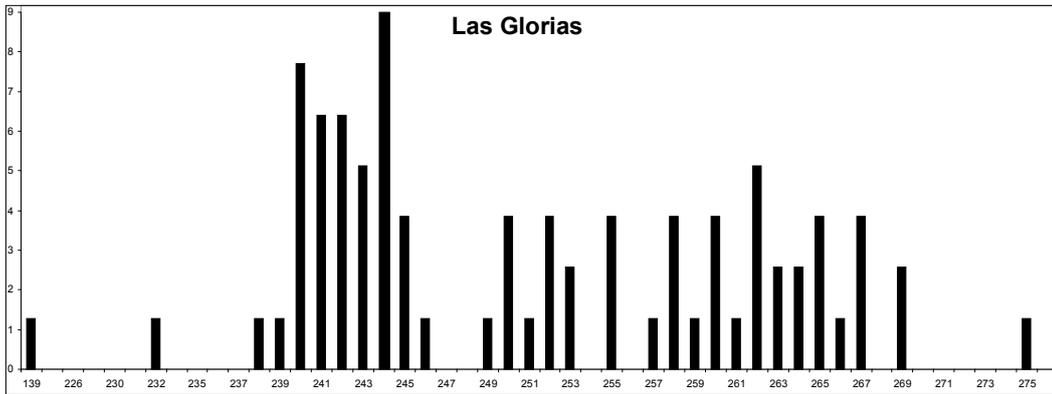
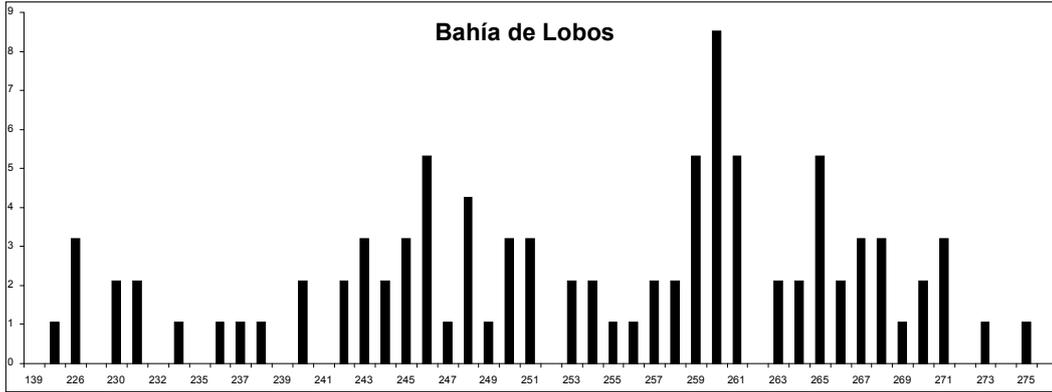
## Anexo IV

## Frecuencias alélicas para el locus Ccor8



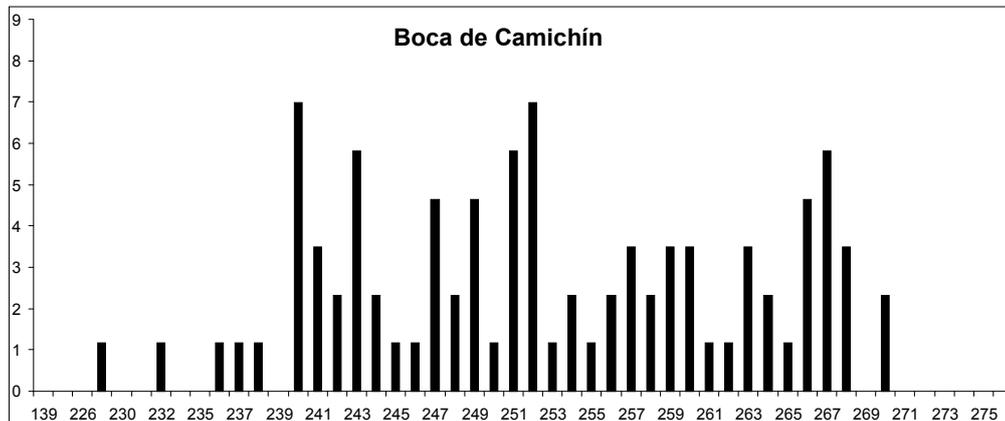
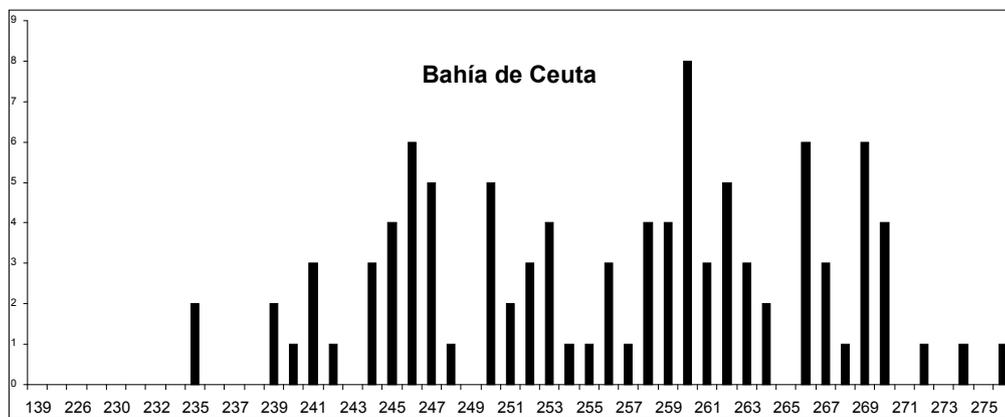
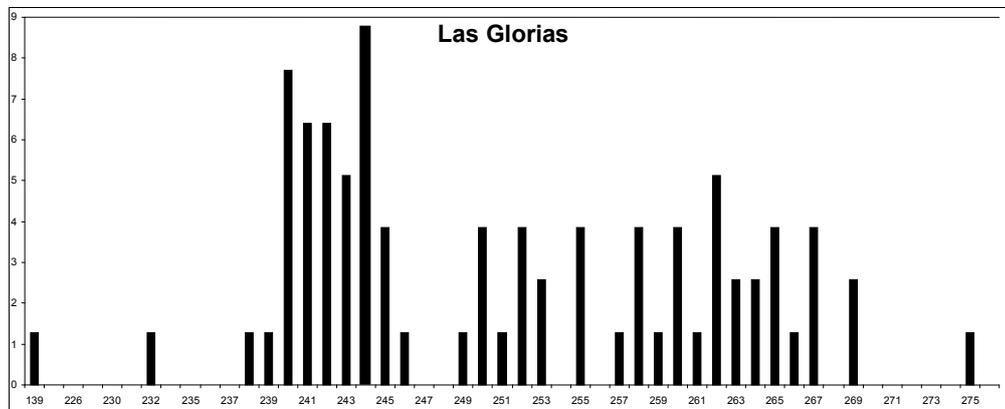
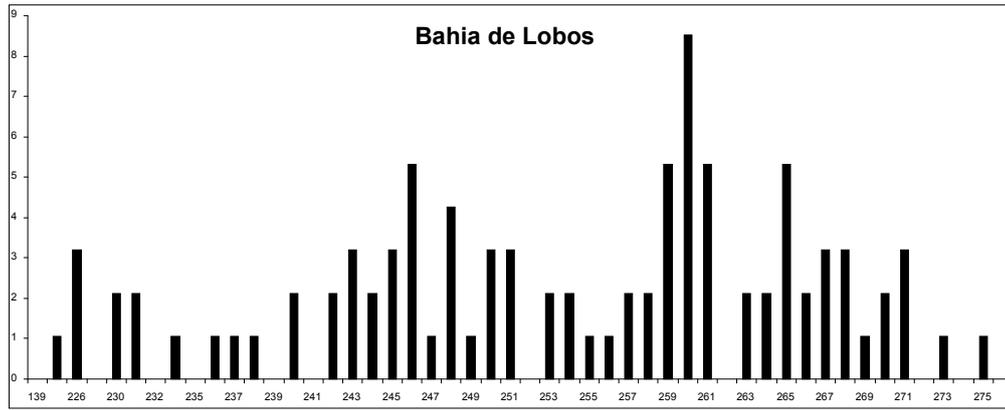
## Anexo V

## Frecuencias alélicas para el locus Ccor10



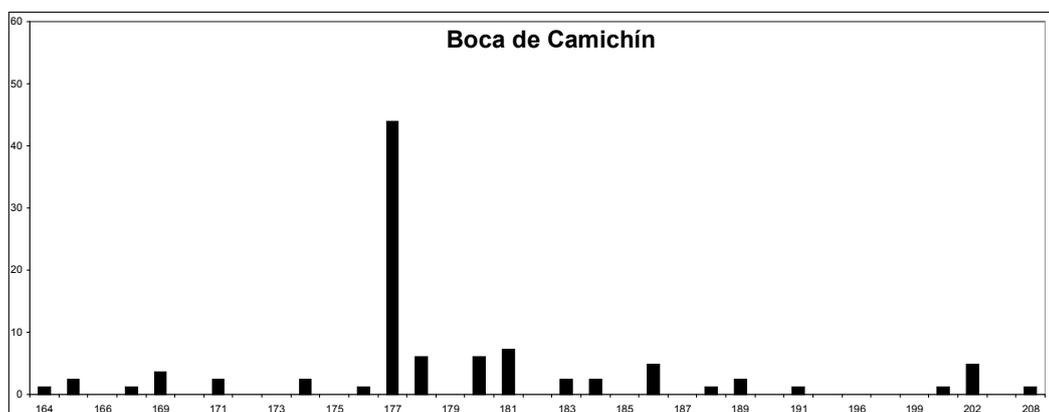
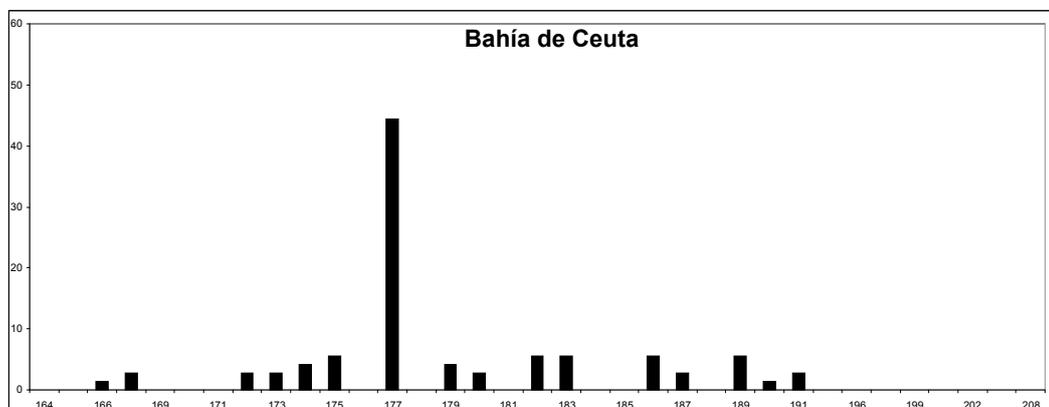
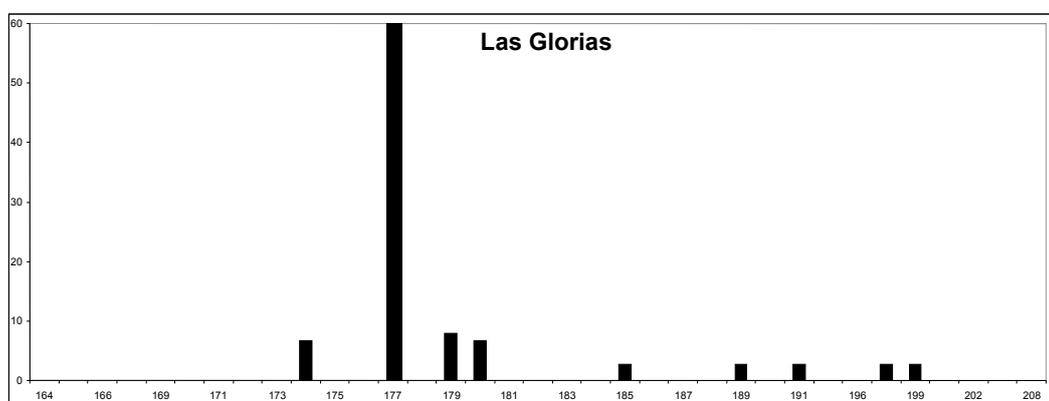
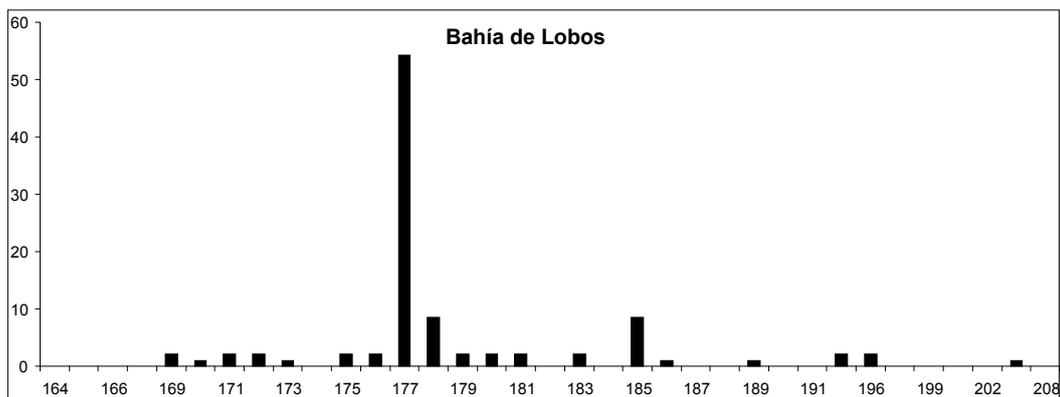
## Anexo VI

## Frecuencias alélicas para el locus Cco11



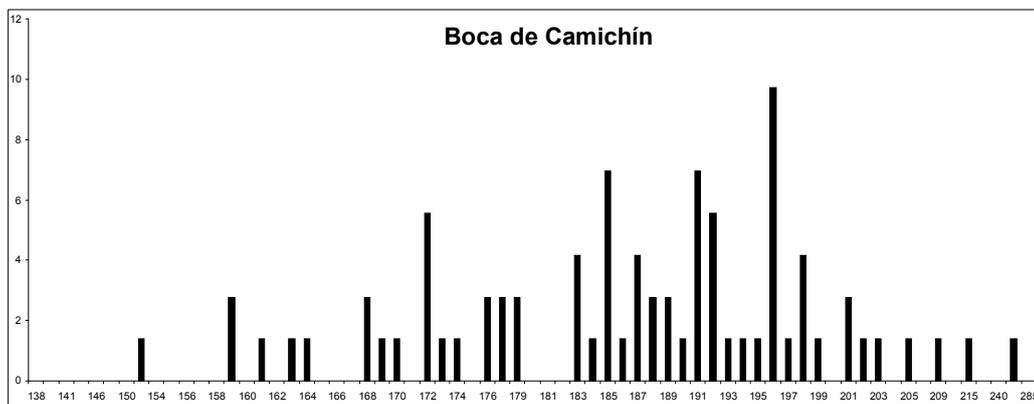
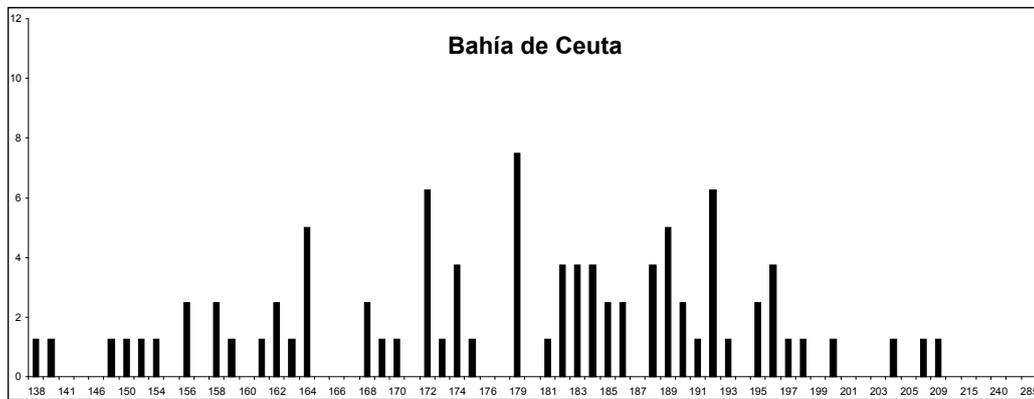
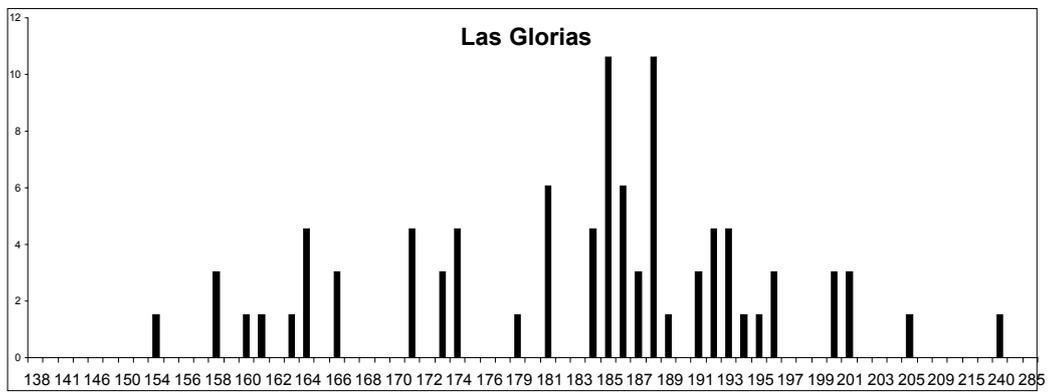
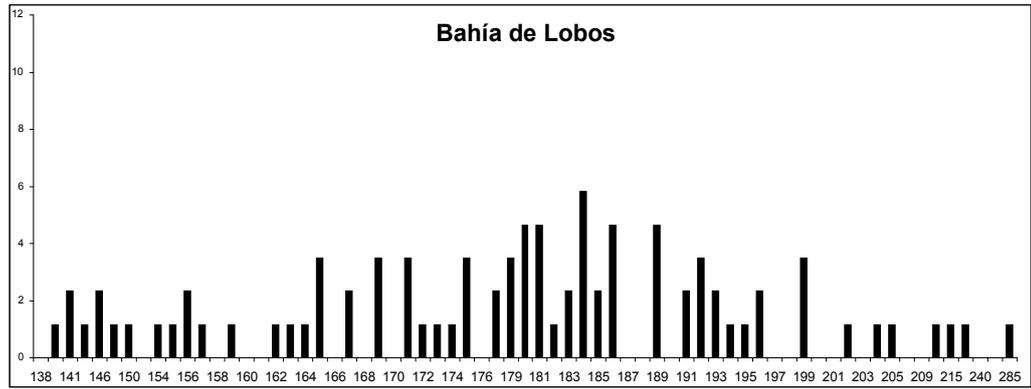
## Anexo VII

## Frecuencias alélicas para el locus Ccor21



## Anexo VIII

## Frecuencias alélicas para el locus Ccor26



**Anexo IX**

**Frecuencias alélicas para el locus Ccor28**

