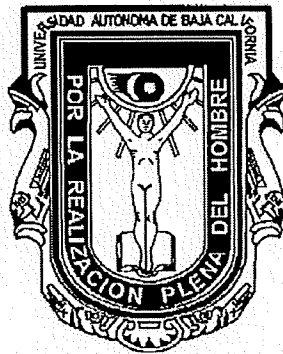


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS



**“ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN *Crassostrea gigas*
CULTIVADA EN DISTINTAS LOCALIDADES DE
LA BAHÍA DE SAN QUINTÍN, B.C.”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
PRESENTA

AIDEE OCEGUERA GONZÁLEZ

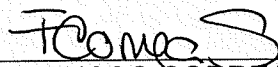
Ensenada, B.C., Agosto del 2003

**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN Crassostrea gigas
CULTIVADA EN DISTINTAS LOCALIDADES DE LA
BAHÍA DE SAN QUINTÍN, B.C.**

TESIS PROFESIONAL
QUE PRESENTA

AIDEE OCEGUERA GONZÁLEZ

APROBADA POR:



DR. FRANCISCO CORREA SANDOVAL
Presidente del jurado



DR. FAUSTINO CAMARENA ROSALES
Secretario



DR. GORGONIO RUIZ CAMPOS
1er. Vocal

A mis papás.....

Quienes me han dado todo
y a quienes les debo todo lo que soy.

AGRADECIMIENTOS.

A mi director de tesis, Dr. Francisco Correa Sandoval.....gracias su tiempo, por su disponibilidad permanente, por su ayuda invaluable y por su buen humor.

A mis sinodales, Dr. Faustino Camarena Rosales y Dr. Gorgonio Ruiz Campos, por las observaciones y comentarios que hicieron para el mejoramiento de este trabajo.

A la Oc. Edna Collins y al Biol. Daniel Domínguez por su ayuda en el trabajo de laboratorio.

Al Biol. Javier Martínez Quintana.....gracias por el apoyo, sugerencias, consejos, ánimo, compañía, revisiones, aventones a la escuela, sacadas de libros, paciencia, etc. etc. etc.....que me diste durante la realización de este trabajo.

A mis papás por apoyar siempre mis decisiones.

A la Manne.....gracias por perdonarme todos los fines de semana que te debo.

RESUMEN

Se realizaron análisis de la variabilidad genética en individuos adultos del ostión japonés *Crassostrea gigas*, por medio de la electroforesis en gel de almidón. El análisis comprendió el estudio de 13 sistemas enzimáticos, los cuales resolvieron un total de 25 loci. Los ostiones fueron provenientes de tres localidades dentro de la Bahía de San Quintín, B. C. (Acuícola San Quintín, Ostiones Guerrero y Juan Cota), cosechados en noviembre del 2001. Los resultados obtenidos mostraron una diferencia no significativa en la variabilidad genética entre las tres poblaciones de la Bahía. Sin embargo, los resultados también muestran que las tres poblaciones tienen una variabilidad y diversidad genética muy reducida; de 25 loci, 10 fueron monomórficos y 15 polimórficos, y de estos últimos, el 50 % presenta una deficiencia significativa de heterocigotos. Solo la población proveniente de Juan Cota fue polimórfica para IDH, mientras que las otras 2 poblaciones fueron monomórficas para este mismo locus. Según la literatura, los valores de heterocigosis promedio para poblaciones naturales de ostión son de aproximadamente 20% y en las poblaciones analizadas, se encontraron valores de 5.1-5.4 %.

La deficiencia en la variabilidad genética puede deberse a la endogamia producida por el sistema de cruzamiento o métodos de reproducción, como es señalado en la literatura existente.

ABSTRACT

A genetic analysis was made on adult individuals of the japanese oyster *Crassostrea gigas* by a method of starch gel electrophoresis. The analyses comprised the study of 13 enzymatic systems, from which a total of 25 loci were resolved. The oysters were from three sites in Bahía de San Quintín, B. C. (Acuícola San Quintín, Ostiones Guerrero and Juan Cota), and were harvested on November of 2001. These analyses were made by means of starch gel electrophoresis and the values obtained did not show a significant difference in the genetic variability among the three populations of the bay. However, the results also show that the 3 populations have a very low genetic diversity and variability; of the 25 loci analyzed, 10 were monomorphic and 15 polymorphic, and 50% of these polymorphic individuals show a significant heterocigote deficiency. Only the population from Juan Cota was polymorphic for IDH, while the other 2 populations showed monomorphism for this same locus. The mean heterocigote value reported on literature for natural populations of oyster is approximately 20% and on the populations studied here, values between 5.1-5.4% were found.

The genetic variability deficiency might be attributed to endogamy, which is produced by the breeding methods used in the culture systems, as mentioned in the literature reviewed.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Características del ostión japonés.....	6
2. ANTECEDENTES.....	10
3. OBJETIVOS.....	14
4. ÁREA GEOGRÁFICA DE ESTUDIO.....	15
5. MÉTODO.....	20
5.1 Procedencia de las muestras.....	20
5.2 Análisis electroforéticos.....	20
5.3 Interpretación de los zimogramas.....	27
5.4 Estimación de variabilidad genética.....	30
6. RESULTADOS.....	32
7. DISCUSIONES.....	42
8. CONCLUSIONES.....	51
9. ANEXOS.....	52
9.1 Ensayos enzimáticos.....	52
9.2 Amortiguadores de tinción.....	57
10. LITERATURA CITADA.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localizacion de la Bahía de San Quintín.....	16
Figura 2	Localización del sitio de muestreo dentro de Bahía San Quintín.....	18
Figura 3	Diagrama de los patrones característicos esperados para las isozimas en homocigotos y heterocigotos.....	29

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1	Ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i>	7
Fotografía 2	Celda utilizada para las corridas electroforéticas.....	25
Fotografía 3	Electroforegrama con los genotipos revelados para el locus Leucin aminopeptidasa (Lap, gel IV).....	40
Fotografía 4	Electroforegrama con los genotipos revelados para el locus Malato deshidrogenasa (Mdh, gel I).....	40
Fotografía 5	Electroforegrama con los genotipos revelados para el locus Malato deshidrogenasa (Mdh, gel III).....	40
Fotografía 6	Electroforegrama con los genotipos revelados para el locus Esterasa (Est, gel I).....	41
Fotografía 7	Electroforegrama con los genotipos revelados para el locus Esterasa (Est, gel III).....	41
Fotografía 8	Electroforegrama con los genotipos revelados para el locus Esterasa (Est, gel IV).....	41

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Sistema de amortiguadores empleados para el análisis electroforético de los diferentes sistemas enzimáticos ensayados en el ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i>	22
Tabla II	Total de sistemas enzimáticos ensayados por el análisis Electroforético realizado a las poblaciones de <i>Crassostrea gigas</i>	23
Tabla III	Relación de sistemas amortiguadores, condiciones eléctricas iniciales, duración de los ensayos y loci expresados para <i>Crassostrea gigas</i>	24
Tabla IV	Variación alélica en tres poblaciones del ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i> : Acuícola San Quintín, Juan Cota y Ostiones Guerrero.....	35
Tabla V	Resumen de la variación genética para las tres poblaciones del ostión japonés <i>Crassostrea gigas</i> , en donde se denota el no. de alelos por locus, el porcentaje de polimorfismo y los niveles de heterocigosis.....	37
Tabla VI	Prueba de ji-cuadrada para determinar la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para los diferentes loci por clase de genotipos en cada población de <i>Crassostrea gigas</i>	38

1. INTRODUCCIÓN

El Municipio de Ensenada, Baja California, México, es reconocido por la presencia de diversos maricultivos de gran importancia comercial. Dentro de estos cultivos destaca el del ostión japonés *Crassostrea gigas* Thundberg, el cual fue introducido en México en la década de 1970 (Radilla-Camacho, 1988; Rosa-Vélez *et al.*, 1991).

El ostión japonés tiene su origen en el noroeste de Asia y posteriormente se introdujo para su cultivo en Europa, América y Nueva Zelanda (FAO, 2001). El primer cultivo comercial mexicano se realizó en la Bahía de San Quintín, Baja California, en el año de 1976 (Ibarra-Obando, 1980; Villarreal-Chávez, 1993), con semilla proveniente de un laboratorio del estado de Washington en EE.UU., el cual a su vez obtuvo la semilla de poblaciones de Japón (Gutiérrez-Wing, 1988). Periódicamente, se introdujeron en la zona semillas de ostión de diferentes laboratorios y granjas provenientes de Oregon y Washington, EE.UU. (Rosa-Vélez *et al.*, 1991).

Desde el comienzo de su cultivo en Bahía San Quintín, las cosechas fueron exitosas y su desarrollo se fue incrementando a través de los años, gracias en parte a la alta productividad primaria de la zona, propiedad que la caracteriza como una de las lagunas costeras mas fértiles del Océano Pacífico (Lara-Lara, 1975).

Por otro lado, se considera que *C. gigas* es una especie muy adecuada para ser cultivada, debido a los altos niveles de variabilidad genética presentes en

poblaciones naturales (Buroker *et al.*, 1975). Los niveles de heterocigosis promedio reportados para esta especie, son superiores al 20% (Buroker, *et al.* 1975; Buroker, 1979) y ésta característica muy probablemente les confiere la habilidad de poder adaptarse a diversas condiciones ambientales (Rosa-Vélez *et al.* 1991). Con base en lo anterior, en países como EE.UU. y Japón se han establecido programas para la selección y cría de esta especie; y como consecuencia, se han incrementado tanto los niveles de productividad, como los rasgos de interés comercial en la población cultivada (Radilla-Camacho, 1988; Rosa-Vélez, 1991).

En México, y en particular en Baja California, es necesario realizar más investigaciones de este tipo, de manera que se pueda generar conocimiento para determinar, y en su caso manipular la estructura genética de las poblaciones. Rosa-Vélez *et al.* (1991) mencionan que, al conocer la estructura genética de una población, es posible tener una imagen más precisa de la condición de los cultivos, al mismo tiempo que se identifican las modificaciones genéticas eventuales que van surgiendo en los organismos cultivados en las granjas. Estos autores también comentan que “el conocimiento de la dinámica genética es la única forma de pretender el mejoramiento de la especie”.

La estimación de la variabilidad genética de una población se basa en la evaluación de la heterogeneidad de los productos de sus genes estructurales, o dicho de otra manera, el porcentaje de loci en los cuales un individuo medio es heterocigoto (Ayala y Kiger, 1980; Selander, 1980; Valentine, 1980). Los niveles de heterocigosis promedio para una población en particular varían, dependiendo del tipo de organismo.

Según Ayala (1980), dentro de las poblaciones naturales de la mayoría de los organismos, un individuo es heterocigoto en al menos 5-20% de todos sus genes estructurales. Para invertebrados, los valores son del orden de 15%, con proporciones de loci polimórficos del 25-50% (Ayala y Kiger, 1980; Ayala, 1980; Dobzhansky, 1980; Dobzhansky *et al.*, 1980; Valentine, 1980).

Cuando el número de organismos heterocigotos en una población es menor al número esperado (según el equilibrio Hardy-Weinberg), se puede decir que esa población presenta una deficiencia de heterocigotos, o una baja variabilidad genética (Zouros y Foltz, 1984). Rosa-Vélez (1986), menciona que los niveles bajos de variabilidad genética pueden deberse, entre otras cosas, a la edad de la estirpe, a las características biológicas de la especie y a las condiciones del hábitat en el que se desarrolla. Al observar este proceso desde el punto de vista evolutivo, las especies puede sufrir consecuencias que van desde la reducción de la variabilidad genética por endogamia, hasta la extinción, en los casos más severos (Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989).

En contraste, un nivel alto de variabilidad genética le permitirá a determinada especie asegurar su persistencia evolutiva dentro de su área de distribución (Ayala, 1980; Rosa-Vélez, 1986). El Teorema Fundamental de la Selección Natural, propuesto por Fisher (1930) dice que "el ritmo de aumento de la eficacia biológica de una población en cualquier tiempo, es igual a su varianza genética en eficacia biológica en dicho tiempo". En otras palabras, si la eficacia biológica de una especie depende de su variabilidad genética, entonces el hecho de mantener una variabilidad genética alta le

permitirá adaptarse mejor al ambiente en el que se desarrolla y a la vez, le proporcionará una ventaja adaptativa ante las fluctuaciones ambientales (Jonson, 1980; Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989). La persistencia evolutiva de una especie dentro de determinado lugar, puede estimarse determinando los cambios en las frecuencias alélicas por las que han atravesado a través del tiempo y el espacio, y que se dan mediante procesos o fenómenos como la mutación, la migración, la selección natural y la deriva génica (Ayala, 1980; Ayala y Kiger, 1980; Dobzhansky, 1980, Dobzhansky *et al.* 1980).

Uno de los métodos empleados para medir la variabilidad genética de las poblaciones, han sido las técnicas electroforéticas. Estas técnicas fueron perfeccionadas a mediados de la década de 1960 y con ellas se ha permitido el análisis de gran número de proteínas provenientes de diferentes organismos. También han sido la base para el desarrollo de los análisis de variabilidad genética y de la estructura poblacional, con ellas se ha podido demostrar el gran reservorio de variabilidad genética que la mayoría de las poblaciones naturales posee (Rosa-Vélez, 1986; Radilla-Camacho, 1988).

Partiendo de la necesidad urgente que se tiene en Bahía San Quintín para adquirir información básica acerca de la estructura genética que presentan las poblaciones de ostión japonés en cultivo, es que se plantea el presente estudio. En los últimos años, no se han hecho estudios donde se analice y determine la variabilidad isozímica de los ostiones, en las diferentes granjas de cultivo que existen dentro de la bahía.

En el presente estudio se analizaron ostiones adultos de talla comercial, provenientes de tres localidades distintas dentro de Bahía Falsa: Acuícola San Quintín, Ostiones Guerrero y la Cooperativa Juan Cota, con el fin de estimar los niveles de variabilidad genética que presentan a nivel de alozimas y comparar la eventual existencia de diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas entre las tres localidades.

1.1 CARACTERÍSTICAS DEL OSTIÓN JAPONES

A continuación se señalan algunas generalidades del ostión japonés.

Clasificación taxonómica (según Coan *et al.*, 2000).

Filo	Mollusca
Clase	Bivalvia
Subclase	Lamellibranquiata
Suborden	Filibranchia
Familia	Ostreidae
Género	<i>Crassostrea</i>
Especie	<i>gigas</i> Thundberg

Origen geográfico de las poblaciones cultivadas en la actualidad.

Existen cuatro variedades geográficas distintas, provenientes de Japón: Hokkaido, Miyagui, Hiroshima y Kumamoto. Las poblaciones provenientes de cada localidad tienen características distintivas de morfología, tasas de crecimiento, temperatura de desove, adaptabilidad a las condiciones ambientales y textura de su músculo aductor (Ahmed, 1975). Las modificaciones en la forma y estructura de las valvas es de acuerdo a la naturaleza del sustrato de su ambiente, en donde posiblemente también influye la salinidad (Ahmed, 1975) (Fotografía 1).



Fotografía 1 - Ostión japonés *Crassostrea gigas* (la escala está en centímetros).

Hábitat y distribución geográfica

Se distribuyen en Japón y Korea (Imai y Sakai, 1961), China y Rusia Asiática (Stenzel, 1971). Aunque no es su distribución natural, también se les encuentra en EE.UU. y Canadá, pero esto es a causa de su introducción en el Pacífico Noroccidental, con fines acuiculturales (Kittel, 1998).

Estos organismos eurihalinos se desarrollan en lechos ubicados cerca de las orillas del mar, en bahías protegidas y en estuarios (Flores *et al.*, 1974; Ahmed, 1975). Tienen un periodo de vida libre corto que dura aproximadamente 25 días y una vez que se fijan, pierden su movilidad. Su sobrevivencia y crecimiento depende de las condiciones ambientales favorables, como el alimento y la ausencia de depredadores y competidores (Flores *et al.*, 1974).

Régimen alimenticio

Las necesidades nutricionales de estos organismos dependen de su fase de desarrollo, época del año, condiciones de desarrollo, estado fisiológico y características del alimento, entre otros factores. *C. gigas* es un organismo que se alimenta por medio de la filtración, retención, selección y sorteo de las partículas suspendidas en el agua (Jorgensen, 1990).

Características sexuales

Son organismos dioicos, pero una parte de la población puede cambiar de sexo. Los adultos maduros sexualmente, liberan millones de huevos y espermatozoides en cada desove. Los huevos no fertilizados (ocitos) miden alrededor de 35-55 μm . Una vez que los gametos son expulsados al medio, la fertilización y su posterior desarrollo larval ocurren en el mar (Ahmed, 1975). El desove ocurre durante el verano, cuando la temperatura del agua es mayor (Flores *et al.*, 1974).

2. ANTECEDENTES

El primer estudio de caracterización de alozimas sobre *Crassostrea gigas* lo realizó Buroker *et al.* (1975) con organismos cultivados en Mud Bay, Washington, mediante análisis electroforéticos de proteínas de tejido y enzimas. En este estudio se analizaron 11 sistemas enzimáticos con 15 loci, de los cuales 8 fueron polimórficos y 7 monomórficos, con valores de heterocigosis del 21%.

En 1977, Fujino y Nagaya realizaron otro estudio con poblaciones de Mud Bay, Washington, donde encontraron una heterocigocidad promedio del 27%. Por otra parte, Buroker (1979) analizó las similitudes y distancias genéticas entre tres poblaciones japonesas de *C. gigas* y *Saccostrea comercialis*. En dicho estudio se analizaron 18 sistemas enzimáticos, los cuales resolvieron para 30 loci. Se obtuvieron valores de heterocigosis del 20% al 22%. Con base en sus resultados, este autor señaló que *C. gigas* es el molusco bivalvo con el valor de heterocigosis mas alto, el cual le confiere, muy probablemente, una mayor capacidad de adaptación a diversos ambientes.

Los hallazgos de la alta variabilidad genética registrados en muchas poblaciones de esta especie, llevó al establecimiento de programas de selección y cría en países como Japón y Estados Unidos de América (Rosa-Vélez *et al.*, 1991). En estudios más recientes, se han realizado programas de investigación genética en granjas de Japón y América del Norte con el objetivo de caracterizar la estructura genética poblacional de los cultivos. Estos programas se han enfocado a la

investigación de los efectos de la endogamia, la selección artificial y apareamiento sistemático, el efecto de determinados genotipos sobre la sobrevivencia y tasas de crecimiento, la herencia de caracteres de importancia para la ostricultura y la factibilidad de la selección de líneas genéticas con resistencia a enfermedades (Rosa-Vélez *et al.*, 1991).

En otros países como EE.UU., también se han hecho estudios para inducir triploidías y tetraploidías en los ostiones, de manera que los cultivos puedan presentar alguna ventaja reproductiva y/o de crecimiento (Standish y Bushek, 1992; Desrosiers *et al.*, 1993; Guo y Allen, 1994; Eudeline *et al.*, 1999). Generalmente estos cultivos tienen un crecimiento de hasta un 60% más rápido que las poblaciones naturales y además pueden comercializarse durante todo el año (Allen, 1998; Eudeline, 1999).

En México, los estudios de variabilidad genética de ostión por medio de alozimas, son escasos. Rosa-Vélez (1986) realizó el primero con 8 poblaciones naturales de la especie *Crassostrea virginica*, provenientes del Golfo de México, en donde analizó 10 sistemas enzimáticos por electroforesis en gel de almidón. Como resultado, encontró que el polimorfismo promedio fue de $43.2\% \pm 2.6\%$, con una heterocigosis media del $17.4\% \pm 4.0\%$, en donde 4 de las 8 poblaciones analizadas presentaron deficiencia de heterocigotos.

El primer análisis genético de la especie *Crassostrea gigas* en Baja California, lo realizó Radilla-Camacho (1988), en una población cultivada en Bahía San Quintín, B.

C. En este estudio se examinó un solo locus (Mp-1) y se encontró a la población en estado polimórfico para ese locus, con una heterocigosis del 89%.

Rosa-Vélez *et al.* (1991), realizaron otro estudio con poblaciones de Bahía San Quintín, B. C., en donde se examinaron 7 loci génicos. Estos autores propusieron que la población analizada de San Quintín, presentó un valor alto de similitud genética con respecto a las poblaciones de Japón. Por otro lado, reportaron que los cultivos no mostraron pérdida significativa de su variabilidad genética, a pesar de que en teoría, se esperaba lo contrario al cultivar una especie o población que ha sido introducida, como consecuencia de la reducción del tamaño de las poblaciones en cultivo y a la exposición de los organismos a presiones ambientales selectivas en función de su posición geográfica. Estos autores recomiendan efectuar seguimientos genéticos de los cultivos con el tiempo y llevar un registro de los eventos reproductivos e introducción de semilla. A pesar de esto, después del estudio efectuado en 1991, no se volvieron a hacer análisis de variabilidad alozímica dentro de Bahía San Quintín, hasta el año 2001, por Correa *et al.* (En prensa). En este estudio se determinó el estado de salud genética de las poblaciones cultivadas en tres años consecutivos (1999, 2000 y 2001) y se encontró que los niveles de variabilidad genética se han reducido en forma importante, al compararlos con el estudio realizado en 1991 por Rosa-Vélez *et al.* La heterocigosis observada fue de 1-5%, siendo estos valores significativamente más bajos que los reportados en la literatura, los cuales se encuentran alrededor del 20% (Buroker *et al.*, 1975). Esta disminución en la variabilidad genética la atribuyen principalmente a la endogamia producida por el número reducido de reproductores, además de factores selectivos.

El método mediante el cual se ha logrado determinar la variabilidad genética de los ostiones en los análisis mencionados anteriormente, ha sido la electroforesis en gel de almidón. Estos métodos histoquímicos para tinción de proteínas fueron desarrollados por Hunter y Moller en 1957, cuando utilizaron las propiedades catalíticas de las proteínas para revelar su presencia (Pasteur *et al.*, 1988). Al colocar estas proteínas en un medio que contenga su sustrato, junto con algunas sustancias químicas necesarias para su actividad (coenzimas, iones, etc.), el sustrato se transforma. Si uno de los componentes de la reacción se tiñe, entonces se puede calcular la posición a la que la proteína ha migrado (Pasteur *et al.*, 1988).

Las bandas que aparecen en el gel son llamadas alozimas, y corresponden a las diferentes proteínas de las muestras, sintetizadas por uno o varios genes. Las bandas de los geles pueden traducirse entonces, como fenotipos enzimáticos y estos a su vez, son interpretados como genotipos.

Pasteur *et al.* (1988), mencionan que los genes que codifican para proteínas tienen dos propiedades que los hace ideales para los estudios de variabilidad genética: (1) una proporción muy importante de estos genes es polimórfica y (2) los alelos de estos genes, por lo general se expresan en organismos heterocigotos (codominancia), por lo que se puede relacionar el fenotipo observado con el genotipo. Los genes empleados para realizar análisis de este tipo pueden considerarse como una muestra al azar del genoma total de un organismo determinado y su detección depende tanto de los reactivos que se tengan disponibles, así como de los costos (Pasteur *et al.*, 1988).

3. OBJETIVOS

- Determinar los niveles de variabilidad genética en organismos adultos del ostión japonés *Crassostrea gigas* de talla comercial, cultivados en diferentes laboratorios comerciales de Bahía Falsa en San Quintín.
- Comparar las frecuencias alélicas y genotípicas del ostion japonés entre las tres localidades de cultivo: Acuícola San Quintín, Juan Cota y Ostiones Guerrero.

4. ÁREA GEOGRÁFICA DE ESTUDIO

La delegación de San Quintín se encuentra dentro del Municipio de Ensenada, Baja California, aproximadamente a 200 km hacia el sur. En la costa noroccidental de esta delegación se encuentra la Bahía de San Quintín entre los $30^{\circ} 24'$ y $30^{\circ} 30' N$; y los $115^{\circ} 57'$ y $116^{\circ} 01' W$ (Nishikawa, 1979). Esta bahía cubre una superficie de 42 km² y tiene forma de "Y" orientada en dirección norte-sur.

Por sus características es considerada como una laguna costera somera típica, al encontrarse separada del océano por las barras arenosas de Punta Azufre y Punta Laguna. No tiene aporte de agua dulce de ningún río, pero está comunicada permanentemente con el mar a través de Arroyo San Simón, localizado en la boca de la parte inferior de la "Y" (Villarreal-Chávez, 1993).

Al brazo este de la laguna se le conoce como Bahía San Quintín y al oeste se le conoce como Bahía Falsa (Fig. 1). Al conjunto de ambos se le denomina Bahía San Quintín. Los dos brazos son muy someros y la mayor parte de la bahía tiene menos de 3 m de profundidad, a excepción de una serie de canales estrechos longitudinales que no pasan de los 15 m (Lara-Lara, 1975). Los dos brazos de la Bahía presentan características distintivas: el brazo este es más largo que el oeste y Gorsline y Stewart (1962), sugieren que también es el más antiguo y complejo.

Bahía Falsa tiene características de una laguna costera normal, por estar separada del mar por una barra arenosa con dunas y poseer su eje paralelo a la línea

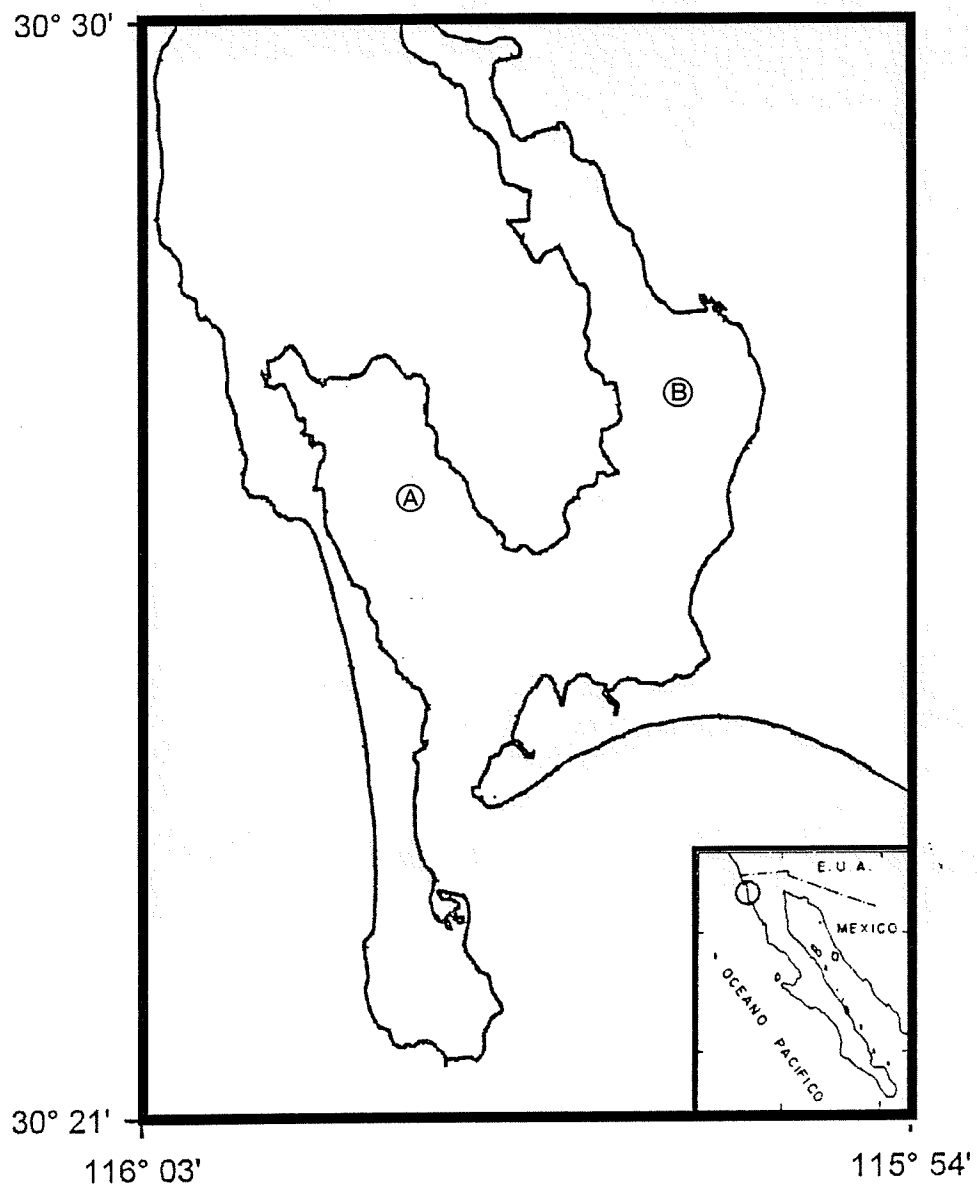


Figura 1 - Localización de Bahía San Quintín: A = Bahía Falsa, B = Bahía San Quintín.

de la costa (Phleger, 1969; Villarreal-Chávez, 1993). Tiene una longitud de 7 km, y un ancho superficial de 2 km en promedio. Su canal principal está orientado hacia la derecha y tiene una profundidad máxima de 15 m, aunque la mayor parte de la bahía tiene una profundidad de 2 m en marea baja. (Lara-Lara, 1975; Villarreal-Chavez, 1993). Hacia el oeste tiene una barra arenosa que lo separa del Océano Pacífico y hacia el sur tiene otra barra arenosa que forma parte de la división del brazo oriental con Bahía Falsa (Villarreal-Chávez, 1993). En este sitio se encuentran las empresas dedicadas al cultivo comercial del ostión japonés (Fig. 2).

Bahía San Quintín tiene una profundidad de 13 m en su canal principal, un ancho superficial variable y una longitud de 11 km, siendo más angosta que la anterior (Lara-Lara, 1975). Su eje es perpendicular a la costa y tiene un arroyo incipiente en su cabecera. Esta parte de la bahía se encuentra sujeta a procesos de sedimentación más complejos y tiene mayores extensiones de marismas con respecto a Bahía Falsa (Villarreal-Chávez, 1993).

Las corrientes marinas superficiales dentro de la bahía son esporádicas y de variable intensidad, ocasionadas en parte por las corrientes de viento, principalmente durante el invierno. Tanto Bahía San Quintín como Bahía Falsa reciben un alto ingreso de nutrientes durante todo el año, pero es mayor durante la estación de verano, cuando las surgencias son más activas. El aporte de nutrientes también se da por la presencia y abundancia del pasto marino *Zostera marina*, que tiene una producción primaria alta de hojas y de rizomas (Ibarra-Obando, 1985). Igualmente abundan otras fanerógamas cerca de la línea de marea y en zonas arenosas tales como *Spartina* sp.

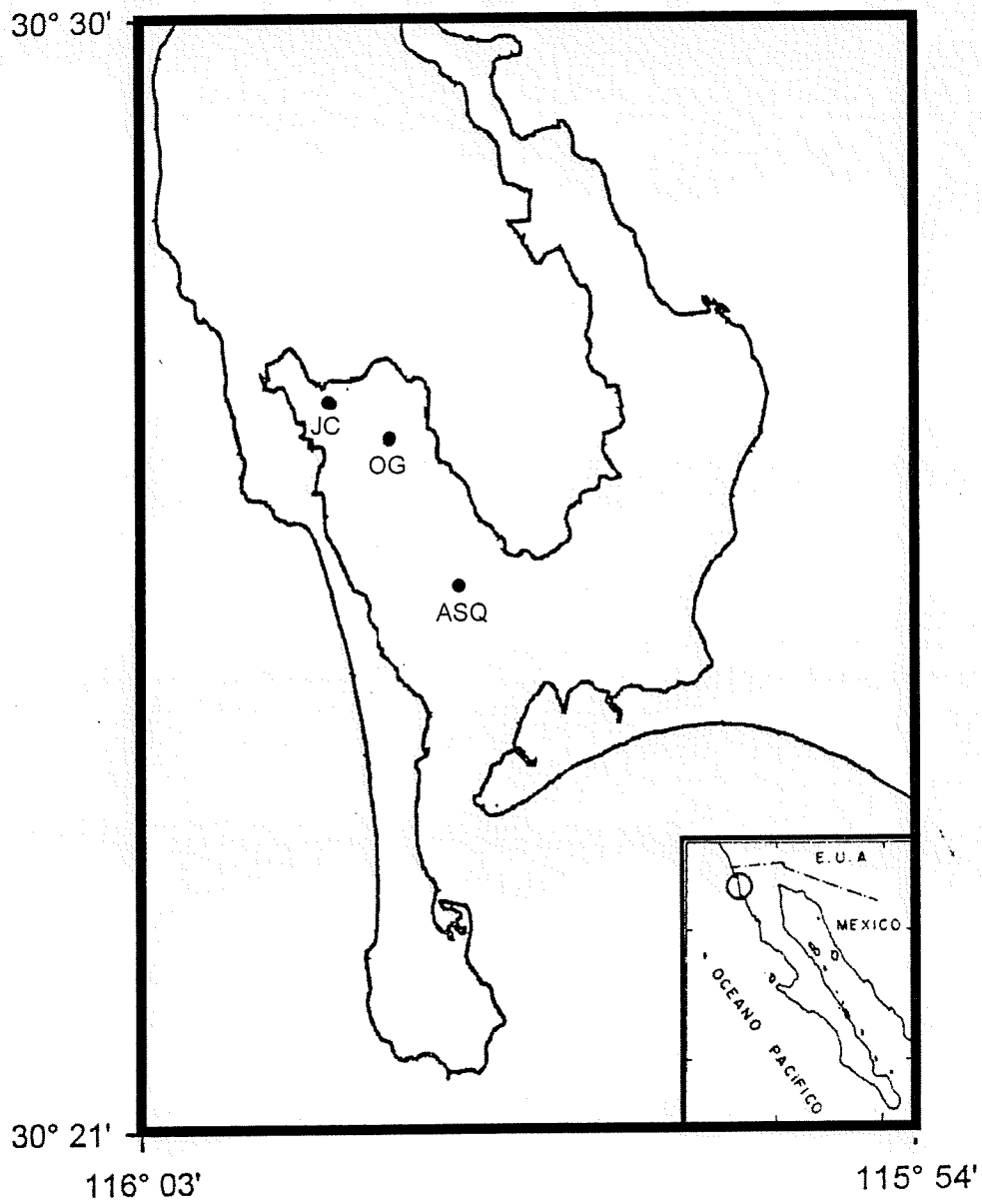


Figura 2 - Localización del sitio de muestreo dentro de Bahía San Quintín:
JC = JuanCota, OG = Ostiones Guerrero y ASQ = Acuícola San Quintín.

y *Salicornia* sp., las cuales desempeñan un papel importante en la distribución de la materia orgánica que penetra del mar adyacente (Bernard, 1964). La región adyacente a la Bahía de San Quintín tiene un clima semiárido templado, con temporadas de lluvia durante el invierno. La temperatura promedio en el verano es de 24 °C y en el invierno de 12 °C, con una temperatura media anual registrada de 16 °C (Villarreal-Chávez, 1993). Los suelos que predominan en el lecho de la bahía, y en especial sobre el brazo este, es uniforme formado por pequeños promontorios aplanados en forma irregular y cubiertos abundantemente por praderas de *Z. marina* (Nishikawa, 1979). El sedimento que lo conforma varía desde limos hasta arenas gruesas y los organismos presentes más comunes son los anélidos, moluscos, gasterópodos y anfípodos (Villarreal-Chávez, 1993).

5. MÉTODO

5.1 Procedencia de las muestras

Se recolectaron especímenes de *Crassostrea gigas* provenientes de tres laboratorios comerciales de Bahía Falsa en San Quintín Baja California, en donde fueron cultivados durante 9 meses hasta alcanzar la talla comercial. Se recolectaron un mínimo de 50 organismos por población y se transportaron en hieleras cerradas herméticamente a 0 °C, al laboratorio de Genética y Biología Molecular, del Instituto de Investigaciones Oceanológicas.

5.2 Análisis electroforéticos

En el laboratorio, los organismos se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas y se congelaron a -70 °C. Una vez congelados, se les extrajo la glándula digestiva y el músculo aductor, los cuales se homogeneizaron por separado, empleando una solución Tris – HCl 0.2M pH 8.0 y PMSF para inhibir la actividad de las proteasas. El homogeneizado se centrifugó durante 20 minutos a 10,000 rpm a 4 °C y el sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf, previamente etiquetados. Posteriormente, las muestras se almacenaron a -70 °C.

Para los análisis electroforéticos se utilizó el sistema en gel de almidón al 10%, preparado de acuerdo al método Hedgecock (Rodríguez, 1998). En un matraz kitasato se mezclaron 50 g del almidón en 500 mL de la solución amortiguadora correspondiente,

dependiendo del sistema enzimático que se fuera a analizar (Tabla I y II). De esta solución amortiguadora inicial, se separaron 350 mL para calentarlos en una plancha hasta su ebullición y éstos después se agregaron a los 150 mL restantes del almidón disuelto. Después se eliminó el aire atrapado en el gel con una bomba de vacío, hasta que desaparecieron las burbujas, e inmediatamente después se vertió el gel con cuidado, sobre una placa de acrílico.

Una vez que el gel se consolidó a temperatura ambiente, se realizó un corte transversal a 3 cm del borde inferior, en donde se insertaron las mechas de papel filtro Watman # 3 de 1 x 0.5 cm saturadas con las muestras individuales de sobrenadante. Se colocó otra mecha saturada con azul de bromofenol al 0.0002 % junto con las muestras con el fin de observar el desplazamiento de las proteínas a través del campo electroforético. Después, las dos secciones del gel se juntaron para sujetar las mechas. Posteriormente, el gel se colocó sobre una celda vertical (Biorad, modelo / Owl, sist. Horizontal) para electroforesis y se puso en contacto con la solución amortiguadora correspondiente (Tabla I), mediante papel filtro Watman # 1, formando un puente de flujo eléctrico entre un extremo del gel (cátodo) y el otro (ánodo). La celda electroforética se colocó dentro de un refrigerador de cromatografía a 4 °C y se conectó a una fuente de poder de alto voltaje (Termo EC Serie 90). En la Tabla III se muestran las condiciones eléctricas iniciales, así como tiempos de duración de las corridas electroforéticas para cada uno de los sistemas amortiguadores empleados en el análisis de isozimas. Asimismo, en la Fotografía 2 se aprecia una celda para electroforesis utilizada para los análisis realizados para las tres poblaciones de la Bahía de San Quintín.

Tabla I. Sistema de amortiguadores empleados para el análisis electroforético de los diferentes sistemas enzimáticos ensayados en el ostión japonés *Crassostrea gigas*.

Clave	Amortiguador	Abrev.	Gel	Electrodo
A	Tris-EDTA-Borato (Abreu, 1983)	TEB	24.24 gm Tris 56.00 gm Ácido bórico 23.96 gm Na-EDTA 4.00 L H ₂ O destilada Ajustar pH a 8.6	242.28 gm Tris 56.00 gm Ácido Bórico 23.96 gm Na-EDTA 4.00 L H ₂ O destilada Ajustar pH a 8.6
B	Tris-EDTA-Citrato (Abreu, 1983)	TEC	16.35 gm Tris 9.04 gm Ácido cítrico 6.90 gm Na-EDTA 1.00 L H ₂ O destilada Ajustar pH a 7.1	a) Solución stock: 65.40 gm Tris 36.04 gm Ácido cítrico 1.84 gm Na-EDTA 4.00 L H ₂ O destilada b) Diluir 1:15 solución stock Ajustar pH a 7.1
C	Tris-Citrato/Borato- Hidroxido (Poulik, 1957; Abreu, 1983)	POULIK	36.84 gm Tris 4.20 gm Ácido cítrico 4.00 L H ₂ O destilada Ajustar pH a 8.7	74.20 gm Ácido bórico 9.60 gm NaOH 4.00 L H ₂ O destilada Ajustar pH a 8.2
D	Tris-EDTA-Citrato (Abreu, 1983)	TEC	16.35 gm Tris 9.04 gm Ácido cítrico 6.90 gm Na-EDTA 1.00 L H ₂ O destilada Ajustar pH a 8.0	a) Solución stock: 65.40 gm Tris 36.04 gm Ácido cítrico 1.84 gm Na-EDTA 4.00 L H ₂ O destilada b) Diluir 1:15 solución stock Ajustar pH a 8.0

Tabla II. Sistemas enzimáticos ensayados por el análisis electroforético realizado a las poblaciones de *Crassostrea gigas*, cultivadas en Bahía San Quintín, BC. Se denota el código EC* para cada sistema enzimático, su abreviatura, su estructura cuaternaria, la clave del sistema amortiguador empleado y el número de loci expresados por sistema.

Número EC	Sistema enzimático	Abreviatura	Estructura cuaternaria	Sistema amortiguador
1.1.1.37	Malato deshidrogenasa	MDH	Dimérica	B
1.1.1.40.	Enzima málica	ME	Tetramérica	D
1.1.1.42.	Isocitrato deshidrogenasa	IDH	Dimérica	B
1.1.1.49.	Glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa	G6PDH	Dimérica	B
1.2.1.12.	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	GPD	Tetramérica	D
2.7.1.1.	Hexoquinasa	HK	Monomérica	A
3.1.1.1.	Carboxilesterasas	EST	Monomérica	B
3.1.1.1.	Carboxilesterasa	EST-D	Dimérica	B
3.1.3.1.	Fosfatasa alcalina	ALP	Dimérica	D
3.2.1.1.	Amilasa	AMY	Monomérica	A
3.4.11.1.	Leucil amino peptidasa	LAP	Monomérica	A
3.4.13.18	Citosol dipeptidasa	PEP	Dimérica	C
5.3.1.8.	Manosa-6-fosfato isomerasa	MPI	Monomérica	A
5.4.2.2.	Fosfoglucomutasa	PGM	Monomérica	A

* Clasificación y nomenclatura enzimática de acuerdo a la NC-IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 2003*).

Tabla III. Relación de los sistemas amortiguadores, condiciones eléctricas iniciales, duración de los ensayos y loci expresados para *Crassostrea gigas*.

Sistema Amortiguador	Condiciones Eléctricas Iniciales			Duración (horas)	Loci Expresados
	(mA)	(volts)	(watts)		
A. TEB pH 8.6	50	200	50	6	Pgm (M) Lap-1; Lap-2; Lap-3(G) Amy-1; Amy-2; Amy-3(G) Mpi-1; Mpi-2 (M)
B. TEC pH 7.1	50	190	50	6	Est-D (G) 6Pgdh (M) Mdh-1;Mdh-2 (M) Est-2; Est-3 (M) ldh-1; ldh-2 (M)
C. POULIK	35	350	50	15	Pep-1; Pep-2; Pep-3 (M)
D. TEC pH 8.0	50	200	50	8	Alp (G) Gpd (M) Me-1; Me-2,(M) Hk (M)

M = Músculo, G = Glándula digestiva.

Concluido el tiempo fijado para la migración de las proteínas, se retiró la corriente de las celdas. Por cada gel, se obtuvieron de 3 a 4 rebanadas, haciendo cortes longitudinales con una cuerda de guitarra (no. 1) y se revelaron con tinciones histoquímicas, las cuales son específicas para cada sistema enzimático.

La tinción de los geles se realizó colocando cada rebanada en una charola y vertiendo la solución histoquímica requerida para el revelado de la enzima en particular (ver Apéndice I y II). Los sistemas enzimáticos se escogieron al azar con respecto a su función metabólica y dependiendo de la disponibilidad de reactivos.



Fotografía 2. Celda utilizada para las corridas electroforéticas. Se observan los electrodos, la zona en donde se deposita el gel de almidón con las muestras, y los contenedores para el amortiguador del electrodo.

Según Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero (1989), la solución histoquímica debe contener: (1) el sustrato específico de la enzima que se desee revelar, (2) coenzimas, (3) los cofactores requeridos para la reacción y (4) el pH y la temperatura óptimos de la enzima. De acuerdo con el principio anterior, los geles se colocaron en una incubadora a 37 °C hasta que aparecieron las bandas, las cuales son interpretadas como zonas de actividad enzimática (Rosa-Vélez, 1986; Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989). El análisis constó de 13 sistemas enzimáticos, los cuales revelaron un total de 25 loci por población.

En el anexo I se muestran los ensayos enzimáticos realizados para revelar los loci analizados en este estudio. En la Tabla II se muestran los códigos recomendados EC para las enzimas analizadas, actualizados de la Base de Datos "Enzyme", boletín periódico de *The Nomenclature Comitee of the International Union of Biochemistry*, así como los sistemas amortiguadores empleados con sus respectivas fórmulas. Con fines prácticos, se señala la nomenclatura asignada a las poblaciones aquí estudiadas:

ASQ	=	Acuícola San Quintín
JC	=	Juan Cota
OG	=	Ostiones Guerrero

De manera recurrente, se hará mención a estos códigos tanto en la sección de resultados como en la discusión.

5.3 Interpretación de los zimogramas

Los zimogramas son los electroforegramas revelados para una enzima en particular. A las bandas que aparecen en los zimogramas se les denomina electromorfos y éstas son regiones de actividad enzimática (King y Ohta, 1975). Cuando un sistema enzimático está compuesto por una subunidad, las enzimas son llamadas monoméricas y cuando está compuesto por dos o más subunidades, las enzimas son multiméricas. Cuando existen dos o más subunidades, cada enzima es llamada isozima y tales subunidades pueden tener una secuencia de aminoácidos iguales (isozimas homoméricas) o diferentes (isozimas heteroméricas). El patrón que se observa después de una corrida electroforética, dependerá del número de subunidades que tenga tal isozima (Harris y Hopkins, 1978).

Cuando en un locus existen dos o más alelos que codifican para una cadena polipeptídica en particular, pueden suceder dos cosas: (1) que se produzca un individuo homocigoto para ese locus, en el cual sus dos alelos codifican para formar el mismo tipo de cadena polipeptídica o, (2) que se produzca un individuo heterocigoto para tal locus, en el cual sus dos alelos codifican para formar dos cadenas polipeptídicas estructuralmente diferentes (Harris y Hopkins, 1978).

El heterocigoto formado por enzimas monoméricas (con una sola subunidad), estará compuesto por dos formas enzimáticas diferentes, mientras que el homocigoto estará compuesto por dos formas enzimáticas iguales.

El heterocigoto formado por enzimas multiméricas (más de dos subunidades), estará compuesto por varias formas de enzimas heteroméricas, mientras que el homocigoto, por las enzimas homoméricas correspondientes. El número de subunidades presentes en las isozimas se puede clasificar de la siguiente forma:

Dímeros = dos subunidades homocigotas y una subunidad heterocigota

Trímeros = dos subunidades homocigotas y dos subunidades heterocigotas

Tetrámeros = dos subunidades homocigotas y tres subunidades heterocigotas, y así sucesivamente (Harris y Hopkins, 1978).

Una forma simplificada de verlo es: el número de subunidades idénticas presentes en una isozima sintetizada por un homocigoto es n y en un heterocigoto $n+1$, y de éstos, 2 formas serán homoméricas y $n-1$ heteroméricas.

Si las cadenas polipeptídicas difieren en su carga neta, las isozimas formadas por los loci heterocigotos presentarán patrones electroforéticos característicos, como los que se observan en la figura 4.

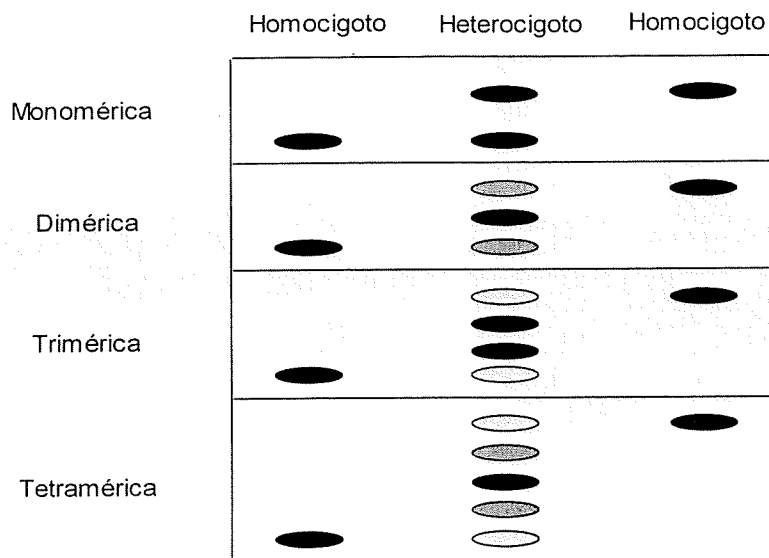


Fig. 3. Diagrama de los patrones característicos esperados para las isozimas en homocigotos y heterocigotos. Se describe el patrón para enzimas que presentan una estructura cuaternaria monomérica, dimérica, trimérica y tetramérica (Harris y Hopkins, 1978).

Los electromorfos generalmente son numerados en orden ascendente, según su movilidad catódica, designando como A al alelo de mayor movilidad; B al segundo, y así sucesivamente (Trujillo-Ortiz, 2002).

La movilidad electroforética depende de la carga eléctrica de la proteína dentro del medio electroforético, así como de su tamaño, forma y de las asociaciones que puedan tener con otros compuestos susceptibles a la ionización (Pasteur, 1988). En el campo electroforético, los individuos homocigotos revelarán una sola banda con determinada movilidad, mientras que los heterocigotos revelarán dos o más. De esta forma se puede interpretar las frecuencias electromórficas obtenidas, en frecuencias alélicas y éstas a su vez se pueden entender como genotipos (Rosa-Vélez, 1989; Trujillo-Ortiz, 2002).

5.4 Estimación de la variabilidad genética

Para analizar los datos obtenidos, se utilizaron los programas para PC BIOSYS – 1.0 (Swofford y Selander, 1989) y GENEPOP 3.0 (Raymond y Rousset, 1995), para determinar la variación genética de cada población de individuos heterocigotos y la proporción de loci polimórficos al nivel $P_{0.95}$. Se cuantificó el apartamiento del equilibrio Hardy-Weinberg con la prueba ji cuadrada (Sokal y Rohlf, 1981) mediante la fórmula:

$$\chi^2 = \sum (O-A)^2 / A$$

Donde: O = frecuencia observada y A = frecuencia esperada

A esta prueba se le aplicó la corrección Levene (1949) para muestras pequeñas (Trujillo-Ortiz, 2002).

La hipótesis nula fue la independencia entre la variación alélica de los loci polimórficos de cada población con respecto al resto de las poblaciones y el valor de $P < 0.05$ indica el rechazo de la hipótesis nula.

A los alelos se les designó las letras A, B, C, y así sucesivamente (para describir al alelo que ha alcanzado la mayor distancia al ánodo desde el origen) según la opción # 1 del programa BIOSYS. La heterocigosis esperada (H_e) fue calculada por los programas mediante la expresión:

$$H_e = 1 - \sum (x_i^2)$$

Donde x_i es la frecuencia del i ésimo alelo del locus.

La heterocigosis esperada sin sesgo (H_e (ss)), se basa en las expectativas condicionales de Levene (1949) y Nei (1978) para muestras pequeñas. El estimador D se obtuvo mediante la expresión:

$$D = (H_o - H_e) / H_e$$

Donde H_o = heterocigosis observada y H_e = heterocigosis esperada.

Un valor positivo en esta relación es un indicador de un exceso de heterocigotos y uno negativo indica una deficiencia de heterocigotos (Abreu – Grobois, 1983).

6. RESULTADOS

Para las poblaciones de ostión japonés cultivadas en Bahía San Quintín, se obtuvieron un total de 25 loci, de los cuales 15 resultaron monomórficos: Mdh-2, Me-2, Idh-2, G6pdh, Gpd, Est-1, Est-2, Est-D, Amy-1, Amy-2, Lap-2, Pep-2, Pep-3, Mpi-2, Pgm-2; los 10 restantes fueron polimórficos: Mdh-1, Me-1, Hk-1, Est-3, Alp-2, Lap-1, Pep-1, Idh-1, Mpi-1, Pgm-1; y solo Idh-1 fue monomórfica para ASQ y OG, pero polimórfica para JC (Tabla IV). En algunos casos se presentaron alelos con una frecuencia menor a 0.1, como en la población de ASQ donde el alelo B de los loci Mdh-1, Est-3, Lap-1, Mpi-1 y Pgm-1 presentó una frecuencia de 0.071, 0.042, 0.097, 0.083, y 0.042, respectivamente. Para la población de JC, el alelo B de los loci Mdh-1, Idh-1, Lap-1, Mpi-1 y Pgm-1 registró una frecuencia de 0.097, 0.028, 0.069, 0.097, y 0.040. De igual forma, para la población de OG, el alelo B de Mdh-1, Lap-1, Pgm-1, se observaron valores de 0.029, 0.086 y 0.040, respectivamente (Tabla IV).

El número promedio de alelos por locus se mantuvo entre 1.4 ± 0.1 para las tres poblaciones en estudio. Con respecto al porcentaje de loci polimórficos, el valor más bajo se registro para las poblaciones ASQ Y OG con un valor del 28.0%, mientras que el valor más alto se obtuvo para la población de JC con 32.0% (Tabla V).

La heterocigosis observada para la población de ASQ registró un valor de 0.047 ± 0.014 , el cual es inferior a las otras dos poblaciones, en donde se obtuvieron valores de 0.052 para JC y 0.050 para OG. De acuerdo a la prueba χ^2 , no existen diferencias estadísticas significativas en la comparación de los valores promedio entre

la heterocigosis observada y esperada, para cada una de las tres poblaciones (Tabla V). En la Tabla VI se muestran los resultados de la prueba χ^2 , con los cuales se determinó la desviación con respecto al modelo Hardy-Weinberg para los diferentes loci polimórficos encontrados en cada población.

La población de ASQ muestra una deficiencia de heterocigotos altamente significativa para cuatro loci: Hk-1, Alp-2, Pep-1 y Pgm-1 ($P < 0.0001$). Los cinco loci polimórficos restantes, analizados para esa población, no mostraron una deficiencia de heterocigotos significativa: Mdh-1 $\chi^2 = 5.690$, $P = 0.17$ y $D = -0.363$; Me-1 $\chi^2 = 4.780$, $P = 0.29$ y $D = -0.352$; Est-3 $\chi^2 = 0.045$, $P = .832$ y $D = 0.029$; Lap-1 $\chi^2 = 0.353$, $P = .552$ y $D = 0.092$; Mpi-1 $\chi^2 = 0.245$, $P = 0.621$ y $D = 0.076$ (Tabla VI).

Para el caso de JC, cuatro loci polimórficos analizados mostraron deficiencias significativas de heterocigotos: Idh-1, Hk-1, Alp-2 y Pep-1. Me-1 y Est-3 también mostraron una deficiencia significativa ($P = 0.001$ y $P = 0.002$ respectivamente). Mientras que para los cuatro loci restantes de esa población, se encontraron valores de heterocigosis superiores a 0.0001: Mdh-1 $\chi^2 = 2.003$, $P = 0.157$ y $D = -0.220$; Lap-1 $\chi^2 = 0.158$, $P = 0.691$ y $D = 0.060$; Mpi $\chi^2 = 0.353$, $P = 0.552$ y $D = 0.092$; Pgm $\chi^2 = 0.021$, $P = 0.884$ y $D = 0.021$ (Tabla VI).

Para la población de OG, se encontraron deficiencias de heterocigotos para los loci Hk-1, Alp-2 y Pep-1. En el locus Me-1 también se encontró una deficiencia significativa ($P=0.001$). De igual forma, en los siguientes loci no se encontraron deficiencias de heterocigotos significativas: Mdh-1 $\chi^2 = 0.015$, $P = 0.903$ y $D = 0.015$;

Est-3 $\chi^2 = 0.562$, $P = 0.453$ y $D = -0.120$; Lap-1 $\chi^2 = 0.253$, $P = 0.615$ y $D = 0.078$; Mpi-1 $\chi^2 = 0.366$, $P = 0.545$ y $D = 0.095$; Pgm-1 $\chi^2 = 0.021$, $P = 0.884$ y $D = 0.021$ (Tabla VI).

Los valores de heterocigosis esperados en las tres poblaciones fueron comparados entre sí, analizando sus promedios mediante la prueba "T". Según esta prueba, no se encontraron diferencias significativas entre ellas (ASQ-JC, $P = 0.5921$; ASQ-OG, $P = 0.8693$; JC-OG, $P = 0.7123$).

En las fotografías 3, 4 y 5 se muestran ejemplos de geles revelados para los loci Lap y Mdh, bajo las condiciones electroforéticas descritas en la Tabla III (TEB, pH 8.6 y TEC, pH 7.1 respectivamente). En estos geles se evidencian zonas de movilidad electroforética, en donde el alelo más común fue designado con la letra A y al segundo más común con la letra B. Para este locus, se observaron tres genotipos: AA, AB y BB.

En las fotografías 6, 7 y 8 se observan otros tres ejemplos de geles corridos para el locus Est (TEC, pH 7.1). De igual forma, en estas fotografías se observan dos zonas de movilidad electroforética diferente, y se utilizó la misma designación para los alelos: AA, AB Y BB.

Tabla IV. Variación alélica en tres poblaciones del ostión japonés *Crassostrea gigas*: ASQ, JC y OG, Acuícola San Quintín, Juan Cota y Ostiones Guerrero, respectivamente; A y B: alelos.

Locus	Alelo	ASQ	JC	OG
Mdh-1	n	70	72	70
	A	0.929	0.903	0.917
	B	0.071	0.097	0.029
Mdh-2	n	64	72	70
	A	1.000	1.000	1.000
Me-1	n	72	72	70
	A	0.819	0.750	0.814
	B	0.181	0.250	0.186
Me-2	n	72	72	70
	A	1.000	1.000	1.000
ldh-1	n	72	72	70
	A	1.000	0.972	1.000
	B	----	0.028	---
ldh-2	n	72	72	70
	A	1.000	1.000	1.000
G6pdh	n	72	72	70
	A	1.000	1.000	1.000
Gpd	n	70	72	70
	A	1.000	1.000	1.000
Hk-1	n	72	72	70
	A	0.722	0.694	0.714
	B	0.278	0.306	0.286
Est-1	n	72	72	70
	A	1.000	1.000	1.000
Est-2	n	72	72	72
	A	1.000	1.000	1.000
Est-3	n	72	68	70
	A	0.958	0.691	0.871
	B	0.042	0.309	0.129
Est-D	n	70	72	70
	A	1.0000	1.000	1.000
Alp-2	n	72	70	70
	A	0.667	0.714	0.600
	B	0.333	0.286	0.400
Amy-1	n	72	72	70
	A	1.000	1.000	1.000
Amy-2	n	72	72	70
	A	1.000	1.000	1.000

Tabla IV. continuación.

Locus	Alelo	ASQ	JC	OG
Lap-1	n	72	72	70
	A	0.903	0.931	0.914
	B	0.097	0.069	0.086
Lap-2	n	72	72	70
	A	1.000	1.000	1.000
Pep-1	n	72	70	70
	A	0.264	0.414	0.686
	B	0.736	0.586	0.314
Pep-2	n	72	72	70
	A	1.000	1.000	1.000
Pep-3	n	72	72	70
	A	1.000	1.000	1.000
Mpi-1	n	72	72	70
	A	0.917	0.903	0.900
	B	0.083	0.097	0.100
Mpi-2	n	72	72	70
	A	1.000	1.000	1.000
Pgm-1	n	72	50	50
	A	0.958	0.960	0.960
	B	0.042	0.040	0.040
Pgm-2	n	72	72	70
	A	1.000	1.000	1.000

Tabla V. Resumen de la variación genética para las tres poblaciones del ostión japonés *Crassostrea gigas*, en donde se denota el número de alelos por locus, el porcentaje de polimorfismo, y los niveles de heterocigosis (ASQ = Acuícola San Quintín, JC = Juan Cota y OG = Ostiones Guerrero).

Poblacion		ASQ	JC	OG
Numero promedio de individuos analizados		35.7± 0.2	35.4 ± 0.4	34.6 ± 0.4
Numero promedio de alelos por locus		1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1
% de loci polimorficos ($P_{0.95}$)		28.0	32.0	28.0
Heterocigosidad	Ho	0.047± 0.014	0.052± 0.015	0.050± 0.037
	He	0.087± 0.029	0.111± 0.034	0.094± 0.043
χ^2		Ns	ns	ns

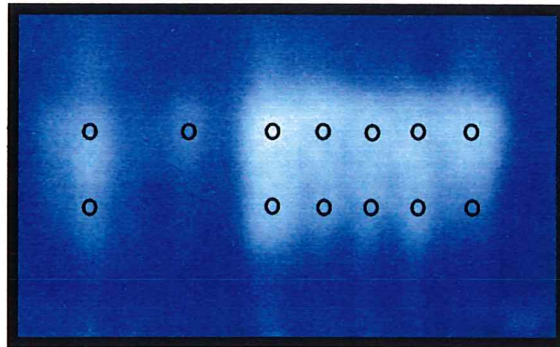
Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada (sin sesgo); ns: no significativo.

Tabla VI. Prueba ji cuadrada (χ^2) para determinar la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para los diferentes loci por clases de genotipos en cada población de *Crassostrea gigas*. g.l., grados de libertad; P, probabilidad < 0.05; D, deficiencia de heterocigosis (ASQ = Acuícola San Quintín, JC = Juan Cota y OG = Ostiones Guerrero).

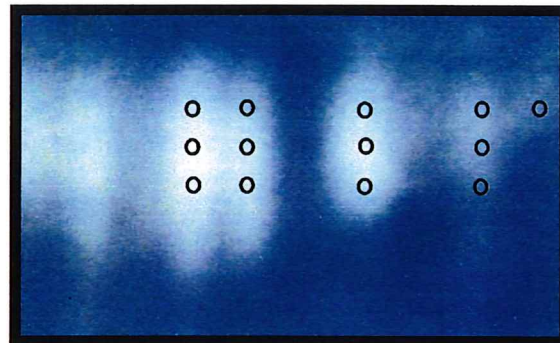
Población	Locus	Clase	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	χ^2	g.l.	P	D
ASQ	Mdh-1	AA	31	30.145	5.690	1	0.017	-0.363
		AB	3	4.710				
		BB	1	0.145				
	Me-1	AA	26	24.099	4.780	1	0.029	-0.352
		AB	7	10.803				
		BB	3	1.099				
	Hk-1	AA	24	18.676	19.850	1	0	-0.727
		AB	4	14.648				
		BB	8	2.676				
	Est-3	AA	33	33.042	0.045	1	0.832	0.029
		AB	3	2.915				
		BB	0	0.042				
	Alp-2	AA	21	15.887	14.814	1	0	-0.630
		AB	6	16.225				
		BB	9	3.887				
Lap-1	AA	29	29.296	0.353	1	0.552	0.092	
	AB	7	6.408					
	BB	0	0.296					
Pep-1	AA	7	2.408	15.785	1	0	-0.647	
	AB	5	14.183					
	BB	24	19.408					
Mpi-1	AA	30	30.211	0.245	1	0.621	0.076	
	AB	6	5.577					
	BB	0	0.211					
Pgm-1	AA	34	33.042	22.995	1	0	-0.657	
	AB	1	2.915					
	BB	1	0.042					
JC	Mdh-1	AA	30	29.296	2.003	1	0.157	-0.220
		AB	5	6.408				
		BB	1	0.296				
	Me-1	AA	24	20.155	11.914	1	0.001	-0.562
		AB	6	13.690				
		BB	6	2.155				
	Idh-1	AA	35	34.014	71.014	1	0	-1.000
		AB	0	1.972				
		BB	1	.014				
	Hk-1	AA	23	17.254	20.589	1	0	-0.742
		AB	4	15.493				
		BB	9	3.254				

Tabla VI. continuación

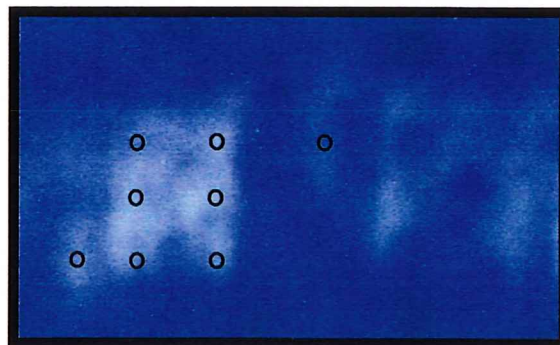
Población	Locus	Clase	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	χ^2	g.l.	P	D
	Est-3	AA	20	16.134	9.751	1	0.002	-0.525
		AB	7	14.731				
		BB	7	3.134				
	Alp-2	AA	23	17.754	19.143	1	0	-0.724
		AB	4	14.493				
		BB	8	2.754				
	Lap-1	AA	31	31.141	0.158	1	0.691	0.060
		AB	5	4.718				
		BB	0	.141				
	Pep-1	AA	12	5.884	18.187	1	0	-0.710
		AB	5	17.232				
		BB	18	11.884				
	Mpi-1	AA	29	29.296	0.353	1	0.552	0.092
		AB	7	6.408				
		BB	0	0.296				
	Pgm-1	AA	23	23.020	0.021	1	0.884	0.021
		AB	2	1.959				
		BB	0	0.020				
OG	Mdh-1	AA	33	33.014	0.015	1	0.903	0.015
		AB	2	1.971				
		BB	0	.014				
	Me-1	AA	26	23.130	10.707	1	0.001	-0.534
		AB	5	10.739				
		BB	4	1.130				
	Hk-1	AA	23	17.754	19.143	1	0	-0.724
		AB	4	14.493				
		BB	8	2.754				
	Est-3	AA	27	26.522	0.562	1	0.453	-0.120
		AB	7	7.957				
		BB	1	0.522				
	Alp-2	AA	18	12.478	15.165	1	0	-0.648
		AB	6	17.043				
		BB	11	5.478				
	Lap-1	AA	29	29.217	0.253	1	0.615	0.078
		AB	6	5.565				
		BB	0	0.217				
	Pep-1	AA	22	16.348	19.847	1	0	-0.739
		AB	4	15.304				
		BB	9	3.348				
	Mpi-1	AA	28	28.304	0.366	1	0.545	0.095
		AB	7	6.391				
		BB	0	0.304				
	Pgm-1	AA	23	23.020	0.021	1	0.884	0.021
		AB	2	1.959				
		BB	0	0.020				



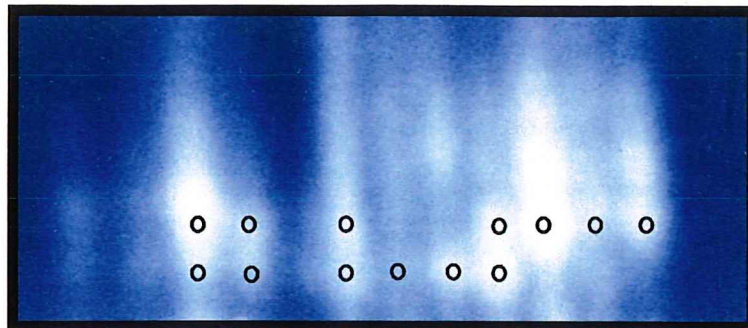
Fotografía 3. Genotipos revelados para Lap (Gel IV).
De izquierda a derecha: AB, AA, AB, AB, AB, AB, AB.



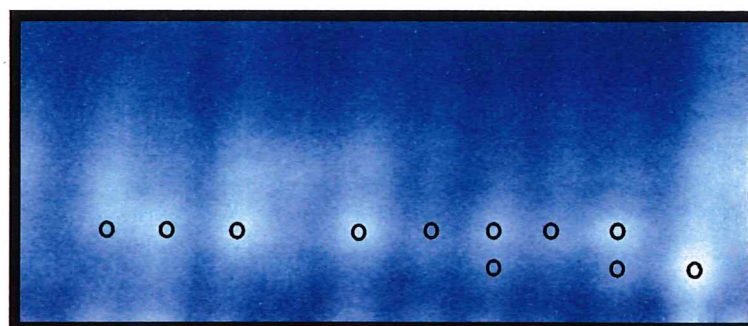
Fotografía 4. Genotipos revelados para Mdh (Gel I).
De izquierda a derecha: AB, AB, AB, AB, AA.



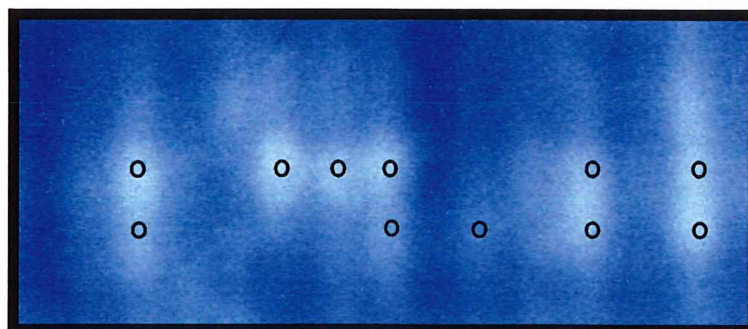
Fotografía 5. Genotipos revelados para Mdh (Gel III).
De izquierda a derecha: BB, AB, AB, AA.



Fotografía 6. Genotipos revelados para Est (Gel I).
De izquierda a derecha: AB, AB, AB, BB, BB, AB, AA, AA, AA, AA.



Fotografía 7. Genotipos revelados para Est (Gel III).
De izquierda a derecha: AA, AA, AA, AA, AA, AB, AA, AB, BB.



Fotografía 8. Genotipos revelados para Est (Gel IV).
De izquierda a derecha: AB, AA, AA, AB, BB, AB, AB.

7. DISCUSIÓN

La interpretación de la variabilidad genética de las diferentes formas biológicas, se basa en el conocimiento de los mecanismos que operan en la evolución. Si se entiende evolución como los cambios en el acervo genético (cambios en las frecuencias génicas de las poblaciones a través del tiempo), se pueden entonces validar los estudios de variabilidad genética mediante la caracterización de las frecuencias génicas y su variación dentro del tiempo y el espacio (Ayala, 1980; Dobzhansky, 1980).

Los resultados encontrados esta investigación, muestran que las poblaciones de ostión japonés *Crassostrea gigas*, cultivadas dentro de Bahía San Quintín, presentan una diversidad genética muy reducida. Diversos autores han encontrado que en general, los moluscos bivalvos tienen una variabilidad genética muy baja comparada con otros invertebrados marinos y en muchas ocasiones se han reportado deficiencias de heterocigotos para especies de los géneros *Chlamys*, *Mytilus*, *Ostrea*, *Saccostrea*, entre otras. (Singh y Green, 1984; Zouros y Foltz, 1984). Para el género *Crassostrea*, también se han reportado deficiencias significativas de heterocigotos en las especies: *C. angulata*, *C. belcheri*, *C. gigas*, *C. iredalei*, *C. rhizophorae*, *C. rivularis*, *C. virginica*. Sin embargo, los valores encontrados en este estudio fueron aún más bajos que cualquier valor reportado para la especie *C. gigas* hasta el momento.

Los niveles de heterocigosis encontrados en este estudio oscilan entre 5.1-5.4 % Según Buroker *et al.* (1975) y Buroker (1979), los valores de variabilidad registrados para esta especie en poblaciones naturales, se encuentran alrededor del 20%.

Según diversos autores, los principales factores que pueden explicar las causas de la deficiencia de heterocigotos, son: (a) la selección natural, (b) la endogamia, (c) el efecto Wahlund, (d) la presencia de alelos nulos y (d) la falta de definición en las técnicas electroforéticas empleadas (Buroker *et al.*, 1975; Ayala, 1980; Singh y Green, 1984; Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989; Rosa-Vélez *et al.*, 1991).

Para esta investigación, la selección natural es un factor que probablemente tuvo alguna influencia sobre los cultivos de ostión cultivado en Bahía San Quintín. Las semillas de los ostiones que se cultivan dentro de Bahía San Quintín, son importadas de la compañía Taylor Shellfish Farms, que se encuentra en el estado de Washington, EE.UU. Estas semillas están adaptadas a las condiciones que existen en ese lugar, como la temperatura del agua, la salinidad, el pH, entre otros. Según Mitton (1997), el factor que más influye sobre la biología de un organismo es la temperatura. No hay registros de algún animal, ya sea homeotermo o poiquilotermo, que no se vea afectado por las temperaturas extremas. Generalmente la intensidad y duración de las temperaturas extremas son críticas, porque les afecta en su desempeño metabólico y por lo tanto, su posibilidad de sobrevivir. Esta generalización no es una excepción para el ostión japonés y quizá este efecto sea todavía más intenso para los ostiones cultivados en Bahía San Quintín. Al introducir las semillas a la bahía, se les debe de

estar sometiendo a un estrés térmico, ya que existe una diferencia de 15 °C en la temperatura de ambos sitios (Tchernia, 1980).

De esta forma, es muy probable que la selección natural este influyendo sobre los cultivos de ostión de Bahía San Quintín. Las frecuencias alélicas y genotípicas son similares para las tres poblaciones, lo cual quiere decir que el medio está ejerciendo una misma presión ambiental sobre ellas. Por lo tanto, su coeficiente de selección y su valor adaptativo deben de ser muy similares.

No obstante, se deben de considerar otros factores ejercidos por el medio que son de igual importancia, como puede ser la latitud. Rosa-Vélez *et al.* (1991), mencionan que al colocar a los cultivos a una latitud diferente a la que están adaptados, se le pueden provocar presiones selectivas por las que no estaban atravesando en su lugar de origen. Las semillas cultivadas en Bahía San Quintín son colocadas a latitudes más bajas (30 °N) en comparación con la región de donde provienen (40-45 °N) y además, son sometidas a distintas presiones ambientales físicas (temperatura, etc.), químicas (pH, salinidad, etc.) y biológicas (parasitismo, etc.). Es conocido que los individuos mejor adaptados son los que sobreviven y se desarrollan hasta alcanzar una talla adulta. En diversos estudios, se ha encontrado que los heterocigotos son individuos que, por poseer una diversidad genética más variable, pueden adaptarse mejor a las fluctuaciones del ambiente (Ayala, 1980; Ayala y Kiger, 1980; Dobzhansky, 1980; Dobzhansky *et al.*, 1980, Jonson, 1980, Valentine, 1980; Mitton, 1997). Para este caso, se esperaría que los individuos analizados que sobrevivieron hasta llegar a un estado adulto fueran en su mayoría heterocigotos, sin

embargo en este estudio se encontró una deficiencia de heterocigotos muy evidente. Debido a lo anterior, es necesario revisar otras teorías que puedan sustentar los resultados encontrados.

Existe una segunda teoría que basa su explicación de la deficiencia de heterocigotos en la endogamia. En los laboratorios comerciales en donde se producen las semillas que se cultivan en Bahía San Quintín, se ha utilizado un número muy reducido de reproductores. Tanto los reproductores como su descendencia, han sido sometidos a una selección artificial de caracteres fenotípicos durante varios años, para obtener tasas de crecimiento más rápidas y biomasa corporales mayores (Francisco Fonseca, com. pers., Lab. Taylor Shellfish Farms, Washington, EE.UU.). Los apareamientos consanguíneos han sido frecuentes durante varias generaciones y esto es posible que haya producido endogamia. De acuerdo con Ayala y Kiger (1980), la endogamia se refleja en un aumento de homocigotos, a expensas de los heterocigotos de la población. Esta explicación ya había sido señalada por Rosa-Vélez *et al.* (1991), quienes mencionaron que al utilizar los mismos organismos como reproductores, es posible que se tengan consecuencias graves dentro de los cultivos a largo plazo, por ejemplo, que la progenie homocigota porte alelos que afecten su fertilidad, sobrevivencia o resistencia a enfermedades (Ayala y Kiger, 1980; Rosa-Vélez *et al.*, 1991). No obstante, los resultados encontrados en el presente estudio contrastan significativamente con el trabajo publicado por Rosa-Vélez y colaboradores en 1991. En ese tiempo, los ostiones eran engendrados ahí mismo, a partir de reproductores originarios de Miyagui Japón, pero importados igualmente de Washington, EE.UU. Las poblaciones mostraron niveles de variabilidad genética promedio semejantes a las

poblaciones naturales, pero a pesar de esto, encontraron deficiencias de heterocigotos en cuatro de los siete loci analizados. Los autores mencionan que estas deficiencias pudieron deberse, entre otras cosas, a los efectos de la endogamia. Al analizar los métodos de cruzamientos, observaron que los ostricultores tenían un periodo de 5-6 años utilizando los mismos organismos reproductores, aunque en un número considerable. Al revisar estas teorías sugeridas por Rosa-Vélez *et al.* (1991), es posible reconsiderarlas y revalidarlas para los resultados del presente estudio. Es posible que la semilla importada de Washington tenga una constitución predominantemente homocigota, debida probablemente a la endogamia y provocada a su vez por los métodos de cruzamiento empleados. Sin embargo, el hecho de que los organismos presenten una eventual condición homocigota, no necesariamente implica que esto sea una desventaja dentro de su ambiente. En los laboratorios comerciales donde realizan los cruzamientos, se trata de mantener a los organismos bajo condiciones controladas y de acondicionarlos lo mejor posible al ambiente que prevalece en ese lugar. Cuando se transfiere a los organismos de lugar, las condiciones ambientales no son iguales y las mismas características que les permitían adaptarse a un lugar en específico, puede que no sean adecuadas o que no les permita desarrollarse de la misma forma dentro de otro sitio o zona geográfica. En este aspecto, Gaffney y Scott (1984) hacen hincapié en la necesidad de incrementar el número de organismos utilizados como reproductores con el objetivo de aumentar el mayor número de combinaciones genéticas que sean favorables. De la estructura de apareamiento de la población dependerá la influencia que tenga un genotipo isozímico o heterocigosidad sobre las tasas de crecimiento, viabilidad, fecundidad, etc., de la población en estudio (Singh y Green, 1984).

El Efecto Wahlund es otra teoría que puede explicar la deficiencia de heterocigotos. Diversos autores señalan que el Efecto Wahlund se presenta cuando existe una mezcla de subpoblaciones dentro de la misma población y el valor promedio de la heterocigosis resultante es menor que la de las subpoblaciones (Ayala, 1980; Buroker *et al.*, 1975; Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989; Rosa-Vélez *et al.*, 1991; Singh y Green, 1984). Las semillas mantenidas y cultivadas dentro de Bahía San Quintín han sido importadas del mismo lugar durante más de 12 años consecutivos. Lo más probable, es que a través de este tiempo la población de Washington haya alcanzado un nivel de estabilidad suficiente como para que no se generen subpoblaciones (no hay introducción de material genético nuevo). Los resultados encontrados en el análisis realizado para las tres poblaciones, no son evidencia suficiente como para sugerir que el efecto Wahlund se esté produciendo.

La segregación de alelos nulos es otra teoría propuesta para explicar la deficiencia de heterocigotos; este fenómeno genético se presenta cuando existen algunas variantes alélicas que en condición homocigota, no presentan la actividad enzimática necesaria para evidenciarlas; solo es posible observarlas en la siguiente generación, cuando dos heterocigotos se cruzan y se hace evidente la homocigosis de los alelos involucrados (Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989). Algunos autores mencionan que ésta condición es letal cuando se presenta en homocigotos (Dobzhansky, 1980; Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989). Por lo tanto, es muy poco probable que los homocigotos se presenten en una frecuencia tan alta, como para poder explicar con ello la deficiencia de heterocigotos encontrada en este estudio para las tres poblaciones.

Con respecto a las teorías anteriores, Rosa-Vélez *et al.* (1991) mencionan que las consecuencias que pueden surgir al presentarse cualquiera de los cuatro fenómenos descritos anteriormente, pueden ser la reducción de la fertilidad, viabilidad y la tasa de crecimiento.

Se puede sumar otro fenómeno de tipo técnico como probable explicación de las deficiencias heterocigóticas: la falta de resolución en el momento de revelado de las enzimas. Esta deficiencia puede deberse a una dilución excesiva de la muestra, separación incompleta o parcial debida al poco tiempo en el campo eléctrico, entre otros. Tampoco se puede descartar que existan errores al momento de interpretar los geles usados para la electroforesis. Esto puede ocasionar que se designe como homocigotos a loci que en realidad son heterocigotos y como consecuencia, la estimación errónea de la variabilidad genética de la población. Sin embargo, esta explicación se descarta para la presente investigación debido a que los zimogramas fueron revisados tres veces con el fin de cerciorarse de la correcta interpretación.

De todas las teorías analizadas anteriormente, se puede inferir que la endogamia es el factor que mas influyó sobre las tres poblaciones de Bahía San Quintín analizadas. Los resultados encontrados muestran que las tres poblaciones tienen una constitución uniforme y que tal constitución está provocada probablemente por los métodos de cruce empleados en el lugar en donde los producen. Cabe puntualizar de nuevo que esto no necesariamente implica una desventaja para los ostiones de Washington que viven bajo ciertas condiciones; pero cuando son

transportados a otro lugar con condiciones diferentes, es de esperarse que esto influya de cierta forma sobre los organismos y no se obtengan los cultivos o cosechas esperadas.

La importancia de encontrar niveles altos de variación genética dentro de las poblaciones es evidente. En muchas ocasiones, se han tratado de relacionar los niveles altos de heterocigosis con tasas de crecimiento mayores y niveles mayores de sobrevivencia de las poblaciones de moluscos bivalvos (Gaffney y Scott, 1984; Zouros *et al.*, 1988; Zouros y Mallet, 1989; Koehn, 1990). Singh y Green (1984), mencionan que la heterocigosis contribuye al crecimiento más rápido de moluscos en general y de ostiones en particular, por lo menos en los estadios subsecuentes a la fijación. Aunque la mayoría de los autores no concuerdan al establecer la importancia de esta correlación, generalmente si coinciden en que un nivel alto de heterocigosis permite que estos organismos tengan una ventaja adaptativa mejor que si fueran homocigotos.

No obstante, el principal problema que se presenta al estimar la variabilidad de una población, es que los tamaños de las muestras de los loci, son generalmente inadecuados para obtener un análisis satisfactorio de este tipo. Según Selander (1980), "la heterogeneidad molecular es demasiado grande y no es uniforme en las poblaciones". Este autor señala que el tipo y proporción de enzimas analizadas, influye grandemente en los resultados obtenidos; algunas proteínas tienen más probabilidad de ser presentar mayor polimorfismo que otras; algunas proteínas siempre, o casi siempre son variables, mientras que otras raramente o casi nunca lo son. El nivel de heterocigosis individual media puede ser significativamente mayor para un determinado

grupo de enzimas que para otro (Selander, 1980). Por esto sería importante comparar a las poblaciones de ostión que son cultivados, con poblaciones naturales, para saber cuales enzimas normalmente se presentan en condición homocigota. No se puede descartar la posibilidad de que tal vez este organismo presente ciertas enzimas específicamente en condición homocigota para ciertos loci, sin que esto quiera decir que represente algún tipo de desventaja; y tampoco se puede dejar de notar que la heterogeneidad de este organismo es demasiado grande como para poder medirla con solo 25 enzimas.

Sin embargo, la importancia atribuible a los estudios de variabilidad genética es muy grande. Estos estudios se han aplicado para conocer la salud genética de las poblaciones y poder emitir un juicio más exacto acerca de su vigor y potencial para ser explotadas. El hecho de que una población presente una disminución en su variabilidad genética en relación a las demás que componen la especie, puede considerarse con una capacidad reducida para responder a los cambios ambientales (Rosa-Vélez *et al.*, 1991). Esta condición puede llevar a las poblaciones a desarrollar problemas que van desde la reducción de variabilidad por endogamia hasta la extinción, en los casos más severos.

8. CONCLUSIONES

- El análisis efectuado a las poblaciones de ostión japonés *Crassostrea gigas*, dentro de la Bahía de San Quintín, muestra que presentan una variabilidad genética muy reducida.
- Los valores de variabilidad encontrados en este estudio son menores a los reportados hasta el momento para *C. gigas*.
- No se encontraron diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas entre las tres poblaciones estudiadas: Acuícola San Quintín, Juan Cota y Ostiones Guerrero.
- La causa más probable de la baja diversidad encontrada es la endogamia, producida por los métodos de cruzamiento aplicados en el lugar donde se produce la semilla.
- La baja variabilidad y, como consecuencia la baja eficacia biológica, puede predisponer a los cultivos a tener poca resistencia ante las fluctuaciones ambientales, específicamente dentro de la Bahía de San Quintín.

9. ANEXOS.

I. Ensayos enzimáticos

1) Malato deshidrogenasa

MDH: E.C.1.1.1.37.

450 mg L-ácido málico
1800 mg Tris
21 mg MTT
30 mg NAD⁺
6 mg PMS
90 mL H₂O destilada

(Rosa-Vélez, 1986)

2) Enzima Mállica

ME: E.C.1.1.1.40.

a) Solución sustrato ME pH 7.0. Disolver el ácido L-málico en H₂O destilada. Agregar lentamente la solución de Na₂CO₃ 2M mientras se agita en un baño de hielo.

2.23 g ácido L-málico
8.16 mL Na₂CO₃ 2 M
8.5 mL H₂O destilada

b) Incubar en:

20 mg NADP⁺
20 mg NBT
10 mg PMS
5 mL solución sustrato ME pH 7.0
1 mL MgCl₂ 10%
20 mL Tris-HCl 0.1 M pH 8.4
75 mL H₂O destilada

(Rosa-Vélez, 1986)

3) Isocitrato deshidrogenasa**IDH: E.C.1.1.1.42.**

18 mg	NADP ⁺
9 mg	MTT
6 mg	PMS
36 mg	ácido isocítrico
9 mg	MgCl ₂ ·6H ₂ O
90 mL	Tris-HCl 0.5 M, pH 8.0

*(Krause et al., 1994)***4) Fosfogluconato deshidrogenasa****G6PDH: E.C.1.1.1.49.**

90 mg	Na-6-fosfogluconato
30 mg	NADP ⁺
21 mg	MTT
6 mg	PMS
30 mg	MgCl ₂ ·6H ₂ O
90 mL	Tris-HCl 0.1 M pH 8.0

*(Abreu-Grobois, 1983)***5) Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa****GPD: E.C.1.2.1.12.**

50 mg	NAD ⁺
30 mg	NBT
2 mg	PMS
10 mL	glicerol-3-fosfato 1 M pH 7.0
5 mL	NaCN 0.1 M
85 mL	Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0

(Krause et al., 1994)

6) Hexoquinasa**HK: E.C.2.7.1.1.**

360 mg	DL-glucosa
108 mg	ATP
18 mg	NADP ⁺
18 mg	MTT
10 mg	PMS
33 mg	MgCl ₂ ·6H ₂ O
63 U	G6PDH
90 mL	Tris-HCl 0.1 M, pH 7.5

(Licona-Chávez, 1999)

7) Carboxilesterasa**EST: E.C.3.1.1.1.**

100 mg	sal azul rápido BB
3 mL	solución sustrato EST
10 mL	Tris-HCl 0.5 M pH 7.1
87 mL	H ₂ O destilada

(Abreu-Grobois, 1983)

8) Carboxilesterasa-D**EST-D: E.C.3.1.1.1.**

- a) Incubar el gel en 20 mL de amortiguador fosfatos 0.1 M pH 6.5 por 15 min a temperatura ambiente.
- b) Decantar el amortiguador fosfatos e incubar a 30 °C en una solución compuesta de 10 mg / 20 mL de 4-Me umbeliferil acetato en amortiguador fosfatos 0.1 M pH 6.5 durante 15 a 30 min.
- c) Ver bajo luz UV, las bandas aparecen fluorescentes en un fondo violeta obscuro.

(Abreu-Grobois, 1983)

9) Fosfatasas alcalinas

ALP: E.C.3.1.3.1.

100 mg	Na- α -naftil fosfato ácido
100 mg	sal azul rápido BB
0.6 mL	MgCl ₂ 10%
100 mL	Tris-HCl 0.1 M pH 8.6

(Abreu-Grobois, 1983)

10) α -Amilasas

AMY: E.C.3.2.1.1.

60 mg	NAD ⁺
30 mg	NBT
2 mg	PMS
25 mL	buffer fosfatos 0.45 M, pH 7.0
5 mL	solución substrato GDH
70 mL	H ₂ O destilada

(Abreu-Grobois, 1983)

11) Leucil aminopeptidasa

LAP: E.C.3.4.11.1.

-
- a) Incubar en ácido bórico 0.5 M por 20 min a temperatura ambiente
 b) Teñir con:

60 mg	sal rápida negra K
45 mg	L-leucil β naphtilamida
30 mg	MgCl ₂
90 mL	Tris-maleato pH 5.3

(Abreu-Grobois, 1983)

12) Citosil dipeptidasas**PEP: E.C.3.4.13.18.**

100 mg leucil leucina
50 mg peroxidasa
25 mg L-aminoácido oxidasa
25 mg O-dionisidina
100 mL Tris-HCl 0.1 M pH 8.0

(Abreu-Grobois, 1983)

13) Manosa-6-fosfato isomerasa**MPI: E.C.5.3.1.8.**

18 mg NADP⁺
9 mg NAD⁺
36 mg ácido pirúvico
45 mg manosa-6-fosfato
9 mg MTT
6 mg PMS
25.33 U PGI
6.33 U G6PDH
90 ml Tris-HCl 0.2 M, pH 7.5

(Licona-Chávez, 1999)

14) Fosfoglucomutasa**PGM: E.C.5.4.2.2.**

150 mg glucosa-1-fosfato
12 mg NADP⁺
21 mg MTT
6 mg PMS
210 mg MgCl₂·6H₂O
60 U G6PDH
90 ml Tris-HCl 0.1 M pH 8.0

(Abreu-Grobois, 1983)

II. Amortiguadores de tinción

Fosfato 0.2 M pH 6.5	9.5 gr	Na ₂ HPO
	0.8 gr	NaH ₂ PO ₄ 20
Tris-Maleato 0.1 M pH 5.3	12.1 gr	Tris
	11.6 gr	Ácido maleico
	24.0 gr	NaOH 1M
	1000 mL	H ₂ O

10. LITERATURA CITADA

- Abreu Grobois, F. A. 1983. Population genetics of *Artemia*. Ph. D. Thesis. University of Wales, Swansea. 438 pp.
- Ahmed, M. 1975. Speciation in living oysters. *Advances in Marine Biology*. 13: 257-397
- Allen, S. K. Jr. 1998. Triploid oysters ensure year-round supply. *Oceanus* 31:58-63
- Ayala, F. J. 1980. Evolución molecular. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. 285 pp.
- Ayala, F. J. y J. A. Kiger. 1980. *Modern Genetics*. The Benjamin/Cummins Publishing Company Inc. USA. 844 pp.
- Bernard, J. L. 1964. Marine Amphipoda of Bahía de San Quintín, Baja California. *R. Pacific Naturalist*. V.5.
- Buroker, N. E.; W. K. Hershberger y K. Chew. 1975. Genetic variation in the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 32: 2471-2477
- Buroker, N. E. 1979. Population genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine Biology*. 54:157-179
- Coan, E. V., P. V. Scott y F. R. Bernard. 2000. Bivalve Seashells of Western North America, Marine Bivalve Mollusks from Arctic Alaska to Baja California. Santa Barbara Museum of Natural History Monographs. 620 pp.
- Correa, S. F.; E. Collins; A. Ocegüera; D. Dominguez y B. Cordero. 2003. Variación alozímica en adultos de *Crassostrea gigas* durante tres años en la Bahía de San Quintín, B.C., México. En prensa. 21 pp.
- Desrosiers, R. R.; A. Gerard; J. M. Peignon; Y. Naciri; L. Dufresne; J. Morasse; C. Ledu; P. Phelipot; P. Guerrier y F. Dubé. 1993. A novel method to produce

- triploids in bivalve mollusks by the use of 6-dimethylaminopurine. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 170: 29-43
- Dobzhansky, T. 1980. Aspectos orgánicos y moleculares de la formación de las especies. En: "Evolución Molecular". Ediciones Omega, S. A. Barcelona. 285 pp.
- Dobzhansky, T.; F. J. Ayala; G. L. Stebbins y J. W. Valentine. 1980. *Evolución*. Ediciones Omega, S. A. Barcelona. 558 pp.
- Eudeline, B.; S. K. Allen y X. Guo. 1999. Optimization of tetraploid induction in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, using first polar body as a natural indicator. *Aquaculture* 187(2000):73-84
- FAO. 2001. Planning and management for sustainable coastal aquaculture development. Reports and Studies. IMO/FAO/Unesco/WMO/WHOIAEA/UN/UNEP. Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution. 68:90 pp.
- Fisher, R. A. 1930. *The Genetical Theory of Natural Selection*, paperback ed. 1958. New York.
- Flores, C.; J. J. Salaya y A. R. González. 1974. Aspectos generales sobre el cultivo de ostras en ambientes naturales. *Lagena*. 33:15-28
- Fujino, K.; N. Nagaya. 1977. Biochemical polymorphism in the pacific oyster I y II. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 43: 983-988; 1554-1560
- Gaffney, P. M. y T. M. Scott. 1984. Genetic heterozygosity and production traits in natural and hatchery populations of bivalves. *Aquaculture*. 42: 289-302

- Gorsline, D. S. y R. A. Stewart. 1962. Benthic Marine Exploration of Bahía de San Quintín, Baja California, 1960-61. *Marine and Quaternary Geology*. *Pacific Nature*. 3(8): 283-319
- Guo, X. y S. K. Allen. 1994. Reproductive Potential and Genetics of Triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *The Biological Bulletin*. 187: 309-318
- Gutiérrez Wing, M. T. 1988. Utilización de productos en la alimentación de las larvas de ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg) en condiciones de laboratorio. Tesis de Maestría. C.I.C.E.S.E. Ensenada, Baja California. 67 pp.
- Harris, H y D. A. Hopkins. 1978. *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North-Holland Publishing Company. Amsterdam-New York- Oxford.
- Ibarra Obando, S. E. 1980. Lagunas costeras de Baja California. *Ciencia y Desarrollo* XVI. 92: 39-49
- Ibarra Obando, S. E. 1985. Introducción al método de marcado para medir la producción en pastos marinos. U.A.B.C. 30 pp.
- Imai, T. Y S. Sakai. 1961. Study of breeding of Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Tohoku Journal of Agricultural Research*. 12: 125-171
- Jonson, G. B. 1980. Polimorfismo genético y función enzimática. En: "Evolución Molecular". Ediciones Omega, S. A. Barcelona. 285 pp.
- Jorgensen, C. B. 1990. Bivalve Filter Feeding: Hydrodynamics, Bioenergetics, Physiology and Ecology. Olsen & Olsen eds. Denmark. 140 pp.
- King, J. L y T. H. Ohta. 1975. Polyallelic mutational equilibria. *Genetics*. 79:681-691
- Kittel, M. 1998. Comparative Analysis of Tasmanian Pacific Oysters, *Crassostrea gigas*, after growout in Washington State. *Journal of Shellfish Research*. 17(1): 329

- Koehn, R. K. 1990. Heterozygosity and growth in marine bivalves: comments on the paper by Zouros, Romero-Dorey and Mallet (1988). *Evolution*. 44(1): 213-216
- Krause, M. K., W. S. Arnold y W. G. Ambrose Jr. 1994. Morphological and genetic variation among three populations of calico scallops, *Argopecten gibbus*. *Journal of Shellfish Research*. 13:529-537
- Lara Lara, J. R. 1975. Ciclo anual de clorofilas y producción orgánica primaria en Bahía de San Quintín, B. C. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ensenada, Baja California. 89 pp.
- Levene, H. 1949. On a matching problem arising in genetics. *Annals of Mathematics and Statistics* 20:91-94
- Licona Chavez, A. L. 1999. Análisis genético de *Haliotis rufescens* en "Abulones Cultivados S.A. de C.V." Tesis de Maestría. C.I.C.E.S.E. Ensenada, Baja California. 120 pp.
- Mitton, J. B. 1997. *Selection in Natural Populations*. Oxford University Press. New York. 240 pp.
- Nei, J. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89:583-590
- Nishikawa, K. A. 1979. Estudio del impacto ambiental de una planta de harina de pescado de Bahía San Quintín, B. C. Parte I. Monografía de Bahía de San Quintín, Baja California. No Publicado.
- Pasteur, N.; G. Pasteur; F. Bonhomme; J. Catalan y J. Britton-Davidian. 1988. *Practical Isozyme Genetics*. Ellis Horwood Limited. 215 pp.
- Phleger, F. B. 1969. Some general features of coastal lagoons. *Mem. Simp. Intern. Lagunas Costeras*. UNAM-UNESCO. Nov. 28-30, 1969. D. F., México. Pp 5-26

- Radilla Camacho, R. 1988. Determinación de la variabilidad genética del ostión japonés *Crassostrea gigas* en proteína muscular en una población cultivada de Bahía de San Quintín, B. C. México. Tesis de licenciatura. Escuela Superior de Ciencias. U. A. B. C. Ensenada, Baja California. 55 pp.
- Raymond, M. y F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 3.1): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 83:289
- Rodríguez, D. 1998. Análisis de la variabilidad alelomórfica de la leucin-aminopeptidasa y de la fosfoglucomutasa en *Artemia franciscana* cultivada en diferentes condiciones experimentales. Tesis de Maestría. Departamento de acuicultura. C.I.C.E.S.E. Ensenada, Baja California. 71 pp.
- Rosa Vélez, J. de la. 1986. Variabilidad genética poblacional en ostiones de la especie *Crassostrea virginica* del Golfo de México. Tesis de Doctorado. U.N.A.M. 124 pp.
- Rosa Vélez, J de la y F. Rodríguez Romero. 1989. Enfoque genético para el análisis de poblaciones de recursos pesqueros: el caso de la población ostrícola de la laguna de Términos, Campeche Cap. 9: 255-284. En: Rosa Vélez J. de la y F. González Farias (eds) *Temas de Oceanografía Biológica en México*. Ensenada Baja California. 337 pp.
- Rosa Vélez, J. de la; M.T. Gutiérrez y R. Radilla. 1991. El ostricultivo de Bahía de San Quintín, B. C., México: Aspectos Genéticos. *Ciencias Marinas*. 17(3):133-145
- Selander, R. K. 1980. Variación genética en las poblaciones naturales. En: "Evolución Molecular". Ediciones Omega, S. A. Barcelona. 285 pp.
- Singh, S. M. y R. H. Green. 1984. Excess of allozyme homozygosity in marine mollusks and its possible biological significance. *Malacología*. 25(2): 569-581

- Sokal, R. R. y J. Rohlf. 1981. Biometry, 2nd ed. W. H. Freeman and Company. San Francisco, California. 859 pp.
- Standish, K. A. y D. Bushek. 1992. Large scale production of triploid oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin), using "stripped" gametes. *Aquaculture*. 103: 241-251
- Stenzel, H. B. 1971. Oysters. In: "Treatise on Invertebrate Paleontology". N. 953-N 1224 pp. Part N, Vol. 3 (of 3), Mollusca 6, (K. C. Moore, ed.) Geological Society of America Inc. and the University of Kansas. Colorado.
- Swofford, D. L. y R. M. Selander. 1989. BIOSYS – 1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in populations genetics and systematics. *Journal of Heredity*. 72: 281-283
- Tchernia, P. 1980. Descriptive regional oceanography. Pergamon Marine Series, New York. 253 pp.
- Torres Fernandez, V. H. 1986. Estudios de factibilidad para la creación de un distrito de acuicultura en el área de Bahía San Quintín, Baja California México. Tesis de Licenciatura. Escuela Superior de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ensenada, Baja California. 102 pp.
- Trujillo Ortiz, A. 2002. Caracterización genética de poblaciones de *Acartia californiensis* (Copepoda: Calanoidea) en la Costa Nororiental del Pacífico. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Marinas. U.A.B.C. Ensenada, Baja California.
- Valentine, J. W. 1980. Estrategias genéticas de la adaptación. En: "Evolución Molecular". Ediciones Omega, S. A. Barcelona. 285 pp.
- Villarreal Chávez, G. 1993. Impacto ambiental de un cultivo del ostión *Crassostrea gigas* en Bahía Falsa, Baja California, México. Tesis de Doctorado. Escuela

Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.
60 pp.

Zouros, E. y A. L. Mallet. 1989. Genetic explanations of the growth/heterozygosity correlation in marine mollusks. En: J. S. Ryland and P. A. Tyler (eds). Reproduction, genetics and distributions of marine organisms. 23rd edition. European Marine Biology Symposium. University of Wales, Swansea. 317-324

Zouros, E. y D. W. Foltz. 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. *Malacología*. 25(2): 583-591

Zouros, E.; M. Romero Dorey y A. L. Mallet. 1988. Heterozygosity and growth in marine bivalves: further data and possible explanations. *Evolution*. 42(6): 1332-1341