

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS**



**“Evaluación genética del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) en lagunas costeras del Estado de Veracruz mediante el uso de marcadores moleculares tipo microsatélites y la región Citocromo Oxidasa I del ADNmt”**

**T E S I S**

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA**

**PRESENTA**

**CLARA ELIZABETH GALINDO SÁNCHEZ**

**Ensenada, Baja California, México  
2 de junio de 2008**

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS  
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

**"Evaluación genética del ostión *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) en lagunas costeras del Estado de Veracruz mediante el uso de marcadores moleculares tipo microsátélites y la región Citocromo Oxidasa I del ADNmt"**

TESIS

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA  
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

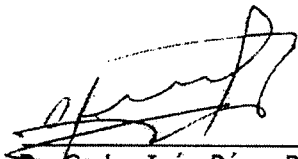
PRESENTA

CLARA ELIZABETH GALINDO SÁNCHEZ

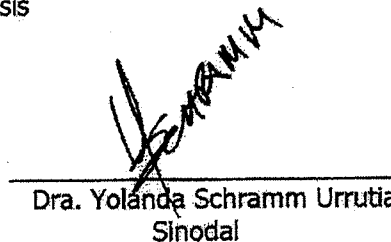
Aprobada por



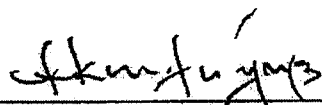
Dr. Pedro Cruz Hernández  
Director de tesis



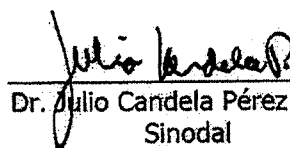
Dr. Carlos Iván Pérez Rostro  
Sinodal



Dra. Yolanda Schramm Urrutia  
Sinodal



Dr. Luis Manuel Enríquez Paredes  
Sinodal



Dr. Julio Candela Pérez  
Sinodal

## RESUMEN

*Crassostrea virginica* habita los principales estuarios y lagunas a lo largo de la costa del Estado de Veracruz (México). Las corrientes costeras en el Golfo de México son estacionales en dirección hacia el sur de septiembre a marzo y al norte de mayo a agosto, lo cual hace que el transporte larval a lo largo de la línea costera de Veracruz sea un elemento importante en la mezcla de las poblaciones. Algunas condiciones relacionadas a características topográficas, parecen reducir la sobrevivencia de las larvas. Adicionalmente, una reducción poblacional por alteración del hábitat podría contribuir a una diferenciación por deriva genética en estas lagunas. En el presente trabajo, se realizó un análisis de la variabilidad y la estructura genética de *C. virginica* en seis lagunas del Estado de Veracruz, utilizando cinco loci de microsatélites y la región del citocromo oxidasa I (COXI) del ADNmt. En el análisis con microsatélites se encontraron desviaciones significantes al equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los loci y fueron atribuidos a la presencia de alelos nulos. No se encontró aislamiento por distancia entre todas las poblaciones en estas lagunas, pero se observó una heterogeneidad significativa entre lagunas adyacentes, posiblemente debido a factores geográficos y reducciones locales en los tamaños poblacionales. Ciertas poblaciones distantes del norte y sur mostraron valores de  $F_{ST}$  pareados no significantes. Además se determinaron las lagunas con la menor y mayor variabilidad genética, haciéndose recomendaciones para su manejo. Por otro lado análisis de estructura genética poblacional con COXI demuestra que existe una

población panmíctica en la región centro-sur del Golfo de México, como lo demuestran los valores de los índices de fijación ( $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$ ) que no fueron significantes en ninguna de las comparaciones pareadas entre lagunas. El flujo genético fue atribuido a cambios estacionales en las corrientes costeras, la producción de larvas durante todo el año, a la interferencia humana con los procesos naturales en las lagunas y a los esfuerzos de restauración. Por otro lado, el complejo y poco claro patrón geográfico observado con microsatélites puede ser otro ejemplo del parcheo caótico genético observado en organismos marinos.

Keywords: Diversidad genética, microsatélites, citocromo oxidasa subunidad I (COX I), *Crassostrea virginica*, alelos nulos, flujo genético, parcheo caótico genético.

## ABSTRACT

Along the shoreline of the State of Veracruz, *Crassostrea virginica* inhabits the main estuaries and lagoons. Coastal currents in the Gulf of Mexico are seasonal, flow southward (counterclockwise) from September to March and northward (clockwise) from May to August. This movement makes larval transport along the Veracruz coastline an important element in mixing populations. Some conditions related to local topographic features appear to reduce survival of larva. Additionally, population reduction, caused by alterations of the habitat, appears to contribute to differentiation by genetic drift in these lagoons. In this study, genetic variation was evaluated in populations of the eastern oyster *C. virginica* (Gmelin) along the coast of Veracruz. We sampled six lagoons and analyzed variations at five microsatellite loci and the region of the cytochrome oxidase subunit I (COX I). Significant Hardy-Weinberg deviations occurred at all of the microsatellite loci and were attributed to the presence of null alleles. We found no isolation by distance among the populations in these lagoons, but significant heterogeneity was observed among some adjacent lagoons of the microsatellite loci, possibly reflecting geographical factors and local reductions in population size. Certain extreme north and south localities were not genetically different in terms of non-significant pairwise  $F_{ST}$  values. Moreover, the lagoons with the highest and lowest genetic variability were determined to prepare recommendations for management. We observed a panmictic population with COX I analysis at the south-center region of the

Gulf of Mexico, as shown in fixation index values ( $F_{ST}$  and  $\Phi_{ST}$ ), were not significant at pairwise values among lagoons. Genetic flow is attributed to seasonal shifts in coastal currents, larval production throughout the year, human interference with the natural lagoon processes, and restocking efforts. The unclear pattern could be an example of chaotic genetic patchiness in marine organisms.

Keywords: Genetic diversity, Microsatellites, cytochrome oxidase subunit I (COX I), *Crassostrea virginica*, Null Alleles, genetic flow, chaotic genetic patchiness.

**DEDICATORIA**

*In memoriam* a Jorge de la Rosa Vélez,  
gracias por tu legado.

A mis padres Isabel y Evaristo, por todo el apoyo, ejemplo de  
perseverancia y amor que me han dado.

A mi hermano Alex, por todo el cariño y apoyo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Pedro Cruz por todo el esfuerzo invertido en la dirección de este trabajo, por su dedicación, por enseñarme a entender las bases de la genética (con figuritas y bolitas), por haber confiado en mí sin conocerme. Agradezco también que me haya mostrado como tratar de equilibrar el trabajo académico con la diversión, por hacer más ameno el trabajo y por la complicidad de la comida en los momentos de estrés (y de no estrés también).

Agradezco especialmente al Dr. Jorge de la Rosa Vélez, por todo su apoyo para que pudiera continuar y terminar mi formación académica, por su participación en este trabajo, y también por su mano firme, sus jalones de oreja cuando fue necesario, pero también ese carácter afable que siempre lo caracterizó, sus bromas en doble sentido, y los ratos amenos que compartió siempre con una sonrisa. Gracias Jorge por el legado académico y de amistad que dejaste, siempre estarás presente en nuestro corazón y mente.

Un agradecimiento especial también al Dr. Patrick Gaffney, por sus contribuciones a este trabajo, una parte importante de los análisis y discusiones de la tesis fue realizado bajo su asesoría.

Al Dr. Carlos Iván Pérez Rostro, codirector de esta tesis, gracias por haber confiado en mí para este trabajo, por sus comentarios y por el apoyo logístico en la recolecta de las muestras.

Al Dr. Julio Candela, por su asesoría en la parte de oceanografía física, gracias por sus valiosos comentarios a este trabajo.

Agradezco a la Dra. Yolanda Schramm por haber tomado la batuta y ser mi tutora, por todo el esfuerzo invertido en la parte logística, moral, académica...Yoli, sabes que te debo la vida (literalmente).

Al Dr. Luis Enríquez, por todo su apoyo incondicional, tanto académico como de amistad gracias por estar siempre ahí cuando lo necesito.

A la UABC, por el apoyo académico, logístico y económico que invirtió en mi formación. A la Dra. Irma Soria, por todo su apoyo (gracias), a Angélica Arce por el apoyo logístico siempre amable, y al Dr. Eduardo Santamaría.

Al CONACYT por la beca recibida.

Este proyecto fue realizado en parte gracias al proyecto SEP-COSNET 808.03.04-P.

Al CIBNOR, y en especial al laboratorio de Genética Acuícola, este trabajo fue realizado en sus instalaciones.

Agradezco a mis padres Isabel y Evaristo por el esfuerzo, por ser el pilar en mi vida, por la beca Galindo-Sánchez, y por todo su amor. A mi hermano Alex, compañero, amigo y cómplice en todo momento.

Al clan Galindo y al clan Sánchez, por la unión familiar, y por las interminables horas de bullicio y baile veracruzano que me han brindado.

A mis amigos del lab de Genética Acuícola: Ana María Ibarra (por las horas amenas de conversación, el vino, y sus consejos académicos), Susana Ávila, gracias por el apoyo técnico (y sus Susanitas Isa y Victoria), Rosy (y su disposición siempre a ayudar), Jose Luis (Jóse), Karina y Pancho, gracias a todos ellos por el apoyo dentro y fuera del laboratorio, gracias por su amistad y por ser una familia disfuncional. Al resto del equipo: Fide, Noé, Gaby, Chula, Tavo (amiguís), Beto, Roberto y Gabriel, gracias por aguantarme!

Al resto de mis amigos en el CIBNOR: Carmen Blázquez, por su cariño y apoyo en mis ratos de estrés y deporte, a la Normichis por ser tal cual és, Vero, Hever, Adrián y Lili, y a la patobanda por compartir los pasteles.

A mis amigos Dení (gracias por compartir los momentos alegres y los no tan buenos), Agnes, Felipe y Lau, gracias a ellos por los momentos de desestrés y baile.

A mis amigos de escalada: Migue, Paty, Poncho y Luis Carlos, gracias por compartir la pasión por escalar y el hicking! Y como nos metimos en esto?

A mi amiga Paty de nuevo, por todo su apoyo, amistad, complicidad y por compartir a su mami Claudia, por ser mi familia en La Paz.

A los Dres. Fco García de León, Ticul y Ricardo Pérez, por las discusiones amenas y enriquecedoras en los seminarios que aportaron conocimientos a mi formación académica.

A mis amigos en Ensenada: Gisela Heckel, gracias por tu apoyo, moral, sicológico y tu amistad, eres un pilar importante en la realización de mis metas. Samanta, Concha, Iris, Alejandra Prieto y Lige, gracias por su amistad y por ser tan lindas!. A mi amigo Dahren, Nancy y Raquel...por seguir en contacto.

Y a mí!!!

<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>7</b>
<b>PESQUERÍA DEL OSTIÓN AMERICANO EN MÉXICO</b> .....	<b>7</b>
<b>BIOLOGÍA DE CRASSOSTREA VIRGINICA</b> .....	<b>9</b>
<i>DISTRIBUCIÓN</i> .....	9
<i>REPRODUCCIÓN</i> .....	10
<b>VARIABILIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA EN CRASSOSTREA VIRGINICA</b> .....	<b>12</b>
<b>CARACTERÍSTICAS OCEANOGRÁFICAS DE LA ZONA DE ESTUDIO</b> .....	<b>15</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>20</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>24</b>
<b>PARTICULAR</b> .....	<b>24</b>
<b>CAPITULO I: ANÁLISIS CON MARCADORES MICROSATÉLITES</b> .....	<b>25</b>
<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>26</b>
MICROSATÉLITES.....	26
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>29</b>
OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	29
EXTRACCIÓN DE ADN.....	30
ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES (ADN NUCLEAR).....	30
• <i>Amplificaciones de los microsatélites</i> .....	30
• <i>Electroforesis y visualización con quimioluminiscencia</i> .....	31
• <i>Análisis estadístico de los microsatélites</i> .....	31
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
OPTIMIZACIÓN Y ELECCIÓN DE LOS LOCI DE MICROSATÉLITES.....	34
VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL.....	35
<i>Análisis por locus</i> .....	36
<i>Análisis por población</i> .....	41
<i>Déficit de heterocigotos y alelos nulos</i> .....	43
VARIABILIDAD GENÉTICA INTERPOBLACIONAL.....	45
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>50</b>
VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL.....	50
<i>Déficit de heterocigotos</i> .....	55
DIFERENCIACIÓN INTERPOBLACIONAL.....	59
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>66</b>

**CAPITULO 2: ANÁLISIS GENÉTICO UTILIZANDO SECUENCIAS DE LA  
REGIÓN CITOCROMO OXIDASA I DEL ADN MITOCONDRIAL ..... 68**

**INTRODUCCIÓN ..... 69**  
 ADN MITOCONDRIAL..... 69  
 SECUENCIACIÓN ..... 70  
**MÉTODOS..... 74**  
 AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO CITOCROMO OXIDASA I (COXI) ..... 74  
 ANÁLISIS DE DATOS ..... 76  
*Edición y alineación de secuencias..... 76*  
*Análisis de la diversidad genética..... 77*  
*Estructura poblacional..... 78*  
*Análisis filogenético..... 79*  
**RESULTADOS ..... 81**  
 ALINEACIÓN Y VARIACIÓN DE SECUENCIAS..... 81  
 DIVERSIDAD GENÉTICA Y NEUTRALIDAD..... 86  
 ESTRUCTURA POBLACIONAL..... 89  
 ANÁLISIS FILOGENÉTICO ..... 94  
 FILOGEOGRAFÍA ..... 96  
**DISCUSION ..... 99**  
 DIVERSIDAD GENÉTICA Y NEUTRALIDAD..... 99  
 ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL Y ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO ..... 102  
**CONCLUSIONES..... 107**  
**DISCUSIÓN GENERAL ..... 109**

**LITERATURA CITADA..... 115**

## Lista de Tablas

Tabla 1. Características de los siete loci probados en este estudio.....	31
Tabla 2. Variabilidad genética en cinco loci de microsatélites en seis lagunas en el Estado de Veracruz.....	32
Tabla 3. Comparación de desequilibrio de ligamiento por pares de locus en <i>Crassostrea virginica</i> .....	35
Tabla 4. Riqueza alélica con corrección de tamaño de muestra.....	36
Tabla 5. $F_{IS}$ estimadas para seis lagunas en los cinco loci y excluyendo a los loci Cvi6 y Cvi13.....	38
Tabla 6. Valores de $F_{IS}$ y $F_{ST}$ de seis lagunas costeras en <i>Crassostrea virginica</i> .....	39
Tabla 7. Valores de $F_{ST}$ pareados entre seis lagunas costeras de <i>Crassostrea virginica</i> en México.....	40
Tabla 8. AMOVA jerárquico basado en loci de microsatélites de <i>C. virginica</i> en seis lagunas costeras de México.....	42
Tabla 9. Haplotipos compartidos ( $h$ ) y sus frecuencias relativas por localidad.....	68
Tabla 10. Índices de diversidad genética y su desviación estándar ( $\pm S2$ ).....	71
Tabla 11. Distancias genéticas pareadas entre las lagunas.....	72
Tabla 12. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación de Wright ( $F_{ST}$ ) para todas las lagunas analizadas en este estudio.....	73
Tabla 13. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación $\Phi$ estadístico ( $\Phi_{ST}$ ) para todas las lagunas analizadas en este estudio.....	73
Tabla 14. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación de Wright ( $F_{ST}$ ) entre grupos formados de acuerdo a las zonas geográficas.....	74

- Tabla 15. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación  $\Phi$  estadístico ( $\Phi_{ST}$ ) entre dos grupos formados según zonas geográficas .....74
- Tabla 16. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación de Wright ( $F_{ST}$ ) entre grupos formados según análisis con alozimas.....75
- Tabla 17. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación  $\Phi$  estadístico ( $\Phi_{ST}$ ) entre dos grupos formados según análisis con alozimas (De la Rosa-Vélez, 1986).....75
- Tabla 18. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación de Wright ( $F_{ST}$ ) entre dos grupos formados según análisis genéticos con microsatélites.....76
- Tabla 19. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación  $\Phi$  estadístico ( $\Phi_{ST}$ ) entre dos grupos formados según análisis genéticos con microsatélites.....76

## Lista de Figuras

Figura 1. Localización del Golfo de México y sitios de interés.....	17
Figura 2. Modelo de la media de salinidad superficial de a) mayo-agosto, b) Octubre-Febrero.....	18
Figura 3. Sitios de recolecta de las muestras de <i>Crassostrea virginica</i> en el Estado de Veracruz.....	28
Figura 4. Gráficas de heterocigocidades observadas (líneas) y esperadas (barras) en las cinco lagunas costeras.....	36
Figura 6. Estructura del gen mitocondrial en <i>C. virginica</i> y <i>C. gigas</i> .....	63
Figura 7. <i>Primers forward</i> y <i>reverse</i> utilizados para la amplificación del fragmento COXI en <i>Crassostrea virginica</i> .....	64
Figura 8. Ejemplo del fragmento de región COXI del ADN mitocondrial amplificado en <i>C. virginica</i> .....	70
Figura 9. Alineamiento de posiciones variables encontradas en los 65 haplotipos de las secuencias de COI en <i>Crassostrea virginica</i> .....	71
Figura 10. Relación genética entre 56 haplotipos de <i>Crassostrea virginica</i> ...80	
Figura 11. Red de la mínima separación de los 65 haplotipos de ADNmt de la muestra de <i>C. virginica</i> .....	82

## INTRODUCCION

---

El ostión americano *Crassostrea virginica* es uno de los principales recursos pesqueros con los que cuenta México<sup>1</sup>, en el ámbito mundial ocupa el segundo lugar en la producción de este recurso mientras que Estados Unidos es el principal productor<sup>2</sup>. Sin embargo, en la década de los ochenta en este último país la producción de *C. virginica* comenzó a registrar un decremento importante<sup>2</sup>, lo que ha sido ligado con la sobreexplotación del recurso, la alteración del hábitat y las enfermedades causadas por los parásitos introducidos (Brown y Paynter, 1991).

En México, el Estado de Veracruz con sus 116 600 ha de superficies estuarinas (Contreras y Castañeda, 1993) se ha colocado como el principal productor del ostión americano<sup>1</sup>. No obstante, dentro de los sistemas lagunares con los que cuenta el Estado, los efectos antropogénicos han comenzado a afectar a las poblaciones de dicho recurso. Tan sólo en la laguna de Tamiahua, el cual es el sistema lagunar más grande en Veracruz, en 1989 se reportó la muerte masiva del 80% de la población ostrícola, y para 1990 se registró el desplazamiento del hábitat hasta en un 45% por *Ostrea equestris*<sup>3</sup>. Actualmente los estudios sobre la biología y ecología del

---

<sup>1</sup> SAGARPA, 2004. Anuario estadístico de pesca. México, D.F. : Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

<sup>2</sup> Dependencia de Información, Datos y Estadísticas de Pesca (FIDI). 2002.  
<http://www.fao.org/fi/struct/fidis.asp#FDESC>

<sup>3</sup> SAGARPA-INP.2006. Carta Nacional Pesquera.

ostión, que son necesarios para la recuperación de este recurso, se encuentran como áreas prioritarias para el país.

Algunas de las acciones internacionales encaminadas a contrarrestar el decremento en la producción ostrícola, y que podrían ser aplicadas localmente en Veracruz, han sido el desarrollo de técnicas de cultivo (ostricultura)<sup>4</sup> y la restauración de los bancos naturales (Brown *et al.*, 2000). Sin embargo el desconocimiento de alguno de los componentes biológicos en *C. virginica* que habita en los estuarios de Veracruz, puede provocar un manejo inadecuado del recurso. Uno de los errores que ha presentado un mayor impacto negativo en estas actividades es el de ignorar el componente genético, ya que la variabilidad genética de la población es importante porque permite responder a los factores selectivos del medio.

Algunos de los factores negativos que pueden ser causados debido al desconocimiento de la variabilidad genética de las poblaciones son: la introducción de organismos genéticamente diferentes que pueden ocasionar el desplazamiento y la sustitución de la población residente (y la consecuente eliminación de acervo genético local); endogamia en la población, al elegir organismos estrechamente relacionados en el ámbito genético (hermanos, padres e hijos) (Beaumont y Hoare, 2003) y la consecuente reducción de la variabilidad genética, que puede ocasionar la disminución de la calidad de los

---

<sup>4</sup> FAO. 1999. Anuario estadístico de pesca. FAO. Rome: Pesca. 48(b-53).

organismos como puede ser el crecimiento, la sobrevivencia, y la reproducción (Adamkewicz, 1984) e incluso la pérdida del recurso. Además, la pérdida de la variabilidad genética o modificación de la composición genética de una población adaptada a un determinado ambiente puede traer consigo una reducción en la capacidad de respuesta ante cambios climáticos eventuales.

Actualmente existen diferentes métodos y marcadores moleculares para realizar estudios de diversidad genética en el medio natural, sin embargo particularmente para *C. virginica* la mayoría han sido realizados con alozimas. A pesar de que estas proteínas siguen siendo de gran utilidad para analizar la variabilidad genética en moluscos bivalvos; se ha observado en algunos casos, que ésta puede ser subestimada debido a su bajo polimorfismo (Launey *et al.*, 2002), además de que algunos loci son influenciados por la selección natural, dando como resultado diferencias en las frecuencias de sus alelos debido directamente a componentes ambientales, tales como la salinidad (Buroker 1983a).

Los marcadores moleculares neutrales que permiten un análisis directo a las variaciones del ADN nos proporcionan en algunos casos, una mejor medida de la variabilidad genética para analizar la estructura en las poblaciones. A diferencia de los marcadores que se ven afectados por la selección, con los marcadores neutrales es posible analizar los efectos

directos de la deriva genética y revelar cuellos de botella en las poblaciones estudiadas. Aunado a esto, los adelantos tecnológicos han promovido el desarrollo de técnicas simplificadas para su análisis.

Los marcadores que han sido utilizados frecuentemente con éxito desde hace casi diez años para el análisis de las poblaciones naturales, son el ADNmt y los microsatélites (Zhang y Hewitt, 2003). En algunas especies de ostiones se han utilizado con éxito dichos marcadores; y han servido para evaluar la variabilidad y la estructura genética con microsatélites en *Ostrea edulis* (Launey *et al.*, 2002), y para conocer la filogeografía en *C. virginica* y *Crassostrea angulata* con la utilización de ADNmt (Reeb y Avise, 1990; Huvet *et al.*, 2000).

A pesar de que varios autores han realizado estudios encaminados a evaluar la variabilidad y estructura genética del ostión americano en el Golfo de México, la mayor parte de estos trabajos se han enfocado principalmente a la región noroeste del Golfo, en Estados Unidos, (Buroker, 1983a; Hedgecock y Okasaki, 1984).

Sólo un autor ha aportado datos alozímicos sobre la variabilidad y estructura genética de *C. virginica* en la parte central y sur del Golfo de México (México) (De la Rosa-Vélez, 1986), y en lo que respecta al Estado de Veracruz, se desconoce si las observaciones realizadas por el autor sobre la

variabilidad genética de *C. virginica* fueron tomadas en cuenta por las autoridades correspondientes, además de que ningún otro trabajo genético ha sido reportado a la fecha. Por otro lado, las lagunas con mayor producción de ostión en Veracruz han cambiado, de esta manera en los ochentas la laguna con mayor aporte era Tamiahua, mientras que en la actualidad es la laguna de Pueblo Viejo<sup>2</sup>.

Es imperativa la utilización de marcadores moleculares neutrales como microsatélites, para poder entender las relaciones entre los bancos ostrícolas de la región centro-sur del Golfo de México. Un análisis con estos marcadores nos permitirá establecer si existe flujo genético debido a la capacidad de dispersión larval, o si por el contrario, existe algún tipo de restricción entre ellos. Por otro lado, un análisis con un fragmento de ADNmt puede darnos un panorama más completo de la filogeografía de *C. virginica* dentro del Golfo de México.

Dado lo anterior, preguntas importantes sobre la variabilidad genética actual en las principales lagunas productoras de dicho recurso, la dirección del flujo genético (entre regiones cercanas), los eventos de deriva genética ocasionada probablemente por las reducciones poblacionales y la estructura genética geográfica, pueden ser mostrados sin sesgo por el análisis con marcadores moleculares neutrales los cuáles no son afectados por la selección natural. Con lo anterior se pretende obtener un panorama más

fino a nivel micro geográfico de la estructura poblacional, y finalmente realizar recomendaciones acordes con las condiciones actuales del recurso, particularmente para el Estado de Veracruz.

Siguiendo los planteamientos anteriores, es necesario ampliar el conocimiento sobre la variabilidad y la estructura genética actual en la población natural, para implementar programas que garanticen una mejora en la producción, y el aprovechamiento racional del ostión americano en Veracruz. Para esto, en el presente estudio se realizó la evaluación genética del ostión *C. virginica* proveniente de seis lagunas costeras: Pueblo Viejo, Tamiahua, Laguna Grande (Vega de Alatorre), La Mancha, Laguna de Alvarado y Laguna El Ostión.

Estas lagunas son representativas de las tres zonas principales de producción ostrícola del Estado de Veracruz (Norte, Centro y Sur), y fueron evaluadas mediante la utilización de dos marcadores moleculares neutrales de ADN: marcadores nucleares (**microsatélites**) y secuenciación del fragmento COXI del ADN mitocondrial (**ADNmt**).

## ANTECEDENTES

---

### *Pesquería del ostión americano en México*

Veracruz tiene un lugar privilegiado gracias a su gran superficie en lagunas costeras (Contreras y Castañeda, 1985). En México el litoral del Golfo de México es el principal productor de ostión del país ya que aporta el 93% nacional, siendo Veracruz el Estado más importante seguido de Tabasco, Tamaulipas y Campeche<sup>1</sup>.

En lo que respecta a la producción ostrícola de acuerdo a la SAGARPA, el Estado de Veracruz se encuentra dividido en tres Zonas: 1) Zona Norte, que comprende las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua, Tampamachoco y la Costa; 2) Zona Centro, que comprende la laguna Grande y laguna Chica, 3) Zona Sur, laguna La Mancha, laguna Mandinga, laguna Camaronera, laguna de Alvarado, laguna de Sontecomapan y la laguna del Ostión. En general, el Estado actual de la producción en Veracruz se considera estable, sin embargo en años anteriores se observó una sobreexplotación del recurso en lagunas como Tamiahua, Sontecomapan y El Ostión. Debido a lo anterior, las lagunas de Sontecomapan y El Ostión, se encuentran en veda permanente y no se otorgan permisos de extracción, pero se tiene conocimiento de que se sigue realizando la pesca furtiva dentro de esas lagunas<sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup> Horacio Cruz Lugo. Dirección de Acuacultura. SAGARPA, Delegación Veracruz. Comunicación personal.

En la década de los ochentas, la laguna de Tamiahua aportaba la mayor producción de este recurso, sin embargo, en 1989 el parásito *Stylochus ellipticus* invadió completamente a la laguna, provocando la muerte del 80% del ostión y en 1990 *Ostrea equestris* reemplazó en un 45% a la población de *C. virginica*<sup>3</sup>. Desde la década de los noventas la cooperativa de Cabo Norte, situada en la barra de Tampachichi al norte de esta laguna, no ha reportado producción ostrícola. Lo anterior, aunado al cambio de vocación pesquera debido a la falta de mercado del recurso, ha llevado a una disminución en la producción dentro de la laguna de Tamiahua<sup>6</sup>. Se han realizado intentos por repoblar esta laguna, trasladando la semilla de la laguna de Pueblo Viejo, sin embargo, no se tiene registro si se tuvo éxito o no con estas acciones. Actualmente, es precisamente la laguna de Pueblo Viejo, al norte del Estado la que aporta la mayor producción de *C. virginica*<sup>8</sup>.

En la década de los ochentas, la producción de ostión en México fue de 428 511 toneladas, mientras que en los noventas la producción fue de 372 907, lo cuál significó un decremento de 13 %. Durante la década de los noventas, 1993 fue el año donde se registró una menor producción, y coincide con la presencia del ciclón Gert en ese mismo año<sup>3</sup>. A finales de los noventa se presenta una recuperación en la producción ostrícola, la cuál coincide con la presencia de una depresión tropical (1999) y que se asocia

benéficamente ya que permite el desasolvamiento de algunas lagunas. Dichos fenómenos afectaron principalmente la parte norte del Estado de Veracruz.

Actualmente, el Estado de Veracruz aporta el 46% de la producción total de ostión en el ámbito nacional y la mitad de la producción total de la costa del Golfo de México<sup>1</sup>.

### **Biología de *Crassostrea virginica***

#### ***Distribución***

El ostión americano *Crassostrea virginica*, es un molusco bivalvo que habita en cuerpos de agua protegidos, con preferencia hacia las aguas turbias y salobres de canales y esteros. Presenta una amplia distribución en aguas templadas, subtropicales y tropicales en la costa Atlántica del continente americano de alrededor de 8,000 Km de largo, que va desde el norte de Brasil, a través del mar Caribe y el Golfo de México, incluyendo a las Antillas, hasta el Golfo de St. Lawrence al este de Canadá (Carriker y Gaffney, 1996).

De todos los aspectos abióticos, la salinidad y la temperatura presentan mayores efectos en la biología de *C. virginica*, por lo que la distribución de estos organismos se encuentra relacionada con estos dos

factores (Shumway, 1996). A pesar de que son organismos eurihalinos que pueden tolerar rangos amplios de salinidad: 5 a 40 Unidades Prácticas de salinidad (PSU, por sus siglas en inglés) (Galtsoff, 1964), el rango óptimo fisiológico para estos ostiones es reportado entre 14 a 28 PSU por varios autores (Chanley, 1958; Galstsoff, 1964). Cuando están expuestos por mucho tiempo a salinidades altas (con excepciones), usualmente no se reproducen, el crecimiento se vuelve lento, presentan mayor incidencia de enfermedades y una mortalidad elevada (Shumway, 1996).

Al igual que con la salinidad, esta especie presenta una gran tolerancia a rangos amplios de temperatura, y se encuentra comúnmente en aguas donde la temperatura anual tiene un rango de  $-2^{\circ}\text{C}$  a  $36^{\circ}\text{C}$  (Galtsoff, 1964). Sin embargo, estos organismos pueden morir al ser expuestos por periodos cortos a temperaturas altas, o por periodos más grandes a temperaturas bajas. Pero es la combinación de estos dos factores abióticos, la que influencia sobre la tasa de mortalidad para *C. virginica* (Shumway, 1996).

### ***Reproducción***

El ostión Americano presenta sexos separados, aunque en ocasiones se encuentran organismos hermafroditas, los cuales son poco comunes para esta especie (0.5% de la población) (Kennedy, 1983). Posee la particularidad de cambiar de sexo (macho a hembra y viceversa); cuando los individuos

maduran por primera vez generalmente funcionan como machos, sin embargo, un año después los organismos con mayor tamaño son en su mayoría hembras, mientras que los de menor tamaño son machos (Thompson *et al.*, 1996).

Existen diversas teorías que tratan de explicar esta característica, pero ninguna parece ser completamente convincente. Algunos autores han sugerido que parece estar relacionada con el tamaño de los individuos, la disponibilidad de alimento y con la cercanía del sexo contrario (Kennedy, 1983). Por lo que esta característica (cambio de sexo), hace que la proporción sexual en las poblaciones del ostión sea variable (Kennedy, 1983).

*C. virginica* presenta un ciclo reproductivo anual que culmina con el desove y la fertilización externa en la columna de agua. Los ostiones adultos responden a cambios ambientales a nivel macrogeográfico que estimulan la gametogénesis y el desove cuando las condiciones son óptimas para la sobrevivencia de las larvas, por lo que las temporadas reproductivas varían con la región geográfica donde se distribuyen estos organismos (Thompson *et al.*, 1996). En las poblaciones del sur de México, los desoves masivos se presentan dos veces al año, uno en primavera (marzo a mayo) y otro más en el otoño (septiembre a diciembre) (Rogers y García-Cubas, 1981).

Poco después de que se presenta la fertilización externa en estos organismos, comienza su desarrollo una larva planctónica (veliger), este estado tiene una duración de dos a tres semanas, durante el cual la larva puede ser distribuida por los movimientos del agua (tanto en la columna de agua, como con las corrientes superficiales). La larva veliger pasa a otro estado post-veliger, para terminar buscando un substrato y adherirse a éste, y finalmente establecerse como un adulto sedentario (Kennedy, 1996).

### **Variabilidad y estructura genética en *Crassostrea virginica***

El ostión americano presenta diferencias fenotípicas, que han llevado a algunos autores a sugerir la existencia de razas fisiológicas basadas principalmente en el crecimiento, la reproducción, morfología, resistencia a enfermedades y otros factores (Loosanoff y Nomejko, 1951). Sin embargo, las diferencias entre estas poblaciones parecen ser de origen ambiental con un componente menor atribuible a diferencias genéticas, o adaptaciones fenotípicas irreversibles (Tendengren *et al.*, 1990).

Los estudios genéticos en *C. virginica* han proporcionado datos que pretenden aclarar la estructura poblacional. Análisis con alozimas, revelaron que existe una alta similitud genética para *C. virginica* en la costa Atlántica de Norte América y la parte Norte del Golfo de México (Buroker *et al.*, 1983a; Hedgecock y Okasaki, 1984); algunos autores la atribuyen a la vida larval

planctónica y a su consecuente dispersión debido a las corrientes costeras (Buroker, 1983a).

Sin embargo, Buroker (1983a) a pesar de observar poca diferenciación a nivel alozímico, describió clinas macrogeográficas en las frecuencias de dos loci, en las poblaciones de ostiones de la costa Atlántica de Norte América y la parte Norte del Golfo de México. Gaffney (1996) realizó un análisis con varios datos alozímicos reportados en diferentes estudios (Buroker *et al.*, 1983a; Hedgecock y Okasaki, 1984) y encontró una diferencia relevante en términos de las frecuencias alélicas para las poblaciones ubicadas en los extremos geográficos de dichos estudios (Canadá al norte; Laguna Madre, en Texas y Bahía de Campeche al sur).

De la Rosa-Vélez (1986) realizó un estudio con alozimas en ocho lagunas costeras del Golfo de México. En su trabajo, hizo un análisis de la similitud genética entre estas lagunas y propuso la existencia de una estructura genética entre las poblaciones que habitan en ellas. De esta manera propuso cuatro zonas: La primera zona corresponde a las lagunas más sureñas del Golfo de México (Términos, Mecocacán y Sistema Lagunar Carmen y Machona); la segunda zona incluye a la laguna de Sontecomapan y la Mancha, al sur del Estado de Veracruz; la tercera zona a la laguna de Tamiahua y la de Pueblo viejo, al norte del Estado de Veracruz; la cuarta y última zona corresponde a La Laguna Madre, situada al norte de Tampico (al

norte del Golfo de México). Además, encontró una reducción del flujo genético entre las poblaciones de latitudes inferiores a los 20° N (primera y segunda zona propuestas), con respecto a las poblaciones de latitudes superiores (tercera y cuarta zona), lo cual lo correlacionó con la presencia de una barrera oceanográfica.

Así mismo, encontró que las lagunas con mayor similitud genética son La Mancha y Sontecomapan, situadas al sur de Veracruz y sugirió la existencia de una correlación entre los patrones de corrientes costeros del Golfo de México, con el periodo reproductivo (de marzo a mayo) del ostión americano en la zona, lo que probablemente podía estar provocando dicha similitud genética. En el mismo estudio, observó bajos niveles de variabilidad genética para siete de las ocho lagunas evaluadas en comparación con poblaciones más norteñas y propuso que probablemente se debía a la sobreexplotación del recurso ostrícola. También reportó un exceso de heterocigotos en la Laguna Madre (situada al norte de Tampico), proponiendo que esta población está evolucionando independientemente.

Finalmente, algunos autores, al realizar análisis con ADNmt y nuclear (anonymus nuclear loci), encontraron un patrón macrogeográfico de la estructura poblacional de *C. virginica* en América del Norte; asignando dos stocks genéticos: uno en la costa Atlántica y el otro en el Golfo de México, al parecer aisladas por lo menos hace 1.2 millones de años (Reeb y Avise,

1990; Karl y Avise, 1992). Lo cual indica la presencia de dos poblaciones de ostiones, separadas por una barrera zoogeográfica (Gaffney, 1996).

Dado lo anterior, Gaffney (1996) propuso que es probable que la deriva genética ha llevado a la divergencia de genes neutrales (o débilmente afectados por la selección), mientras que la selección ha actuado para mantener la frecuencia alélica a través de grandes áreas y para crear diferencias fisiológicas en regiones distintas.

### **Características oceanográficas de la zona de estudio**

Con base en la circulación de las corrientes oceanográficas, la costa del Golfo de México (GoM) se divide en tres zonas principales (Fig 1): la plataforma de Louisiana-Texas, EU (LATEX), las correspondientes a México: Tamaulipas-Veracruz (TAVE), y el Banco de Campeche Oeste (Blaha and Sturges, 1981). El sistema de corrientes costeras en GoM fue analizado por Zavala-Hidalgo, *et al.* (2003) y se describe a continuación.

En la Figura 1 se muestra un mapa con la localización de las zonas según los modelos de circulación, las estaciones a partir de las cuales se han obtenido los datos oceanográficos y las isóbatas analizadas en la plataforma continental (25, 50 y 200 m).

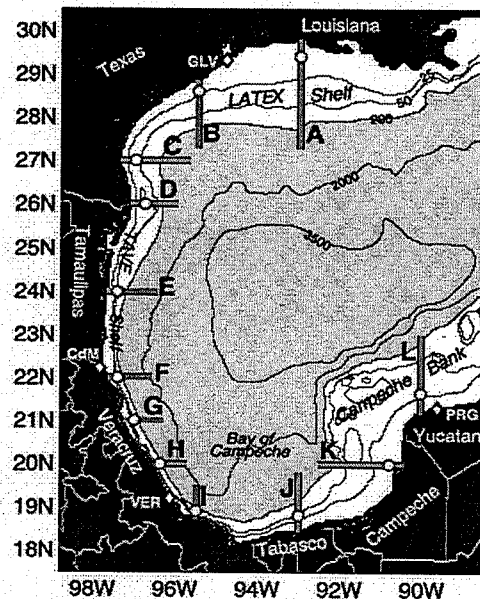


Figura 1. Localización del Golfo de México y sitios de interés. Las secciones donde los análisis detallados están presentes son indicadas con letras mayúsculas, y los círculos indican los sitios (estaciones) de las corrientes superficiales a partir de los cuáles

La circulación en la plataforma mexicana tiene una fuerte relación con la dinámica en la plataforma de LATEX, de esta forma, los eventos oceanográficos producidos en esta zona, afectan directamente el sistema de corrientes en la costa mexicana. La circulación en GoM es principalmente estacional, pero con diferencias regionales, con periodos de tiempo más grandes en TAVE, mientras que en LATEX se presenta en periodos de tiempo más cortos y en el banco de Campeche no se presentan cambios considerables en la dirección de la circulación costera.

Para la plataforma de TAVE, que comprende desde el sur del río Grande hasta parte de la bahía de Campeche ( $26^{\circ}$  N y  $18.5^{\circ}$  N), las corrientes se dirigen hacia el sur de septiembre a marzo y hacia el norte de mayo a agosto, alcanzando una velocidad media mensual de  $0.70\text{ms}^{-1}$ ; con periodos de transición de finales del mes de marzo a abril, y de finales de

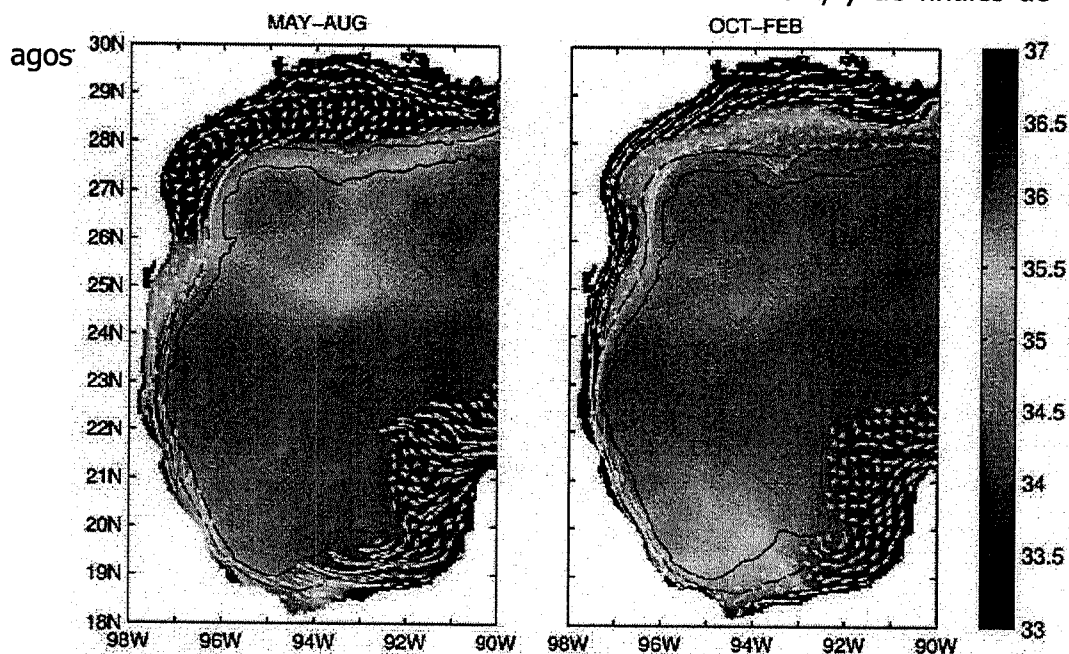


Figura 2. Modelo de la media de salinidad superficial de a) mayo-agosto, b) Octubre-Febrero. Los vectores representan las corrientes principales (isóbatas de 200 y 1000 m) para los periodos correspondientes. Tomado de Zavala-Hidalgo, *et al.* (2003).

En la Figura 2 se pueden apreciar las dos temporadas principales donde suceden estos cambios en la dirección de las corrientes y que mantienen entre otras cosas, el transporte de agua menos salina hacia el sur durante la temporada otoño-invierno, por efecto de los ríos Mississippi y

Atchafalaya (EU). Estas aguas con baja salinidad y temperatura más fría de hasta 5° C son dirigidas a través de la plataforma de LATEX hacia la plataforma de TAVE, desarrollando frentes a lo largo de la plataforma externa y produciendo inversiones de temperatura.

Durante la estación de verano (Fig. 2), las aguas de la plataforma TAVE presentan una advección sobre la plataforma de LATEX. De esta manera, la salinidad y temperatura aumentan en las aguas costeras de TAVE, al disminuir el efecto de las aguas provenientes de LATEX. Los principales ríos mexicanos que aportan agua dulce a la plataforma de TAVE son relativamente más pequeños en comparación con los de EU, así, a pesar de que estos ríos tienen su máxima descarga de agua dulce en verano, es en invierno cuando la presencia de agua dulce es más grande sobre esta plataforma.

En la plataforma de LATEX, está presente una circulación ciclónica la mayor parte del año, con una fuerte corriente estacional a lo largo de la plataforma interna, y una corriente amplia más débil sobre la plataforma externa. Así, el periodo de circulación costa abajo (hacia el sur) es más grande que el de costa arriba (hacia el norte), y este periodo se reduce progresivamente en el norte y este de la plataforma de LATEX.

Existen dos zonas principales de confluencia en el GoM: Una situada en la parte norte de TAVE ( $26.5^{\circ}$  N) de abril a agosto, con una intensidad mayor en abril y mayo; y otra en la parte sur de la bahía de Campeche ( $93^{\circ}$  W y  $95.5^{\circ}$  W) de septiembre a marzo. Una de las consecuencias principales de estas convergencias es la formación de corrientes hacia fuera de la costa, las cuáles son principalmente estacionales.

## JUSTIFICACIÓN

---

Dadas las fluctuaciones en la producción del ostión en los últimos 20 años, la sobreexplotación del recurso, y al creciente deterioro ambiental y del hábitat; se hace evidente la necesidad de conocer la variación y la estructura genética en las poblaciones naturales de *C. virginica* en las principales lagunas productoras de este recurso dentro del Estado de Veracruz. Este proyecto puede dar la pauta para entender bajo el esquema de marcadores neutrales la dinámica poblacional de dicha especie en la región. De la misma forma pero dentro del sector productivo (pesquerías y acuacultura), el resultado de este trabajo pretende aportar en un futuro inmediato:

a) La definición de poblaciones locales, diferenciadas del resto, lo cual permitiría el plantear estrategias para un mejor manejo pesquero.

b) La caracterización de la variabilidad genética para implementar acciones inmediatas como la ostricultura y la restauración de los bancos naturales por repoblamiento que ayuden a mantener el aprovechamiento racional del recurso dentro del Estado de Veracruz.

La mayoría de los esfuerzos por analizar la variabilidad genética en el ostión americano han sido a través de estudios de alozimas y nos han permitido tener un panorama de la estructura y variabilidad genética del ostión americano en la costa atlántica oriental (De la Rosa-Vélez, 1986;

Buroker *et al.*, 1983a; Buroker, 1983b; Hedgecock y Okasaki, 1984; Gaffney *et al.* 1992; Gaffney 1996). Sin embargo, el polimorfismo encontrado con las alozimas puede estar subestimando la variabilidad genética debido a: 1) la presencia de alelos nulos, errores de lectura (la observación de alelos de movilidad similar que pueden ser interpretados como el mismo alelo); y 2) la selección natural que puede influenciar la estructuración geográfica del polimorfismo en algunos loci llevando a la heterogeneidad entre éstos, con niveles altos de diferenciación genética en algunos y poca o ninguna en otros (Launey *et al.*, 2002).

El descenso en la producción ocurrido en la década de los noventas podría corresponder a una reducción en la población de *C. virginica* debido a efectos naturales como huracanes, efectos antropogénicos como la presión de pesca en el recurso y la degradación del hábitat en los bancos ostrícolas de las lagunas afectadas.

Debido a que el ADNmt presenta una tasa de mutación más estable y a que su herencia es exclusivamente materna (haplotípica), podemos obtener información sobre la diferenciación genética interpoblacional y tendencias evolutivas. Mientras que con los marcadores microsatélites analizaremos la estructura poblacional a un nivel más detallado, intrapoblacional (por la naturaleza de estos marcadores), el flujo genético, los niveles de endogamia y las reducciones poblacionales recientes.

Así mismo, los datos aportados por ambos marcadores permitirán reforzar entre ellos los resultados sobre la estructura poblacional, y proporcionar una herramienta que pueda generar una estrategia eficaz para la recuperación de los bancos ostrícolas en Veracruz.

## HIPÓTESIS

---

**1)** La estructura poblacional estará determinada por la distancia geográfica de las lagunas en la región. De esta manera, encontraremos la siguiente estructura: 1) laguna de Pueblo Viejo y Tamiahua, 2) Laguna Grande, la Mancha, y Alvarado, y 3) laguna El Ostión; esta última, a pesar de la cercanía con laguna de Alvarado es probable que tenga poco o nulo flujo genético, debido a que se encuentra localizada en una zona geográficamente cóncava, donde hay confluencia y se forman corrientes hacia fuera de la costa.

**2)** En las lagunas de Tamiahua y El Ostión, los bancos ostrícolas se han visto afectados por una reducción demográfica, lo cual se verá reflejado en una variabilidad genética reducida debida a un mayor efecto de la deriva genética.

## OBJETIVOS

---

### Objetivo General

Evaluar la variabilidad y diferenciación genética de seis lagunas costeras del ostión *C. virginica* en el Estado de Veracruz, mediante el uso de microsatélites y secuencias la región Citocromo Oxidasa I (COXI) de ADNmt.

### Particular

- Estimar la variabilidad genética del ostión americano *C. virginica* en cada una de las seis lagunas costeras, mediante análisis de microsatélites y secuenciación de ADNmt
- Definir el grado de estructuración en la zona o presencia de posibles stocks del ostión americano en la zona central (costa de Veracruz) de las costas del Golfo de México.
- Determinar la distancia genética entre los organismos de seis diferentes lagunas costeras de Veracruz y definir si corresponden a la distancia geográfica existente entre los sitios de muestreo.
- Determinar la existencia de flujo genético entre los organismos provenientes de las seis lagunas costeras de Veracruz y determinar la correlación con la dinámica oceanográfica de la zona.

---

**CAPITULO I: Análisis con marcadores microsatélites**

## INTRODUCCION

---

### Microsatélites

Actualmente los estudios genéticos se apoyan en marcadores nucleares como los microsatélites los cuales son altamente polimórficos, codominantes, predominantemente neutrales (o débilmente afectados por la selección) y heredados tanto vía materna como vía paterna (Schlöterer y Pemberton, 1994; Lambert y Millar, 1995).

Los microsatélites se definen como secuencias simples de repeticiones cortas en tándem, de 1 a 6 pares de bases (Schlöterer y Pemberton, 1994). El número de repeticiones varía en la secuencia entre individuos y a su vez determina la longitud del microsatélite. Esta variación se debe a un proceso conocido como "mal apareamiento por deslizamiento de hebra" (del inglés Slipped-Strand misparing") que ocurre en la secuencia del microsatélite durante la síntesis del ADN (Schlöterer y Tautz, 1992) y produce la delección o adición de uno o más nucleótidos (Eisen, 1999). Las tasas de mutación son altas por lo que esto produce el elevado polimorfismo en los loci de los microsatélites.

Los loci de estos marcadores moleculares comúnmente tienen 10 o más alelos que cualquier otro locus y presentan niveles altos de

heterocigocidad (50-100%) (Hughes y Queller, 1993). Esto los hace además muy útiles para identificaciones individuales, porque es muy poco probable que dos organismos elegidos al azar, si son analizados por una serie de estos marcadores, compartan sus alelos; aunque su significación dependerá del número de loci y de individuos utilizados. Además, la técnica para analizarlos es relativamente sencilla: permite la utilización de pequeñas muestras de tejido y la repetibilidad del análisis.

Estos marcadores han permitido analizar la estructura poblacional, los niveles de endogamia y los cuellos de botella recientes en algunas especies de moluscos bivalvos (Magoulas *et al.*, 1998; Launey *et al.*, 2002, Astanei *et al.*, 2005). Launey *et al.* (2002), encontraron diferencias genéticas en los valores de  $F_{ST}$  a partir de microsatélites, para las poblaciones de *Ostrea edulis* del Atlántico vs las del Mediterráneo. En años recientes se ha realizado la obtención marcadores microsatélites para la especie *C. virginica* (Brown *et al.*, 2000; Reece *et al.*, 2004), en estos trabajos encontraron un alto polimorfismo en los loci obtenidos en poblaciones naturales y cultivadas. En un trabajo reciente realizado en la Bahía de Chesapeake (E.U.) encontraron un modelo sutil de aislamiento por distancia con varios loci microsatélites (Rose *et al.*, 2006).

*C. virginica* habita los principales estuarios y lagunas a lo largo de la costa del Estado de Veracruz (México)<sup>3</sup>. Las corrientes costeras en el Golfo

de México son estacionales en dirección hacia el sur de septiembre a marzo y al norte de mayo a agosto (Zavala-Hidalgo *et al.*, 2003), lo cual hace que el transporte larval a lo largo de la línea costera de Veracruz sea un elemento importante en la mezcla de las poblaciones. Algunas condiciones relacionadas a características topográficas tales como la laguna de La Mancha que presenta una comunicación temporal con el mar (Contreras y Castañeda, 1985), y una salinidad elevada en la laguna de Tamiahua (Contreras y Castañeda, 1985; Robles-Hernández, 2006), parecen reducir la sobrevivencia de las larvas (Newkirk *et al.*, 1977). Adicionalmente, una reducción poblacional por alteración del hábitat podría contribuir a una diferenciación por deriva genética en estas lagunas. Un estudio con alozimas en *C. virginica* en la región centro-sur del Golfo de México (incluyendo Veracruz), reportó cuatro zonas diferentes, basadas en la similaridad y distancia genética (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1988).

En el presente trabajo, intentamos determinar la variabilidad genética y la estructura de *C. virginica* a lo largo de la costa del Estado de Veracruz, utilizando cinco loci de microsatélites (Brown *et al.*, 2000), los cuales nos proveerán información valiosa para las prácticas de manejo para mejorar la sustentabilidad de esta especie en México.

## METODOLOGÍA

### Obtención de muestras

Los organismos se recolectaron en seis lagunas costeras del Estado de Veracruz (*Anexo I*): Pueblo Viejo (PV, n= 50), Tamiahua (Ta, n= 40), Laguna Grande (LG, n= 40), La Mancha (LM, n= 50), Alvarado (AL, n= 50) y El Ostión (LO, n= 40) (Fig. 3). De cada organismo se obtuvieron muestras de músculo y manto, y se conservaron en alcohol al 95%, manteniéndose a 4°C hasta su procesamiento. En el *Anexo I* se incluye la localización georeferenciada de las zonas de recolecta.

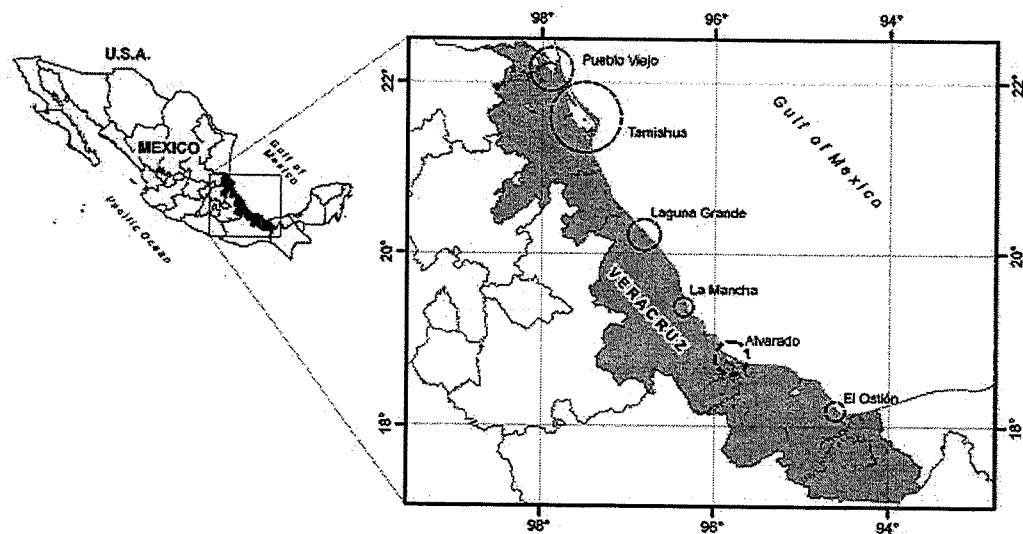


Figura 3. Sitios de recolecta de las muestras de *Crassostrea virginica* en el Estado de Veracruz.

## Extracción de ADN

La extracción del ADN total de cada individuo se realizó a partir de la técnica de extracción rápida de sales (Aljanabi y Martínez, 1989), la cual se modificó y adaptó a las características de nuestras muestras (*Anexo II*). La verificación de la presencia y la cantidad de ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, mediante la comparación con un marcador de peso molecular y concentración conocido ( $\lambda$ , Invitrogen).

### Análisis de microsatélites (ADN nuclear)

- ***Amplificaciones de los microsatélites***

Se probaron un grupo de siete microsatélites de *C. virginica*, publicados previamente por Brown *et al.* (2000): Cvi-6, Cvi-8, Cvi-9, Cvi-11, Cvi-12 y Cvi-13. Se optimizaron las temperaturas de alineamiento y los ciclos de cada par de cebadores (*primers*) para la amplificación de los microsatélites. Se hicieron diluciones de las muestras de ADN para obtener concentraciones de 20ng/ $\mu$ L.

Una vez realizada la optimización, los microsatélites seleccionados fueron amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*). La amplificación se realizó en un volumen de 15  $\mu$ L, conteniendo 20 ng de ADN, 0.25  $\mu$ M de cada *primer* (*forward y reverse*), 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de

cada nucleótido y 0.25U de Taq polimerasa (Invitrogen), con las siguientes condiciones de amplificación: 5 min a 94° C, 30 ciclos de 0.30 min a 94° C, 0.30 min a la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) (Tabla 1) y 0.30 min a 72° C, con una extensión final de 5 min a 72° C.

- ***Electroforesis y visualización con quimioluminiscencia***

Los productos del *PCR* fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, 7.5 M de urea (*Anexo III*) y transferidos a una membrana de nylon moderadamente cargada (Nytran, Schleicher y Schuell). La visualización fué realizada por quimioluminiscencia utilizando el kit de detección Phototope-Star (New England Biolabs), y exponiendo en películas de rayos X (Kodak X-Omat) (Pérez-Enríquez *et al.*, 2001) (*Anexo IV*).

- ***Análisis estadístico de los microsatélites***

A partir de los datos de alelos de loci microsatélites usando la utilidad MsTools (Park, 2001) para el programa Excell (2003) se generaron las bases de datos para los distintos formatos de los programas manejados.

Las frecuencias alélicas, el número de alelos por locus ( $A$ ), el índice de endogamia ( $F_{IS}$ ), la heterocigocidad esperada ( $H_E$ ) y la heterocigocidad observada ( $H_O$ ) fue calculada mediante el programa GENETIX versión 4.0 (Belkhir *et al.*, 2000). El número medio efectivo de alelos fue calculado como

es descrito por Hartl y Clark (1997). El equilibrio de Hardy-Weiberg (H-W) fue evaluado utilizando dos paquetes, GENETIX (prueba de significación de  $F_{IS}$  por 10,000 permutaciones) y el programa ARLEQUIN ver. 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) (prueba de  $X^2$ ).

El desequilibrio de fase gamética fue determinado utilizando el programa GENPOP versión 3.3 (Raymond y Rousset, 1995) bajo la hipótesis nula de independencia en la segregación de genotipos entre loci evaluados. Se revisaron los errores genotípicos (alelos nulos, "bandas fantasma" o stutters, "allelic drop out", y errores tipográficos) mediante el programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Este programa utiliza bases de datos con formato GENPOP.

La estructura genética fue analizada utilizando los estimadores  $F_{ST}$  y  $F_{IS}$  (Weir y Cockerham, 1984). Se analizaron los  $F_{ST}$  pareados utilizando 10,000 permutaciones mediante el programa GENETIX. Se determinaron los niveles de significación mediante una corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). Exploramos el efecto de los alelos nulos en las estimaciones  $F_{ST}$  por medio del programa FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007), el cual corrige los datos genotípicos para alelos nulos y recalcula los valores de  $F_{ST}$  (Weir and Cockerham, 1984). Los valores de  $F_{ST}$  fueron utilizados para calcular las relaciones entre la diferenciación genética y la distancia geográfica: utilizando los valores de  $F_{ST}$  pareados y las distancias geográficas linealizadas

entre los pares de muestras (Rousset, 1997), utilizando la prueba de Mantel (Smouse *et al.*, 1986) con 1000 permutaciones, a través del programa Genpop (Raymond y Rousset, 1995).

Los niveles de estructura poblacional fueron evaluados mediante un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) a través del programa ARLEQUIN ver. 3.0. (Excoffier *et al.*, 2005) utilizando el estadístico F.

## RESULTADOS

---

### Optimización y elección de los loci de microsatélites

Se realizó un análisis preliminar en una muestra de 30 individuos de localidades diferentes (Ta, n=10; PV, n= 10; LO, n= 10), en donde se evaluaron los siete loci microsatélites reportados por Brown *et al.* (2000). En la tabla 1 se muestran los loci analizados y el motivo de cada uno de ellos: dos trinucleótidos simples, tres tetranucleótidos simples y dos tetranucleótidos compuestos. De los siete loci analizados se lograron amplificar con éxito seis; la excepción fue el locus Cvi7 el cual presentó amplificaciones inespecíficas (bandas extra) que hacían difícil la identificación de los alelos.

A pesar de que se logró amplificar con éxito el locus Cvi12, fue descartado del estudio debido a que mostró un amplio rango de tallas alélicas (98-230 pb) lo cual dificultó el análisis con la técnica de quimioluminiscencia. Para analizar este locus era necesario manejar membranas de nylon con un largo de 25 cm, en tanto que el permisible era de 10 cm debido a la limitante de diámetro de los tubos de hibridación que se utilizaron (*Anexo IV*).

De esta manera, fueron cinco loci (Tabla 1) los que se optimizaron y se usaron para los análisis genéticos poblacionales: Cvi6, Cavi8, Cavi9, Cavi11 y Cvi13.

Tabla 1. Características de los siete loci probados en este estudio. En la tabla se muestra el motivo de cada loci, el rango de tamaños de los alelos, las Tm optimizadas y el número medio de alelos (A). Se muestran en negritas los loci utilizados.

<b>Locus</b>	<b>Motivo</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Tm °C</b>	<b>A</b>
<b>Cvi6</b>	(GAT) <sub>17</sub>	159-214	50	19
Cvi7	(CAAA) <sub>6</sub>	ND	50	ND
<b>Cvi8</b>	(CAAA) <sub>2</sub> (CAA) <sub>2</sub>	177-298	55	10
<b>Cvi9</b>	(CAT) <sub>14</sub>	100-167	55	17
<b>Cvi11</b>	(CAAA) <sub>5</sub>	143-159	55	4
Cvi12	(CAAA) <sub>6</sub> CAGAAAAA(CAAA) <sub>4</sub>	98-230	55	ND
<b>Cvi13</b>	(CAAA) <sub>10</sub>	114-257	50	26

Tm = Temperatura óptima de alineamiento. ND = No Determinado.

### Variabilidad genética intrapoblacional

La variabilidad genética de *C. virginica* en seis lagunas costeras del Estado de Veracruz con cinco loci de microsatélites es mostrada en la tabla 2, y descrita a continuación.

### ***Análisis por locus***

El rango en el número medio de alelos por locus ( $A$ ) considerando todas las poblaciones fue de 4 (Cvi11) a 26 (Cvi13), mientras que el número efectivo de alelos ( $ne$ ) se mantuvo en un rango menor de 2.8 (Cvi8) a 16.4 (Cvi13).

La heterocigocidad media observada ( $H_o$ ) fue de 0.496 (Cvi6) a 0.725 (Cvi9), mientras que la esperada ( $H_E$ ) por locus se presentó en el rango de 0.660 (Cvi8) a 0.953 (Cvi13) (Tabla 2). Cabe denotar que el locus Cvi8 presentó un valor de  $H_o$  (0.514) casi tan bajo como el de Cvi6, y el locus Cvi13 muy cercano al valor superior observado en Cvi9 ( $H_o = 0.688$ ).

Por lo anterior, considerando tanto el número de alelos, el número efectivo de alelos y la heterocigocidad, los locus menos polimórfico fueron Cvi8 ( $A = 10$ ,  $ne = 2.8$ ,  $H_o = 0.514$  y  $H_E = 0.660$ ) y Cvi11 ( $A = 4$ ,  $ne = 3.1$ ,  $H_o = 0.576$  y  $H_E = 0.689$ ), mientras que el más polimórfico fue Cvi13 ( $A = 26$ ,  $ne = 16.4$ ,  $H_o = 0.688$  y  $H_E = 0.953$ ).

Tabla 2. Variabilidad genética en cinco loci de microsatélites en seis lagunas en el Estado de Veracruz.

Locus		Población						Media
		PV	Ta	LG	LM	AL	LO	
Cvi6	A(n)	19(45)	10(22)	17(28)	23(48)	18(30)	26(36)	19(35)
	ne	11.3	5.3	11.2	10.4	10.3	14	10.4
	H <sub>o</sub>	0.600	0.272	0.429	0.542	0.466	0.528	0.496
	H <sub>E</sub>	0.932	0.844	0.942	0.918	0.933	0.964	0.909
	F <sub>IS</sub>	<b>0.352</b>	<b>0.676</b>	<b>0.542</b>	<b>0.409</b>	<b>0.496</b>	<b>0.443</b>	<b>0.486</b>
Cvi8	A(n)	10(49)	9(35)	11(33)	11(46)	10(43)	9(33)	10(40)
	ne	2.4	2.8	3.5	2.6	2.8	2.8	2.8
	H <sub>o</sub>	0.470	0.600	0.606	0.348	0.581	0.484	0.514
	H <sub>E</sub>	0.594	0.657	0.742	0.644	0.655	0.665	0.660
	F <sub>IS</sub>	0.211	0.080	0.169	<b>0.447</b>	0.114	<b>0.259</b>	<b>0.213</b>
Cvi9	A(n)	17(47)	13(31)	17(28)	20(48)	13(41)	19(42)	17(40)
	ne	10.6	8.7	8.9	12.9	6.3	10.7	9.7
	H <sub>o</sub>	0.830	0.677	0.714	0.854	0.561	0.714	0.725
	H <sub>E</sub>	0.918	0.900	0.912	0.934	0.860	0.919	0.909
	F <sub>IS</sub>	<b>0.095</b>	<b>0.250</b>	<b>0.213</b>	<b>0.085</b>	<b>0.343</b>	<b>0.224</b>	<b>0.201</b>
Cvi11	A(n)	4(49)	4(28)	4(27)	4(42)	5(42)	4(38)	4(38)
	ne	2.7	3.6	3.3	3.4	2.8	3	3.1
	H <sub>o</sub>	0.653	0.424	0.552	0.551	0.738	0.537	0.576
	H <sub>E</sub>	0.641	0.736	0.707	0.709	0.654	0.686	0.689
	F <sub>IS</sub>	-0.035	<b>0.422</b>	<b>0.223</b>	<b>0.225</b>	-0.148	<b>0.209</b>	<b>0.149</b>
Cvi13	A(n)	28(47)	22(34)	28(30)	26(47)	21(42)	33(41)	26(40)
	ne	17.5	14.2	17.8	14.8	12.4	21.7	16.4
	H <sub>o</sub>	0.702	0.647	0.733	0.723	0.738	0.585	0.688
	H <sub>E</sub>	0.957	0.951	0.964	0.945	0.932	0.970	0.953
	F <sub>IS</sub>	<b>0.265</b>	<b>0.317</b>	<b>0.239</b>	<b>0.234</b>	<b>0.208</b>	<b>0.397</b>	<b>0.277</b>
Media	A(n)	16(47)	12(30)	16(30)	17(46)	13(40)	18(39)	15(39)
	ne	8.9	6.8	8.9	8.8	6.9	10.4	8.5
	H <sub>o</sub>	0.651	0.524	0.607	0.604	0.617	0.570	0.595
	H <sub>E</sub>	0.803	0.810	0.845	0.825	0.800	0.831	0.819
	F <sub>IS</sub>	<b>0.191</b>	<b>0.357</b>	<b>0.286</b>	<b>0.270</b>	<b>0.231</b>	<b>0.317</b>	<b>0.275</b>

Número de alelos por locus (*A*), número efectivo de alelos (*ne*), Heterocigocidad observada (*H<sub>o</sub>*), Heterocigocidad esperada (*H<sub>E</sub>*), Coeficiente de endogamia (*F<sub>IS</sub>*). Los valores en negritas para *F<sub>IS</sub>*, son significativamente diferentes de cero (procedimiento de permutación, *P*<0.05).

Entre las poblaciones y por cada locus, el número de alelos observado varió de 4 (Cvi11, en casi todas las poblaciones excepto Alvarado) a 33 (Cvi13, El Ostión), el número efectivo de alelos fue de 2.4 (Cvi8, Pueblo Viejo) a 21.7 (Cvi13, El Ostión), mientras que la heterocigocidad observada y esperada fue de 0.272 (Cvi6, Tamiahua) a 0.854 (Cvi9, La Mancha) y de 0.594 (Cvi8, Pueblo Viejo) a 0.970 (Cvi13, El Ostión) respectivamente (Tabla2).

En 24 de las 30 posibles pruebas se observaron desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W). Estas desviaciones también se presentaron por locus en la prueba global de todas las poblaciones y por población en la prueba multilocus (todos los loci) (Tabla 2).

Las desviaciones de H-W fueron causadas por un déficit de heterocigotos como lo indican los valores positivos significativamente diferentes de cero del estimador  $F_{IS}$  ( $P < 0.05$ ). Esto se denota también por las diferencias entre los valores de heterocigocidad observada y esperada (Fig. 4).

Únicamente se presentó equilibrio de H-W con los loci Cvi8 y Cvi11 en algunas lagunas (Tabla 2). El locus Cvi8 mostró equilibrio de H-W en Pueblo Viejo, Tamiahua, Laguna Grande y Alvarado. Pero en el análisis global de todas las poblaciones no presenta equilibrio debido a los valores de  $F_{IS}$  en La

Mancha ( $F_{IS} = 0.447$ ) y El Ostión ( $F_{IS} = 0.259$ ) ya que son significativamente diferentes de cero y muestran un alto déficit de heterocigotos. En la Figura 4 es posible observar las pequeñas diferencias entre las heterocigocidades observadas (líneas) y las esperadas (barras) para dicho locus.

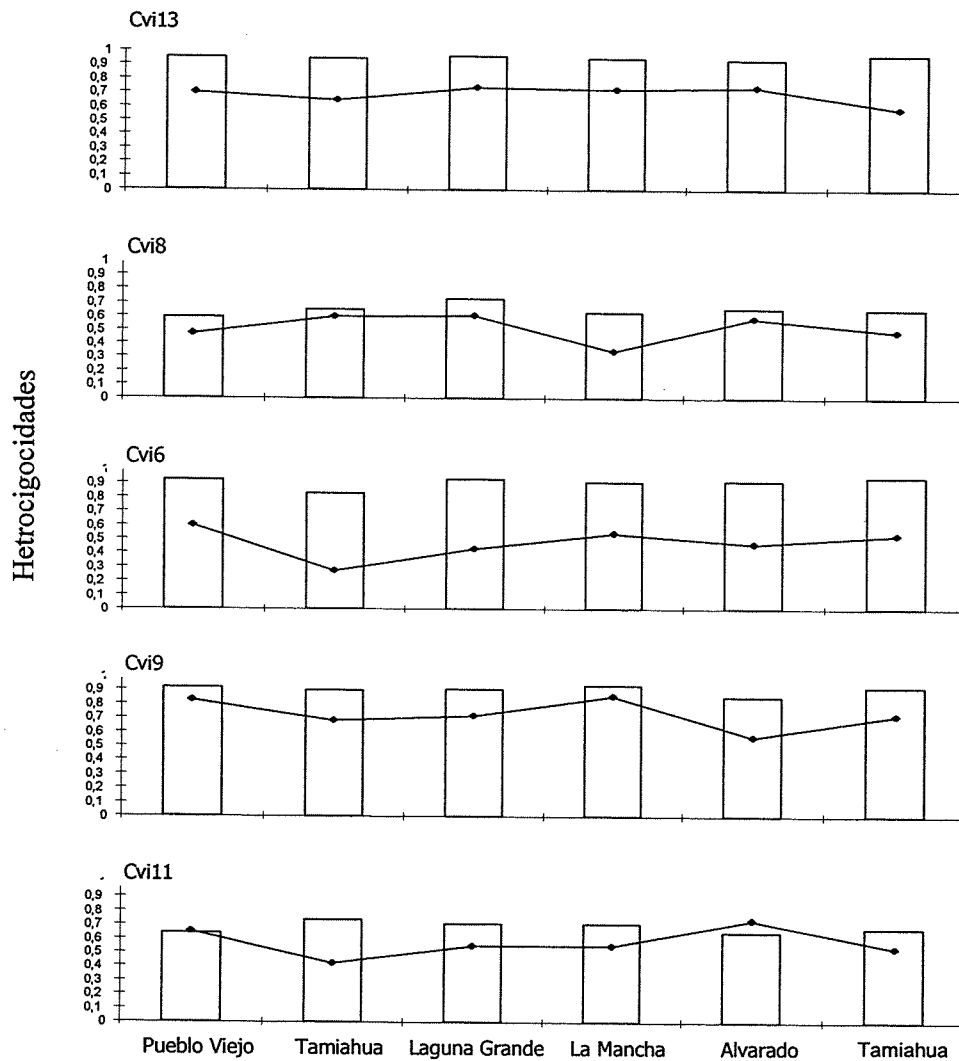


Figura 4. Gráficas de heterocigocidades observadas (líneas) y esperadas (barras) en las cinco lagunas costeras. En estas gráficas se aprecian mejor las diferencias entre la  $H_O$  y  $H_E$  entre todas las lagunas y todos los loci.

En el locus Cvi11 las lagunas de Pueblo Viejo ( $F_{IS} = -0.035$ ) y Alvarado ( $F_{IS} = -0.148$ ) se encuentran en equilibrio de H-W, ya que presentan valores de  $F_{IS}$  negativos, pero que no son significativamente diferentes de cero. Dichos valores se deben a que la Heterocigocidad observada (0.738 y 0.653, respectivamente) es ligeramente mayor que la esperada (0.654 y 0.641, respectivamente) (Tabla 2, Fig. 4). Los loci Cvi6, Cvi9 y Cvi13 presentan desviaciones H-W en todas las lagunas (Tabla 2). El locus Cvi6 se distingue por tener los valores más altos de  $F_{IS}$  entre todas las poblaciones ( $F_{IS} =$  de **0.352** a **0.676**) y en el análisis global con todas las poblaciones ( $F_{IS} =$  **0.486**), denotándose claramente las diferencias entre  $H_0$  y  $H_E$  (Fig. 4).

Todas las lagunas presentaron desviación al equilibrio de H-W y déficit de heterocigotos cuando se analizaron los valores de  $F_{IS}$  multilocus (Tabla 2). El análisis de desequilibrio de ligamiento mostró que los genotipos en cada loci se segregan independientemente (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de desequilibrio de ligamiento por pares de locus en *C. virginica*.

Par de locus		P
Cvi13	Cvi8	0.574
Cvi13	Cvi6	1
Cvi8	Cvi6	0.589
Cvi13	Cvi9	0.946
Cvi8	Cvi9	0.487
Cvi6	Cvi9	0.999
Cvi13	Cvi11	0.942
Cvi8	Cvi11	0.494
Cvi6	Cvi11	0.984
Cvi9	Cvi11	0.092

$P < 0.05$

### ***Análisis por población***

El número medio de alelos para todos los loci entre las lagunas varió en un rango de 12 (Tamiahua) a 18 (El Ostión) y el número efectivo de alelos fue de 6.8 (Tamiahua) a 10.4 (El Ostión) (Tabla 2). Las heterocigocidades promedio mostraron valores cercanos entre las lagunas: La heterocigocidad observada por laguna se mantuvo en un rango de 0.524 (Tamiahua) a 0.651 (Pueblo Viejo), mientras que la esperada sólo varió de 0.800 (Alvarado) a 0.845 (Laguna Grande) (Tabla 2).

De acuerdo a lo anterior los mejores indicadores de variabilidad genética entre las lagunas en este trabajo son el número medio de alelos y el número efectivo de alelos. Con base en esto, las lagunas con menor variabilidad genética son Tamiahua ( $A= 12$ ,  $ne= 6.8$ ) y Alvarado ( $A= 13$ ,  $ne= 6.9$ ), mientras que la laguna con mayor variabilidad genética es El Ostión ( $A= 18$ ,  $ne= 10.4$ ).

El número medio de alelos (riqueza alélica), es dependiente del tamaño efectivo poblacional (Nei *et al.*, 1987), por lo que puede ser un buen indicador de cambios demográficos recientes. Sin embargo, esta característica puede sesgar los resultados si existen diferencias en el tamaño de muestra de cada población.

Debido a esto, se realizó un ajuste con el tamaño mínimo de muestra mediante un análisis de rarefacción con el programa Fstat 2.9.3 (Goudet, 2001). También eliminamos: Pueblo Viejo, que es la laguna con menor número de muestras y posteriormente Cvi6, que es el locus con menor número de muestras amplificadas.

Después de realizar el ajuste del tamaño de muestra, las diferencias disminuyeron, pero la tendencia de los valores se mantuvo. Únicamente la Laguna Grande modificó su posición al colocarse como la laguna con mayor número de alelos (13.8), seguida de El Ostión (13.7). Las lagunas con menor número medio de alelos siguieron siendo Tamiahua (10.7) y Alvarado (11.4)

Tabla 4. Riqueza alélica con corrección de tamaño de muestra ( $N=22$ ) con los cinco loci analizados en las seis lagunas.

Locus	PV	Ta	Va	LM	AL	LO	Media
Cvi6	15.7	10	15.7	17	16.6	17.4	18.5
Cvi8	6.1	7.1	9	7.6	7.7	7.2	8
Cvi9	14.2	12.6	15.9	16.4	11.3	15.7	15.3
Cvi11	3.9	4.7	4.7	4	4.4	3.8	4.3
Cvi13	21.3	19.2	23.8	18.9	17.2	24.6	24
Media	<b>12.3</b>	<b>10.7</b>	<b>13.8</b>	<b>12.8</b>	<b>11.4</b>	<b>13.7</b>	

Los valores en negritas son significativamente diferentes entre sí ( $P < 0.05$ )

La riqueza alélica entre las localidades (corregida por el tamaño de muestra) fue significativamente diferente, como lo demostró la prueba de Friedman ( $\chi^2=21.55, p=0.0006$ ).

### ***Déficit de heterocigotos y alelos nulos***

Como se mencionó anteriormente al analizar todos los loci (Tabla 2), con excepción de algunos casos, se observó un déficit de heterocigotos en la mayoría de todas las lagunas. A pesar de que en dos lagunas se obtuvieron valores de  $F_{IS}$  negativos, estos no fueron significativamente diferentes de cero como para indicar un exceso de heterocigotos (Tabla 2). Los valores promedios de  $F_{IS}$  para todas las lagunas, fueron especialmente altas para el locus Cvi6 ( $F_{IS}= 0.486$ ).

Se sospechó de la presencia de alelos nulos como una de las causas de éste déficit en el locus Cvi6, debido a que en algunos individuos no se logró amplificar ningún producto después de varios intentos, ni aún cambiando los parámetros en la *PCR*. Estos mismos individuos sí dieron productos de *PCR* para el resto de los microsatélites analizados. De esta manera, para el locus Cvi6 se obtuvo el número más bajo de muestras amplificadas en tres de las cinco poblaciones (Pueblo Viejo, Tamiahua y Alvarado) (Tabla 2).

El programa MICRO-CHECKER sugirió la posible existencia de potenciales alelos nulos en los loci Cvi6, Cvi9 y Cvi13. En el caso de Cvi6 fue evidente la posibilidad de alelos nulos, por lo que se volvieron a calcular los valores de  $F_{IS}$  en todas las poblaciones excluyendo a este locus. En la tabla 5

se muestran los valores de  $F_{IS}$  sin Cvi6, los cuales en todas las lagunas fueron significativamente diferentes de cero ( $P < 0.05$ ), y sólo se observaron ligeras variaciones al compararlos con los valores obtenidos al considerar a todos los loci.

Para el locus Cvi13 no se presentaron problemas para amplificar las muestras con los *primers* de este locus, por lo que no se sospechó la presencia de alelos nulos, ya que en la mayoría de los casos se amplificaron casi todos los individuos recolectados (Tabla 2). No obstante lo anterior, se calcularon los valores de  $F_{IS}$  excluyendo a este locus (Tabla 5), sin presentarse cambios significantes tal como en el caso de Cvi6.

Tabla 5.  $F_{IS}$  estimadas para seis lagunas en los cinco loci y excluyendo a los loci Cvi6 y Cvi13. En todos los casos los valores son significantes.

	Todos los loci	Sin Cvi6	Sin Cvi13
PV	<b>0.191</b>	<b>0.143</b>	<b>0.168</b>
Ta	<b>0.357</b>	<b>0.274</b>	<b>0.369</b>
LG	<b>0.286</b>	<b>0.213</b>	<b>0.299</b>
LM	<b>0.270</b>	<b>0.230</b>	<b>0.281</b>
AL	<b>0.231</b>	<b>0.151</b>	<b>0.238</b>
LO	<b>0.317</b>	<b>0.280</b>	<b>0.293</b>

Los valores en negritas son significativamente diferentes de cero después de la corrección de Bonferroni (procedimiento de permutación  $P < 0.05$ ).

A pesar de que el programa MICRO-CHECKER no indicó la presencia de alelos nulos en los otros loci, se realizó la misma evaluación para el resto de los loci (Cvi8 y Cvi11). Se observó que los valores de  $F_{IS}$  permanecieron

estadísticamente diferentes de cero ( $P < 0.05$ ), y los valores sólo aumentaron ligeramente.

### **Variabilidad genética interpoblacional**

El valor de  $F_{ST}$  multilocus fue de **0.019** (significativamente diferente de cero,  $p < 0.05$ ), lo cual nos indica una distribución heterogénea de la variabilidad genética de esta especie sobre el total de las lagunas recolectadas (Tabla 6). Los loci no contribuyeron de igual manera a la diferenciación poblacional, tal como lo indican los valores de  $F_{ST}$  para cada loci, los cuales van de 0.008 (Cvi6) a 0.038 (Cvi8) y en todos los casos son significativamente diferentes de cero ( $P < 0.05$ ) (Tabla 6). Al eliminar Cvi6 del análisis de la estimación multilocus, el valor de  $F_{ST}$  (**0.022**) no varía mucho y permanece significativamente diferente de cero ( $P < 0.05$ ), por lo que se decidió continuar con los análisis incluyendo este locus.

Los loci Cvi8 y Cvi11 contribuyeron con los valores más altos de  $F_{ST}$  (0.038 y 0.034, respectivamente) (Tabla 6), lo cual puede ser explicado por diferencias en frecuencias alélicas entre poblaciones para estos loci. En el *Anexo V* se observan las gráficas de frecuencias alélicas para todos los loci. En particular para estos dos loci las frecuencias alélicas variaron entre las lagunas, especialmente para los alelos 207 y 208 en el locus Cvi8, y en los alelos 147, 151 y 155 para el locus Cvi11.

Tabla 6. Valores de  $F_{IS}$  y  $F_{ST}$  de seis lagunas costeras en *C. virginica*. En la tabla se muestran los cinco loci utilizados en este estudio.

Locus	$F_{IS}$	$F_{ST}$
Cvi6	<b>0.459</b>	<b>0.008</b>
Cvi8	<b>0.218</b>	<b>0.038</b>
Cvi9	<b>0.190</b>	<b>0.010</b>
Cvi11	<b>0.141</b>	<b>0.034</b>
Cvi13	<b>0.277</b>	<b>0.012</b>
Total	<b>0.261</b>	<b>0.019</b>

Los valores en negritas son significativamente diferentes de cero (procedimiento de permutación,  $P < 0.05$ ).

Específicamente, en Pueblo Viejo, Tamiahua, Laguna Grande y Alvarado, el alelo más frecuente para Cvi8 fue el 207, mientras que para El Ostión y La Mancha fue el alelo 208. Para Cvi11 el alelo más frecuente en Pueblo Viejo fue el 147, el alelo 151 en La Mancha, y el alelo 155 en Tamiahua, Laguna Grande y El Ostión, mientras que en Alvarado los alelos 147 y 155 se encuentran presentes con la misma frecuencia.

Los valores pareados de  $F_{ST}$  con la corrección secuencial de Bonferroni fueron significantes ( $P < 0.005$ ) en 11 de las 15 comparaciones interpoblacionales (Tabla 7). Los valores no significantes son representados gráficamente en la Figura 5 e interpretados como flujo genético entre las lagunas. Los datos reanalizados después de la estimación de las frecuencias de los alelos nulos mediante el programa Frena (Chapuis y Estoup, 2007),

dieron como resultado cambios menores en las estimaciones de los valores de  $F_{ST}$  (*Anexo VI*).

El valor más alto de  $F_{ST}$  fue de 0.031, para las lagunas de Alvarado vs El Ostión, y para Alvarado vs La Mancha. Mientras que el valor más bajo no significativo fue de 0.004 para Pueblo Viejo vs Alvarado, y Laguna Grande vs El Ostión. El valor más bajo, pero significativamente diferente ( $P < 0.005$ ) fue de 0.012 para Pueblo Viejo vs El Ostión (Tabla 7).

Tabla 7. Valores de  $F_{ST}$  pareados entre seis lagunas costeras de *C. virginica* en el Golfo de México. El orden de las lagunas es de norte a sur.

	PV	Ta	LG	LMA	AL
Ta	<b>0.018</b>				
LG	0.011	0.008			
LMA	<b>0.028</b>	<b>0.029</b>	<b>0.016</b>		
AL	0.005	<b>0.020</b>	<b>0.015</b>	<b>0.031</b>	
LO	<b>0.012</b>	<b>0.021</b>	0.004	<b>0.013</b>	<b>0.031</b>

$P < 0.0153$  después de la corrección secuencial de Bonferroni. Los valores en negritas son significativamente diferentes de cero.

La laguna de Pueblo Viejo es significativamente diferente de dos lagunas adyacentes: Tamiahua ( $F_{ST}=0.017$ ) y La Mancha ( $F_{ST}=0.028$ ), y una distante: El Ostión ( $F_{ST}= 0.012$ ). No presenta diferencias significativas con Laguna Grande ( $F_{ST}= 0.018$ ) y Alvarado ( $F_{ST}=0.004$ ), las cuales están situadas distantes geográficamente (Tabla 7, Fig. 5). La laguna de Tamiahua es significativamente diferente a todas las lagunas, excepto a la de Laguna Grande ( $F_{ST}= 0.008$ ). Laguna Grande muestra diferencias significativas con

respecto a La Mancha ( $F_{ST}=0.016$ ) y Alvarado ( $F_{ST}=0.015$ ), dos lagunas adyacentes. Mientras que el valor más bajo de este estadístico F se presenta con la laguna de El Ostión (0.004), la cual se encuentra geográficamente distante (Tabla 7, Fig. 5). Como se observa en la tabla 7, la laguna de La Mancha fue significativamente diferente con respecto a todas las lagunas.

La laguna de Alvarado presenta diferencias significativas con todas las lagunas excepto con Pueblo Viejo ( $F_{ST}= 0.004$ ), la cual está situada geográficamente distante con respecto a Alvarado (Tabla 7, Fig. 5). La laguna de El Ostión no presenta diferencias significativas únicamente con Laguna Grande ( $F_{ST}= 0.004$ ), la cual también se encuentra distante geográficamente.

La prueba de Mantel indicó que no existe ninguna asociación significativa entre los valores de  $F_{ST}$  y la distancia geográfica ( $Z=193.68$ ,  $r=0.351$ ).

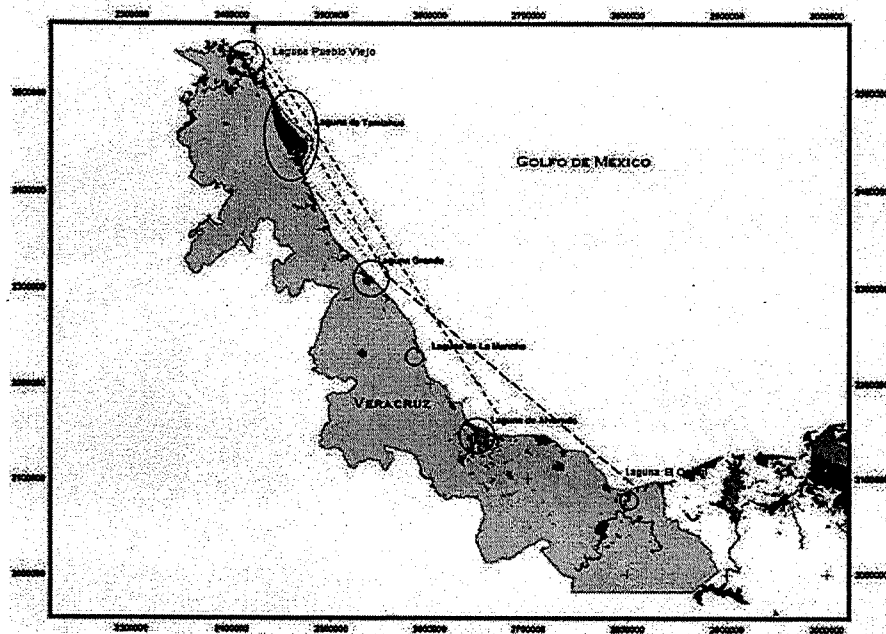


Figura 5. Flujo genético entre los bancos ostrícolas de las seis lagunas costeras en Veracruz analizados con los valores de  $F_{ST}$ . Las líneas punteadas indican valores de  $F_{ST}$  no significantes.

El Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) confirmó la variabilidad genética existente entre las lagunas, indicando una pequeña pero significativa variación entre ellas del 1.12% (Tabla 8).

Tabla 8. AMOVA jerárquico basado en loci de microsatélites de *C. virginica* en seis lagunas costeras de México.

Fuente de variación	Grados de libertad	Varianza	Porcentaje de variación
Entre lagunas	5	0.018	1.12
Dentro de lagunas	524	1.601	98.88

Índice de fijación  $F_{ST} = 0.0112$   $P < 0.05$ .

## DISCUSIÓN

---

### Variabilidad genética intrapoblacional

La variabilidad genética intrapoblacional obtenida con los cinco loci de microsatélites en este estudio ( $H_E = 0.800-0.845$ ) es más alta que la encontrada previamente en otros estudios genéticos para *C. virginica* en poblaciones naturales, en donde han utilizado como marcadores moleculares a las alozimas ( $H_E = 0.192-0.254$ , Buroker, 1983a;  $H_E = 0.128-0.220$ , de la Rosa-Vélez, 1986). Esto se debe principalmente al número mayor de alelos presentes en los loci de microsatélites, 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).

La alta variabilidad genética obtenida en este estudio ( $A = 12-21$ ,  $H_E = 0.800-0.845$ ) se presenta en otras especies de bivalvos cuando se utilizan microsatélites en condiciones naturales, como *Dreissena polymorpha* ( $A = 10-15.2$ ,  $H_E = 0.790-0.789$ , Astanei *et al.*, 2005) *Ostrea edulis* ( $A = 13-22.8$ ,  $H_E = 0.91$ , Launey *et al.*, 2002) y *Crassostrea gigas* ( $H_E = 0.890-0.96$  Huvet *et al.*, 2000).

Los niveles de variabilidad genética tienden a ser más altos en especies marinas, como lo demostraron DeWoody y Avise (2000) en un estudio genético con microsatélites, donde compararon especies de agua dulce contra especies marinas y encontraron en estas últimas heterocigocidades y número de alelos mayores ( $A=20.6$ ,  $H_E= 0.78$  vs  $A= 7.1$ ,  $H_E= 0.58$ ). Estos niveles altos de polimorfismo en organismos marinos, lo atribuyeron a que el tamaño efectivo poblacional es generalmente más grande debido que el ambiente marino es más extenso y continuo en comparación con otros ecosistemas (DeWoody y Avise, 2000).

El elevado polimorfismo con microsatélites en *C. virginica* ya ha sido reportado en un estudio anterior donde analizan la variabilidad genética de los loci utilizados en este trabajo en dos grupos naturales de Virginia y Connecticut, USA y obtienen valores para cada locus similares a los reportados en este trabajo ( $A= 4-26$ ,  $H_E= 0.640-0.940$ ; Brown *et al.*, 2000;  $A= 4-33$ ,  $H_E= 0.594-0.970$ ; este trabajo).

Los loci más polimórficos fueron Cvi6 ( $A= 19$ ,  $H_E= 0.909$ ), Cvi9 ( $A= 17$ ,  $H_E= 0.909$ ) y Cvi13 ( $A= 26$ ,  $H_E= 0.953$ ), los cuales contribuyeron a la alta variabilidad genética intrapoblacional y permitieron el análisis de dicha variabilidad mediante la comparación entre las poblaciones. Estos loci también fueron los más polimórficos en el análisis de Brown *et al.* (2000).

A pesar de que los valores de heterocigocidad esperada se mantienen en rangos muy similares entre las poblaciones de las lagunas ( $H_E = 0.800-0.845$ ), el número medio de alelos y el número efectivo de alelos varían en rangos de 12-18 y 6.8-10.4 respectivamente. De esta manera podemos considerar que estas medidas de diversidad genética pueden indicar mejor las diferencias en variabilidad genética intrapoblacional.

De acuerdo a estas medidas de diversidad genética, las lagunas con menor variabilidad fueron Tamiahua ( $A= 12$ ,  $ne= 6.8$ ) y Alvarado ( $A= 13$ ,  $ne= 6.9$ ). Mientras que la laguna con mayor variabilidad fue El Ostión ( $A= 18$ ,  $ne= 10.4$ ), seguida de Pueblo Viejo ( $A= 16$ ,  $ne= 8.9$ ), Laguna Grande ( $A= 16$ ,  $ne= 8.9$ ) y La Mancha ( $A= 17$ ,  $ne= 8.8$ ); todas ellas con valores de polimorfismo muy similares entre si. Si comparamos la variabilidad genética dentro de las lagunas de Tamiahua y Alvarado (menor polimorfismo) vs El Ostión (mayor polimorfismo), podemos inferir que las lagunas con menor variabilidad tienen de 5-6 alelos menos y casi 4 alelos efectivos menos que El Ostión. Después del ajuste con el tamaño mínimo de muestra (riqueza alélica), el número medio de alelos se homogenizó entre las poblaciones, pero la tendencia se mantuvo y las lagunas de Tamiahua y Alvarado siguieron siendo las lagunas con menor variabilidad genética, además de que los valores de la riqueza alélica en las lagunas fueron estadísticamente diferentes entre si. Por tanto, podemos considerar que el número medio de alelos es una medida de diversidad más sensible que la heterocigocidad, a

los cambios genéticos como resultado de reducciones demográficas (Spencer *et al.*, 2000).

Sin embargo, es difícil determinar reducciones demográficas en *C. virginica* en el Estado de Veracruz, debido a la poca existencia de registros demográficos. Se sabe que las poblaciones de esta especie han estado sometidas a cambios ambientales tanto naturales como artificiales que han provocado fluctuaciones considerables en la producción de este recurso marcando en 1992 una caída y posteriormente una difícil recuperación (Jiménez *et al.*, 2005). Esta disminución en la producción del ostión se ha relacionado con reducciones demográficas de este organismo, principalmente en la laguna de Tamiahua<sup>1</sup>, que hasta la década de los ochentas era la laguna que más toneladas de ostión aportaba a la producción estatal<sup>1</sup>.

La laguna de Tamiahua, a pesar de que es una de las lagunas con mayor extensión geográfica (88000 ha) (García, 1980) se ha visto afectada por factores antropogénicos y naturales que han provocado la disminución de los bancos ostrícolas dentro de esta laguna. A finales de los setentas el gobierno estatal abrió una boca artificial en la zona norte (Tampachichi), permitiendo la entrada de agua salada, lo que provocó un aumento de salinidad en la zona norte de esta laguna<sup>6</sup>. Esto volvió vulnerables a los bancos ostrícolas de *C. virginica* a enfermedades que diezmaron su población

---

<sup>6</sup> Horacio Cruz Lugo. Dirección de Acuacultura. SAGARPA, Delegación Veracruz. Comunicación personal.

en un 80%, y al desplazamiento ecológico por parte de *Ostrea equestris*, una especie que tolera salinidades más altas<sup>1</sup>. Otro fenómeno que produjo una disminución demográfica en los bancos ostrícolas fue el efecto de un huracán en 1990<sup>2</sup>. Todo lo anterior pudo haber resultado en una reducción en el tamaño poblacional de los bancos ostrícolas dentro de la laguna, generando cambios genéticos y una disminución en el número de alelos.

En el caso de Alvarado ( $A= 13$ ), se presentaron 5 alelos menos que en la laguna El Ostión ( $A= 18$ ) el cual tiene la variabilidad genética más alta. Después del ajuste al tamaño mínimo de muestra ( $N= 22$ ) se homogenizaron los valores pero Alvarado siguió siendo una de las lagunas con el menor número de alelos y El Ostión una de las más variables (Alvarado  $A=11.4$  vs El Ostión  $A= 13.7$ ). La laguna de Alvarado ha sido objeto de una sobreexplotación excesiva, aunque debido a su poca aportación a la producción estatal, no hay registros de posibles reducciones poblacionales (Jiménez *et al.*, 2005).

La laguna El Ostión a pesar de ser la laguna con mayor variabilidad genética muestra el valor más alto de  $F_{IS}$ . Este índice de fijación es medido por la relación entre heterocigocidad observa y esperada ( $H_E-H_O/H_E$ ) (Hartl y Clark, 1997) por lo que es un indicador de la cantidad de individuos homocigotos presentes en las poblaciones. En el caso de la laguna de El

Ostión, es posible que a pesar de poseer una alta variabilidad genética, la mayoría de los alelos se encuentren como homocigotos.

### ***Déficit de heterocigotos***

El déficit de heterocigotos observado relativo a lo esperado con el equilibrio de Hardy-Weinberg es común en bivalvos y ha sido reportado ampliamente en trabajos con alozimas (Gaffney, 1992; de la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1988; Fairbrother y Beaumont, 1993; Zourous y Foltz, 1984). Recientemente este déficit de heterocigotos también ha sido observado al analizar microsatélites en poblaciones naturales de bivalvos (Naciri *et al.*, 1995; Huvet *et al.*, 2000; McGoldrick *et al.*, 2000; Launey *et al.*, 2002; Hedgecock *et al.*, 2004; Astanei *et al.* 2005). En este estudio encontramos déficit de heterocigotos en todas las lagunas con los cinco loci de microsatélites. Los loci Cvi8 y Cvi11 fueron la excepción y presentaron equilibrio H-W en algunas lagunas.

El déficit de heterocigotos ha sido atribuido a factores como el efecto Walhund, selección natural y artefactos técnicos (alelos nulos y errores en el conteo) (Gaffney, 1990; McGoldrick *et al.*, 2000, Reece *et al.*, 2004). En especies con sexos separados, puede ocurrir endogamia a través de la reproducción entre individuos emparentados, produciendo de esta forma un déficit de heterocigotos (Astanei *et al.*, 2005).

El efecto Wahlund es observado cuando una muestra está compuesta por una mezcla de individuos de dos o más poblaciones que difieren en las frecuencias alélicas (Astaneï *et al.*, 2005). De esta manera, existen subgrupos diferenciados con limitado flujo genético dentro de las poblaciones. Por lo tanto, el estimador  $F_{IS}$  puede ser considerado como un valor de  $F_{ST}$  que estime la divergencia entre subgrupos cuando se encuentran en equilibrio de H-W (García de León *et al.*, 1997). En este estudio, los valores de  $F_{ST}$  son más bajos que la media de los valores de  $F_{IS}$  por lo que este resultado no apoya la hipótesis del efecto Wahlund.

Otro factor mencionado como causa de déficit de heterocigotos en alozimas es la selección natural (Gaffney, 1994). A pesar de que este análisis se realizó con marcadores presuntamente neutrales ya que en la mayoría de los casos los microsatélites se encuentran en zonas no codificantes (Jarne y Lagoda, 1996), es posible que pudieran estar ligados a loci que se encuentren bajo selección. Esto ha sido observado únicamente en estudios genéticos de ostiones producidos en laboratorios de larvas (*Hatcheries*) en *C. gigas* (McGoldrick *et al.*, 2000) y *Ostrea edulis* (Bierne *et al.*, 1998). Sin embargo, debido a que no hubo evidencia en nuestros datos de que algún par de loci estuviera ligado, la hipótesis de selección natural podría requerir que cada locus de microsatélite estuviera ligado a un locus específico que se encuentre bajo selección, lo cual es poco probable que suceda en poblaciones naturales.

La biología de *C. virginica* que incluye una fecundidad alta, fertilización externa y amplia dispersión larval (Kennedy, 1996), hace poco probable que la endogamia sea un factor que influya en el déficit de heterocigotos en organismos como los bivalvos (Huvet *et al.*, 2000, Astanei *et al.*, 2005). No obstante lo anterior, recientemente se ha encontrado que en *C. gigas* existen grandes diferencias en el éxito reproductivo y que sólo unos cuantos adultos contribuyen al evento reproductivo aún en poblaciones grandes (Li y Hedgecock, 1998). En este estudio no observamos evidencia que apoye la hipótesis de que la endogamia sea la causa del déficit de heterocigotos por dos razones: 1) no existe ligamiento entre todos los loci analizados (para que la endogamia trajera consigo el déficit de heterocigotos presente en todos los loci, deberíamos esperar que todos los loci estuvieran ligados); y 2) la endogamia debería de afectar a todos los loci por igual, generando déficit de heterocigotos homogéneos en todos los loci (Astanei *et al.*, 2005), lo cual no sucedió ya que los valores de  $F_{IS}$  fueron heterogéneos.

Los alelos nulos son un problema común con los microsatélites y pueden llevar a un alto déficit de heterocigotos (Brookfield, 1996). Los alelos nulos se presentan debido a mutaciones en las regiones que flanquean a los microsatélites (Chakraborty *et al.*, 1992), justamente donde se diseñan los *primers* para amplificar por *PCR*. Estas mutaciones impiden el alineamiento de los *primers*, y la consecuente amplificación del producto. Esto ha sido

observado en algunas especies de bivalvos como *C. gigas* (McGoldrick *et al.*, 2000; Hedgecock *et al.*, 2004), *Ostrea edulis* (Launey *et al.*, 2002), *Dreissena polymorpha* (Astanei *et al.*, 2005), incluyendo un reporte reciente con *C. virginica* para 18 loci de microsatélites (Reece *et al.*, 2004). En este último trabajo reportan 11% de alelos nulos en organismos producidos en laboratorios larvales, encontrando polimorfismo en las regiones que flanquean a los microsatélites. Por lo que sugirieron que el éxito relativamente bajo de los *primers*, puede ser debido al alto polimorfismo intraespecífico encontrado en el genoma de *C. virginica*.

En nuestro estudio, el análisis con el programa MICRO-CHECKER nos mostró evidencia de alelos nulos potenciales en dos loci: Cvi6 (16%) y Cvi13 (12%). Durante el análisis de las muestras en el locus Cvi13 no se observaron evidencias de alelos nulos, ya que se obtuvieron productos durante las amplificaciones en *PCR* en casi todas las muestras de cada población. En el locus Cvi13 es probable que el déficit de heterocigotos pudiera deberse al elevado polimorfismo ( $A= 26$ ) y a un tamaño de muestra reducido ( $n= 40$ ), más que a los alelos nulos.

Es probable que en el locus Cvi6 se presentaran alelos nulos, debido a que no se logró amplificar ningún producto en la *PCR* para ciertas muestras que sí amplificaron con otros loci. Por lo que con este locus se obtuvo el tamaño de muestra más pequeño (Tamiahua,  $n= 22$ ) en comparación con

los otros loci. Además, fue el locus con los valores más altos de  $F_{IS}$ , lo cual puede indicar un déficit de heterocigotos elevado.

La posible presencia de alelos nulos en poblaciones naturales de bivalvos ha sido recientemente reportada para, *Ostrea edulis* (Launey *et al.*, 2002) y *Dreissena polymorpha* (Astanei *et al.*, 2005). En ambos estudios se reportaron a los alelos nulos en algunos loci de microsatélites como la causa del déficit de heterocigotos. Sin embargo, conservaron a éstos loci durante el análisis genético.

En este trabajo se decidió conservar durante el análisis al locus Cvi6, ya que al eliminarlo no se modificó substancialmente la media de los valores de  $F_{IS}$ . Además de que es uno de los loci más polimórficos y apoya el análisis de variabilidad genética intra e interpoblacional.

### **Diferenciación interpoblacional**

La estructura genética poblacional en bivalvos se encuentra modelada por las barreras oceanográficas (temperatura y salinidad) (Reeb y Avise, 1990) sistemas de corrientes (Arnaud *et al.*, 2001; Launey *et al.*, 2002), y por actividades antropogénicas (Launey *et al.*, 2002; Arnaud-Haond *et al.*, 2004). *C. virginica* es una especie con una alta fecundidad y con capacidad de dispersión durante la fase larval planctónica que dura de dos a tres

semanas. Presenta dos picos durante la temporada de desove, uno en marzo-mayo y otro en septiembre-diciembre (Rogers y García-Cubas, 1981).

El Golfo de México presenta un sistema de corrientes costeras temporales, un periodo de primavera-verano (marzo-abril) donde las direcciones de las corrientes van hacia el norte, y otro periodo en otoño-invierno (septiembre-marzo), donde la dirección de estas corrientes es en sentido inverso (hacia el sur) (Zavala-Hidalgo, *et al.*, 2003). A pesar de esta posibilidad de intercambio genético, la dispersión larval no tiene la misma intensidad a lo largo de la distribución del ostión en el Estado de Veracruz, ya que el valor de  $F_{ST}$  multilocus (0.019) altamente significativo, nos indica que existen diferencias genéticas entre algunas lagunas. Este valor de diferenciación es consistente con el valor promedio presente en el ostión europeo *Ostrea edulis* ( $F_{ST}= 0.019$ ) (Launey *et al.*, 2001). El Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) determinó una variación de 1.12% entre las lagunas, respaldado también por un valor de  $F_{ST}$  significativo (0.011,  $P<0.05$ ).

Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren que *C. virginica* presenta una estructura genética poblacional modesta en la zona centro del Golfo de México (Veracruz), probablemente debido a la influencia de movimientos de organismos entre lagunas con flujo genético restringido entre algunas localidades. Sin embargo, dado la carencia de un patrón claro

de estructura, es más apropiado considerar la heterogeneidad en las frecuencias alélicas de los microsatélites como un "*parcheo caótico genético*" (Chaotic genetic patchiness), donde la heterogeneidad efímera localizada se encuentra presente a pesar de una homogeneidad a gran escala (Johnson y Black, 1982; Larson y Julian, 1999). Este modelo de diferenciación genética ha sido atribuido a la selección natural (o a la suerte) que actúa antes del asentamiento de los organismos marinos, o a la selección natural que actúa después de dicho asentamiento (Johnson y Black, 1982; Hedgecock, 1994). Para varias especies con larvas pelágicas, las poblaciones adultas muestran niveles bajos de subdivisión genética, a pesar de encontrar diferencias genéticas en repetidas recolectas de reclutas del mismo sitio en diferentes tiempos (o años), lo que revela que diferentes cohortes se encuentran diferenciadas genéticamente (Hellberg et al., 2002).

Por otro lado, De la Rosa-Vélez (1986) realizó un estudio genético previo con alozimas, en ocho lagunas costeras mexicanas del Golfo de México, desde Tamaulipas a Campeche y propuso la existencia de cuatro zonas que comparten similitudes genéticas. Dos de ellas corresponden al Estado de Veracruz; una en la zona norte: Pueblo Viejo y Tamiahua y otra en la zona sur: La Mancha y Sontecomapan. Nuestros datos nos indican un panorama más complejo de la estructura genética de la población. A partir de valores no significantes de  $F_{ST}$ , se sugiere cierto grado de flujo genético entre las dos zonas. Estas discrepancias pueden deberse al elevado

polimorfismo en los microsatélites, lo que causa que estos marcadores sean más sensibles para detectar estructura genética (Estoup *et al.*, 1998). Otra causa de las diferencias cuando se comparan análisis de alozimas *vs* microsatélites es el efecto de la selección sobre loci alozímicos, que provoca diferencias en las frecuencias de los alelos y una interpretación errónea de diferenciación genética poblacional (De Innocentis *et al.*, 2001). La selección por balanceo ha sido observada en *C. virginica* (Karl and Avise, 1992; MacDonald, 1996). Buroker (1983a) propuso que la selección por balanceo mantiene las diferencias en las frecuencias alélicas del locus *Mp-1* en esta especie, cerca del Delta del Mississippi; y De la Rosa-Vélez (1986) hipotetizó esta forma de selección para los loci *Est-2* y *Idh-1* en poblaciones mexicanas.

La estructura genética de las poblaciones de *C. virginica* en Veracruz (utilizando microsatélites) no sigue un claro patrón geográfico. Ciertas poblaciones distantes del norte y sur mostraron valores de  $F_{ST}$  pareados no significantes (ej. Pueblo Viejo y Alvarado, Tabla 7). Una dispersión larval extensiva puede ser el resultado de la interacción de modelos de circulación estacionales de las corrientes costeras en el Golfo de México (Zavala-Hidalgo *et al.*, 2003) con el ciclo reproductivo de *C. virginica*. Las larvas son producidas durante todo el año, con un pico en febrero (Robles-Hernández, 2006), y son probablemente dispersadas por los movimientos hacia el sur y norte de las corrientes costeras. La dispersión de larvas marinas por las corrientes marinas, han sido reportadas previamente por otros autores en

bivalvos marinos (ej Gilg and Hilbish, 2003; Kenchington *et al.*, 2006). Los bajos valores pareados de  $F_{ST}$  entre las lagunas más alejadas pueden ser explicados con base en las translocaciones realizadas por actividades antropogénicas. Existen reportes de esfuerzo de repoblamiento utilizando especímenes de lagunas distintas: de Alvarado a Pueblo Viejo, y de El Ostión a Pueblo Viejo (SAGARPA, 2002). Sin embargo, según los valores de  $F_{ST}$  significantes indican que es probable que esto haya sido poco exitoso, y que las semillas trasladadas a la laguna de Tamiahua hayan sobrevivido sólo en un bajo porcentaje.

Sin embargo, ciertas localidades son significativamente diferentes entre sí: Tamiahua, La Mancha, Alvarado, y el Ostión. Los valores significantes de  $F_{ST}$  entre estas localidades pueden ser el resultado de factores geográficos y reducciones locales en el tamaño demográfico. En Tamiahua, la reducción causada por una alteración en el hábitat (Palacios-Fest and Chávez, 1994), puede ser responsable de dicha diferenciación, aunado a los niveles altos de salinidad en esta laguna que puede impedir la sobrevivencia de las larvas procedentes de otras lagunas.

La diferenciación genética más grande, se presentó en La Mancha con valores de  $F_{ST}$  significantes con respecto a todas las localidades. Esta laguna presenta una característica particular: es una laguna de dimensiones pequeñas (3 km de longitud y 0.5 km de ancho) que tiene comunicación

estacional hacia el mar mediante una barra que se abre sólo en la época de lluvias (Contreras y Castañeda, 1985). Recientemente se ha reportado que esta barra permanece cerrada algunos años durante la época de lluvias<sup>7</sup>. Lo anterior puede permitir la dispersión larval restringida y un reclutamiento local.

Alvarado mostró los valores significantes más grandes de  $F_{ST}$  con las localidades adyacentes (La Mancha y El Ostión). Estas diferencias genéticas pueden ser el resultado de la reducción en el tamaño demográfico, causado por una sobreexplotación del recurso y la contaminación en la laguna de Alvarado (Jiménez et al., 2002). La laguna de Alvarado presenta un ecosistema muy impactado por actividades antropogénicas y continuamente tiene problemas de contaminación, además de que recientemente se han realizaron obras hidráulicas para permitir la entrada de una mayor cantidad de agua salina proveniente del mar<sup>6</sup>.

El aislamiento por distancia ha sido detectado dentro de las poblaciones de *Pinctada margaritifera* (Arnaud et al., 2000) y *Ostrea edulis* (Launey et al., 2002) en grandes distancias geográficas. En nuestro estudio, un modelo de dispersión de isla es más consistente con la ausencia de relación entre los  $F_{ST}$  pareados y las distancias geográficas, donde los individuos o sus gametos se mueven de una población a otra con igual

---

<sup>7</sup> Dra. Ma. de Lourdes Jiménez Badillo. Centro de Ecología y Pesquerías. Universidad Veracruzana. Comunicación personal.

probabilidad, más que por aislamiento por distancia. Sin embargo, parece ser más plausible considerar el patrón observado de significación estadística en  $F_{ST}$  con heterogeneidad genética no acorde a la distribución geográfica, como otro ejemplo de un modelo de "parqueo genético caótico" en organismos marinos.

*C. virginica* tiene una amplia distribución, sin embargo, nuestra recolecta fue realizada en las costas del Estado de Veracruz, en una porción de su distribución real. Nuestro estudio indica una conectividad genética complicada entre las lagunas del Estado de Veracruz, como una estructura genética microgeográfica que refleja la interacción entre la dinámica poblacional y los factores físicos, los cuales pueden incluir tanto los factores hidrogeográficos, como los antropogénicos, en combinación con la variación estocástica en la reproducción, sobrevivencia y dispersión larval.

## CONCLUSIONES

---

- La variabilidad genética en las poblaciones de *Crassostrea virginica* analizada con microsatélites fue alta ( $A= 12-18$ ,  $ne= 6.8-10.4$ ,  $H_0= 0.524-0.651$ ,  $H_E= 0.800-0.845$ ) y presentó valores similares a otras especies de bivalvos.
- Se observó desviación al desequilibrio de Hardy-Weinberg en todas las lagunas y en todos los loci, el cual fue causado por un déficit de heterocigotos como lo indican los valores positivos significativamente diferentes de cero del estimador  $F_{IS}$ .
- El déficit de heterocigotos en algunos casos fue debido a la presencia de alelos nulos en dos de los cinco loci analizados.
- Las lagunas con menor variabilidad genética de acuerdo al número medio de alelos son Tamiahua y Alvarado ( $n= 12$ ,  $n= 13$ , respectivamente) debido posiblemente a reducciones recientes en los tamaños poblacionales.
- La laguna El Ostión a pesar de que presenta los valores más altos de variabilidad genética ( $n= 18$ ), tiene un valor alto de coeficiente de

endogamia ( $F_{IS} = 0.317$ ), por lo que una mayor proporción de los alelos se encuentran en forma homocigótica.

- La laguna de Pueblo Viejo aparte de tener niveles altos de variabilidad genética, presenta el menor índice de endogamia. Mientras que las poblaciones de Laguna Grande y La Mancha presentan niveles altos de variabilidad genética y valores medios de endogamia.
- La laguna La Mancha es significativamente diferente a todas las lagunas, lo que quiere decir que presenta un bajo o nulo intercambio genético.
- Existe una moderada estructura genética en la población de *C. virginica* dentro del Estado de Veracruz sin un claro patrón geográfico, acercándose más al modelo de "parqueo genético caótico". Esta estructura 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.

---

**CAPITULO 2: Análisis genético utilizando secuencias de la región  
Citocromo Oxidasa I del ADN mitocondrial**

## **INTRODUCCIÓN**

### **ADN mitocondrial**

Los grandes adelantos de la biología molecular ofrecen una serie de técnicas para el examen directo de las variaciones del ADN. La reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*), la visualización en gel de los fragmentos amplificados, la utilización de enzimas de restricción y la secuenciación nos permiten realizar estudios genéticos más confiables y simplificados.

El genoma del ADN mitocondrial (ADNmt) consiste en una molécula de ADN de doble hebra circular, de cerca de 15,000 a 20,000 pb. Contiene 13 genes que codifican proteínas, 22 genes de RNAt, 2 genes de RNAr y un segmento no codificante de alrededor de 1,000 pb llamado región control que inicia la replicación y la transcripción (Taberlet, 1996). En el ADNmt, la mayoría de las diferencias en la secuencia se deben a sustituciones, más que a deleciones, lo que hace a este genoma muy estable en periodos evolutivos cortos. Esta característica favorece la utilidad del ADNmt como marcador genético para determinar la topología de filogenias y la polaridad de cambios de secuencia (Avisé, 2004). El ADNmt, además, es transmitido sin recombinación y predominantemente a través de linajes maternos. De esta manera, la molécula de ADN puede ser considerada como una sola unidad genética con muchos alelos, los cuales pueden ser utilizados para trazar filogenias maternas (Taberlet, 1996). Debido a lo anterior, los análisis con

ADNmt, han resultado ser una excelente herramienta en el análisis de la variación inter-específica, inter-poblacional y análisis filogenético de las especies (Awise et al. 2004).

### **Secuenciación**

La secuenciación es el único método que identifica las diferencias exactas en pares de bases entre individuos. Esta es una característica importante, ya que permite poca ambigüedad en los análisis. Mediante la comparación de dos secuencias podemos identificar dónde y cómo son diferentes dos regiones de ADN (Freeland, 2005), y por lo tanto inferir con mayor exactitud las relaciones genéticas. Como resultado de esto, la secuenciación nos permite en algunos casos inferir las relaciones evolutivas de los alelos alternativos. Posee la ventaja de que es posible secuenciar cualquier fragmento de ADN, de esta manera se pueden utilizar marcadores moleculares tanto nucleares, como mitocondriales.

El proceso de secuenciación se basa en la determinación de las bases nucleotídicas a lo largo de una hebra de ADN. Este método está basado en el principio de que una sola hebra de la molécula de ADN que difiera en longitud por un solo nucleótido, puede ser separado de otra. Esta separación se logra mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y/o mediante secuenciación automática a través de un capilar, por la incorporación de nucleótidos dideoxilados al final de cada hebra de distinto tamaño.

Originalmente se requerían 4 reacciones específicas para cada uno de los nucleótidos (A, C, G, T), requiriendo la adición de todos los componentes necesarios para la síntesis y marcado de la nueva hebra de ADN. Estos componentes son: 1) ADN molde; 2) Un oligonucleótido marcado con radioactividad o con un químico fluorescente; 3) ADN polimerasa; 4) Cuatro deoxi-nucleótidos y 5) Cuatro dideoxi-nucleótidos, los cuales son los encargados de detener la síntesis y permitir la generación de hebras de distinto tamaño de una misma secuencia de ADN. Por lo tanto, el resultado es un grupo de nuevas cadenas, cada una de diferente tamaño. Algunas variaciones al método han sido desarrolladas para secuenciadores automatizados, permitiendo que las cuatro reacciones se pueden llevar a cabo en el mismo tubo y separadas a través de un capilar (Avisé, 2004).

En años recientes, la información de las secuencias de ADN se ha incrementado, de tal manera que para comienzos del 2003 han sido depositados en bases de datos (Genbank) cerca de 25 millones de secuencias, representando a 115,000 taxa (Avisé, 2004). Estos datos han servido para una gran cantidad de análisis que han permitido inferir relaciones filogenéticas, evolutivas, sistemáticas y biogeográficas de diversos grupos.

Estudios previamente realizados por otros autores en moluscos bivalvos, particularmente en ostiones, han demostrado la utilidad de esta

molécula no sólo para diferenciarlos de otras especies (Huvet *et al.*, 2004; Klinbunga *et al.*, 2005; Lápegue *et al.*, 2006), sino también para realizar análisis filogeográficos (Reeb and Avise, 1990; Ó Foighil *et al.*, 1995; Wakefield and Gaffney, 1996; Hare and Avise, 1996, Milbury *et al.*, 2004, Hoover y Gaffney, 2005).

Reeb y Avise (1990) utilizaron la molécula completa de ADNmt mediante la técnica de RFLP's para realizar análisis filogeográficos en *C. virginica*, y encontraron dos ensamblajes distintos de haplotipos, uno perteneciente a las poblaciones del Atlántico, y otro a las del Golfo de México. En el mismo estudio encuentran una diversidad genética mayor en el Golfo de México, que en las poblaciones del Atlántico. La discontinuidad filogeográfica fue confirmada más tarde por estudios realizados con las secuencias de la región del gen 16S ribosomal (Ó Foighil *et al.*, 1995), con loci nucleares anónimos (Karl y Avise 1992, Hoover and Gaffney, 2005) y con análisis de ADNmt y polimorfismos nucleares de un solo nucleótido (SNP's, por sus siglas en inglés) (Gaffney, comunicación personal).

La secuencia completa del ADN mitocondrial de *C. virginica* (número de acceso GenBank AY905542) ha sido obtenida recientemente (Milbury y Gaffney, 2005) (Fig. 6), proporcionando una magnífica herramienta para análisis genéticos poblacionales y filogeográficos. En el presente estudio se utilizó la región COXI del ADNmt para realizar una evaluación de la

diversidad genética y la filogeografía de los bancos ostrícolas de *C. virginica* en la región centro-sur del Golfo de México, particularmente en el Estado de Veracruz. Nuestros estudios previos con marcadores nucleares tipo microsatélites indican la posibilidad de encontrar cierto grado de estructuración entre algunas localidades, sin embargo, la diferencia en cuanto a la naturaleza propia de marcador (menor tasa de mutación, lo que le permite una mayor estabilidad en tiempos evolutivos largos y por ser un marcador molecular de linajes maternos) podría proporcionarnos ciertas diferencias en cuanto a los modelos genéticos poblacionales.

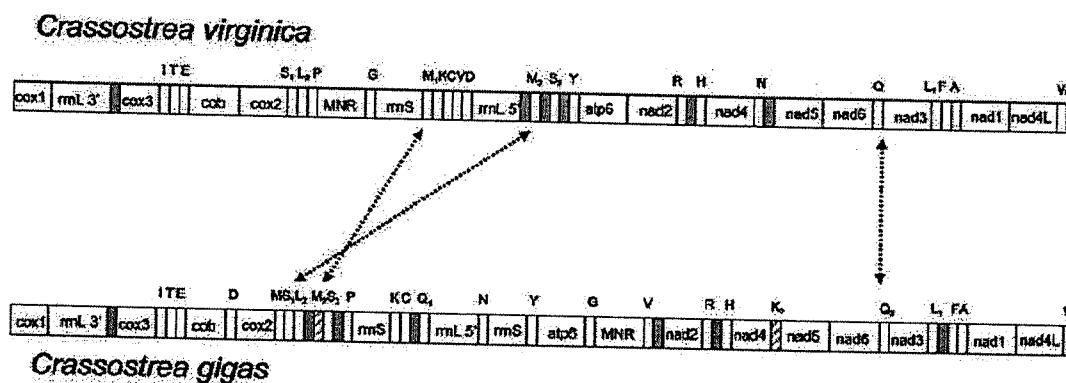


Figura 6. Estructura del gen mitocondrial en *Crassostrea virginica* y *C. gigas*, las regiones no-codificantes están sombreadas. Las flechas indican homología interespecífica en los genes *trnM* y *trnQ* (tomado de Milbury y Gaffney, 2005).

## MÉTODOS

El análisis de ADN mitocondrial en *C. virginica* se llevó a cabo utilizando las mismas muestras que en el análisis con microsatélites, (Fig. 1, capítulo I) pero se manejó un menor número de muestras por localidad (~24). Para verificar la integridad del *stock* de ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### Amplificación del fragmento Citocromo Oxidasa I (COXI)

Se amplificó el fragmento que comprende a la región del Citocromo Oxidasa I (COXI) del ADN mitocondrial de *C. virginica*, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés). Se utilizaron los cebadores (*primers*) VCOI-F y VCOI-R (Fig. 7) (diseñados por Patrick M. Gaffney, College of Marine Studies, University of Delaware, Lewes, DE 19958, USA) que amplifican un fragmento de 718 bp de COXI. El *primer* VCOI-F (forward) se une a la cadena de 5' a 3' de la posición 84 a la 107 del genoma mitocondrial de *C. virginica* (Milbury y Gaffney, 2005, número de acceso en el GenBank AY905542). El *primer* VCOI-R (*reverse*) se une a la cadena 3' a 5' y se localiza de la posición 678 a la 790.

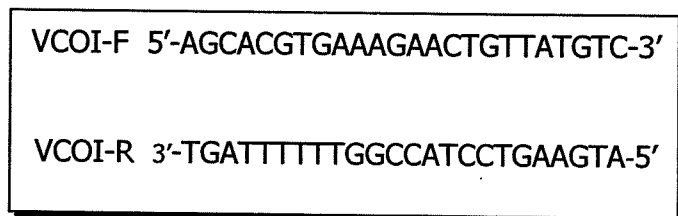


Figura 7. *Primers forward y reverse* utilizados para la amplificación del fragmento COXI en *Crassostrea virginica*.

La amplificación se realizó en un volumen de 25  $\mu$ L, conteniendo 20 ng de ADN, 0.4  $\mu$ M de cada *primer*, 4 mM de  $MgCl_2$ , 0.2 mM de cada nucleótido y 1.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), con las siguientes condiciones de amplificación: 2 min a 94° C, 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 60° C y 2 min a 72° C, con una extensión final de 4 min a 72° C. La reacción fue realizada en un termociclador ICycler de BIO-RAD. La verificación de la amplificación y concentración de los fragmentos de COXI, se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, por comparación visual con un marcador molecular de 100bp (invitrogen). Se observó una sola banda conspicua, lo cual indicó que se amplificó un solo producto de ~700 bp.

Para la secuenciación se enviaron 20  $\mu$ L de cada amplificación en tubos de 0.6 mL, junto con el *primer* VCOI-F a la compañía **Macrogen**(Korea) para su secuenciación

(<http://www.macrogen.com/eng/sequencing/extension.jsp>). Esta compañía de servicios de secuenciado utiliza un secuenciador ABI 3730XL.

## **Análisis de datos**

### ***Edición y alineación de secuencias***

Los fragmentos de COXI fueron secuenciados con el *primer* (VCOI-F) en un solo sentido (5' - 3'), debido a que en un análisis preliminar, las secuencias obtenidas contenían un bajo porcentaje de bases ambiguas (N), por lo que no fue necesario secuenciar en el otro sentido. Las secuencias fueron recibidas en archivos (.zip), como cromatogramas (archivos ABI) y archivos de texto.

Para la edición y una primera alineación de secuencias se utilizó el programa **Sequencher™ 4.5** (GeneCode, Inc.), este programa permite visualizar, editar y ensamblar secuencias a partir de cromatogramas y de archivos de texto. Las secuencias fueron ensambladas y editadas por comparación con secuencias conocidas de la región COXI de *C. virginica* (GenBank AY905542 y otras tres proporcionadas por Patrick M. Gaffney, College of Marine Studies, University of Delaware, Lewes, DE 19958, USA). Las secuencias con bases ambiguas situadas en el centro, fueron eliminadas. Aquellos sitios donde se presentó un cambio de base en alguna secuencia con respecto al resto, fueron analizados en sus cromatogramas nuevamente

para evitar errores. Finalmente, las secuencias fueron editadas a una misma longitud, eliminando las N's de los extremos (5' y 3').

El programa **MEGA 3.1** (Kumar et al., 2004) fue utilizado para alinear las secuencias. El análisis de los sitios sinónimos y no sinónimos y la identificación de los sitios variables se realizó con el programa **DnaSP** (Rozas et al. 2003).

### ***Análisis de la diversidad genética***

La variabilidad genética dentro de las poblaciones fue calculada utilizando el programa Arlequin 3.0 (Excoffier et al. 2005) a través de los siguientes estimadores:

1. ***Diversidad haplotípica (h)***, es la probabilidad de que dos haplotipos escogidos al azar en una muestra sean diferentes.
2. ***Diversidad nucleotídica (n)***, es la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos en una muestra sean diferentes.
3. ***Número medio de diferencias pareadas***, es el número medio de diferencias entre todos los pares de haplotipos en la muestra.
4. ***Número de sitios polimórficos***, es el número de loci utilizados que presentan más de un alelo por locus.

La neutralidad fue evaluada con el estadístico D de Tajima (Kimura, 1983). Este estadístico se basa en que las estimaciones del número de sitios

segregantes y el número medio de diferencias nucleotídicas están correlacionadas bajo un modelo neutral. La prueba supone que bajo el modelo del alelo infinito (sin recombinación), ambos estimadores deberían obtener el mismo valor. La existencia de una diferencia entre ambos se interpreta como una población no neutral (Excoffier *et al.*, 2005). Aunque las diferencias entre los estimadores usualmente se atribuyen a efectos de selección, también pueden deberse a efectos de cuellos de botella, poblaciones en expansión (no estacionarias) o heterogeneidad en las tasas de mutación entre sitios (Tajima, 1993).

### ***Estructura poblacional***

La estructura poblacional fue analizada utilizando el programa Arlequin 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). Para analizar la subdivisión de la población, se realizó un Análisis de Varianza Molecular de (AMOVA) jerárquico, utilizando el índice de fijación de Wright F-estadístico ( $F_{ST}$ , Wright 1965; Weir y Cockerham 1984), y su estadístico análogo  $\Phi_{ST}$  (Excoffier *et al.*, 1992). Este estadístico se diferencia de  $F_{ST}$  en que incorpora la información sobre la distancia genética entre los haplotipos (el número de sitios variables o mutaciones) y no sólo la frecuencia de éstos.

El nivel de significación de los componentes de la varianza, fue calculada utilizando 16,000 permutaciones no paramétricas bajo la hipótesis

nula de panmixia (no diferencia) (Excoffier *et al.*, 1992). Se utilizó un nivel de significación del 95%, de ésta manera, cuando  $P < 0.05$  se consideró una población estructurada (rechazando la hipótesis nula de panmixia).

Además, se hicieron pruebas de AMOVA con ambos estadísticos ( $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$ ) considerando diferentes agrupaciones entre localidades: 1) De acuerdo a las zonas geográficas (**zona norte**: Pueblo Viejo, Tamiahua; **zona centro**: Laguna Grande y la Mancha; **zona sur**: Alvarado y El Ostión); 2) Análisis genéticos previos con otros marcadores moleculares, Alocizas: a) Pueblo viejo, Tamiahua y Laguna Grande, b) La Mancha, Alvarado y El ostión) (De la Rosa-Vélez, 1986) y Microsatélites: a) Pueblo Viejo, Laguna Grande y El Ostión, b) Tamiahua, c) La Mancha, b) Alvarado (de acuerdo a los valores de  $F_{ST}$  en el capítulo 1 del presente trabajo).

### ***Análisis filogenético***

Para determinar el modelo evolutivo (modelo de substitución nucleotídica) apropiado de análisis se utilizó el programa Modeltest (Posada y Crandall 1998). En la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre los haplotipos se utilizaron dos métodos diferentes: Grupos pareados no ponderados utilizando medias aritméticas (UPGMA del inglés Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages), y el método del vecino más cercano (NJ del inglés Neighbor-Joining). Ambos métodos utilizan matrices

de distancia para generar árboles filogenéticos y fueron realizados con el programa MEGA ver. 3.0. Se utilizó como grupo externo 2 secuencias de haplotipos del Atlántico Norte (NA) y Sur (SA) (Patrick M. Gaffney, College of Marine Studies, University of Delaware, Lewes, DE 19958, USA).

Las secuencias fueron convertidas a un archivo Network.RDF utilizando la herramienta de alineamiento para proseguir con un análisis de red de unión media (MSN del inglés Median Joining Network) a partir de dicho archivo. Las genealogías genéticas intra-específicas fueron inferidas utilizando un MSN (Bandelt *et al.*, 1999) para generar un árbol de separación mínima (MST, del inglés Minimum Spanning Tree). Para este análisis se utilizó el programa Network, version 2.0. En dicho análisis todos los MSTs son combinados primero dentro de una sola red de acuerdo a un algoritmo análogo al propuesto por Excoffier y Smouse (1994). Enseguida, por medio de un criterio parsimonioso, los haplotipos intermedios inferidos fueron adicionados a la red para reducir el tamaño total del árbol.

## RESULTADOS

### Alineación y variación de secuencias

Se amplificaron un total de 150 fragmentos de la región del citocromo oxidasa I (COXI) del ADNmt de *C. virginica*. Una vez secuenciados estos fragmentos, las secuencias obtenidas se editaron eliminando las bases ambiguas (N). En total se obtuvieron 140 secuencias, las cuales fueron alineadas sin necesidad de realizar inserciones ni deleciones.

El tamaño de las secuencias fue editado a partir de la secuencia de menor longitud siendo esta de 633 pb (Fig. 8). El fragmento de COXI obtenido en este estudio se localiza entre la posición 142 y 775 del genoma mitocondrial de *C. virginica* (Milbury y Gaffney, 2005; número de acceso en el GenBank AY905542).

Con el análisis de las 140 secuencias de COXI se definieron 65 haplotipos a partir de 71 sitios polimórficos (Fig. 9), de los cuales solamente nueve tuvieron una frecuencia mayor a uno (Tabla 9). Lo que implica que un total de 56 haplotipos fueron únicos en el 40% (84 individuos).

La frecuencia relativa de los nueve haplotipos en la tabla 9 fue heterogénea: 1) Se encontraron únicamente cuatro haplotipos (H1, H8, H23

y H28) en el 6.4% (9 individuos); y 2) cinco haplotipos (H2, H10, H11, H14 y H17) en el 53.6% (75 individuos) de las 140 secuencias, de los cuales el haplotipo más frecuente fue el H2 en el 24.3% (34) de los individuos, seguido del haplotipo H10 presente en el 11.4% (16).

La traducción de las secuencias nucleotídicas a aminoácidos nos indicó que la mayor parte del polimorfismo es silente. De los 71 sitios variables, sólo uno fue una sustitución no sinónima, 25 sinónimas y 27 sitios polimórficos fueron parsimoniosamente informativos. El 84% de las substituciones fueron transiciones ( $A \leftrightarrow G$ ,  $T \leftrightarrow C$ ) y el 16% fueron transversiones ( $A \leftrightarrow T$ ,  $A \leftrightarrow C$ ,  $G \leftrightarrow T$ ,  $G \leftrightarrow C$ ).

Figura 8. Ejemplo del fragmento de región COXI del ADN mitocondrial amplificado en *C. virginica*. Dirección 5' a 3' de la muestra AL 8 (Alvarado), del haplotipo H2, el cual es el haplotipo más frecuente.

		Secuencia de la muestra AL8				
<b>1</b>	TTCGGGTTTT	GGGCAGTTTT	AGCTGGGACC	AGTTTTAGGT	CTCTTATTCG	
<b>51</b>	CTGAAGTCTT	TATACTCTCG	GCGCCAAATT	TTTAGAGCCT	GTTGTGTATA	
<b>101</b>	ACGCTGTGGT	TACGAGTCAC	GCGTTAGTAA	TGATTTTCTT	CTTTGTTATG	
<b>151</b>	CCAGTGATAA	TTGGCGGGTT	TGGTAATTGG	CTTATTCGCG	TTATACTTGA	
<b>201</b>	AGTGGCAGAC	ATGCAGTTCC	CTCGATTAAT	TGCTTTTAGA	TTCTGAGTAT	
<b>251</b>	TGCCAGGGTC	ATTGCTGCTA	ATATTGATGT	CAAATATGTC	TGAGAGAGGA	
<b>301</b>	GTTGGGTCAG	GATGAACTAT	TTACCCTCCA	CTGTCAACTT	TTTCTTACCA	
<b>351</b>	TGGAGTTTGT	ATGGATTTTG	CCATTTTAAG	GTTACACTTA	GCAGGTATTA	
<b>401</b>	GGTCTATTTT	CAGGTCTATT	AATTTTATAG	TAACCATTAG	AAACATGCCA	
<b>451</b>	TCTGTTGGAG	GCCACATATT	AGCACTTTTC	CCCTGGTCAA	TTAAAGTGAC	
<b>501</b>	ATCATTCTCG	CTGCTTACCA	CGCTACCTGT	TCTAGCTGGC	GGGCTTACTA	
<b>551</b>	TGCTCCTTAC	TGATCGACAT	TTCAATACAT	CGTTTTTTGA	CCCTGTAGGT	
<b>601</b>	GGTGGTGACC	CAGTGCTATT	CCAGCACTTA	TTT		

Tabla 9. Haplotipos compartidos (*h*) y sus frecuencias relativas por localidad. En la última columna se presentan las frecuencias totales de cada haplotipo. El número de individuos por localidad se presenta al inicio de cada columna (N), las frecuencias se muestran en paréntesis (%), y el número de individuos por haplotipos se encuentra a la izquierda de cada paréntesis. Los haplotipos únicos no se presentan en la tabla.

<i>h</i>	Pueblo Viejo	Tamiahua	Laguna Grande	La Mancha	Alvarado	El Ostión	Total
	N=23 (%)	N=24 (%)	N=23 (%)	N=26 (%)	N=25 (%)	N=21 (%)	N= 140 (%)
<b>H1</b>	1(4.35)	0	0	1(3.85)	0	0	2 (1.4)
<b>H2</b>	8(34.80)	6(25)	5(21.70)	5(23.10)	4(16)	5(23.80)	34 (24.3)
<b>H8</b>	1(4.35)	1(4.17)	0	1(3.85)	0	0	3 (2.3)
<b>H10</b>	2(8.70)	4(16.70)	2(8.70)	2(7.69)	4(16)	2(9.52)	16 (11.4)
<b>H11</b>	1(4.35)	0	8.70	0	8	9.52	7 (5)
<b>H14</b>	1(4.35)	0	0	2(7.69)	1(4)	3(14.30)	7 (5)
<b>H17</b>	0	4(16.70)	3(13.00)	2(7.69)	0	2(9.52)	11 (7.8)
<b>H23</b>	0	1(4.17)	0	0	4(16)	0	2 (1.4)
<b>H28</b>	0	0	1(4.35)	1(3.85)	0	0	2 (1.4)

Figura 9. Alineamiento de posiciones variables en los 65 haplotipos de las secuencias de COI en *Crassostrea virginica*. Los puntos indican identidad con el Haplotipo I.

HAPLOTIPO	POSICIÓN DEL SITIO VARIABLE
	000000000011111122222222222233333333333333334444444444444444555555556666666666
	00346677791578991334556666701233445558990222234556788923357788000011122
	36653625894679580149022478468701281472032368954695103521250628036926814
H1	CGTTTTCCATGGTGATCTTATGTGGCCGTTACTCTATTAAGTTTACCTACACCAGTCCTTGTTCACAGC
H2	.....T.....
H3	.A...T.A.....T..G..C.....T.....
H4	.A.C.....C.....TA.GT.....CC.....T...
H5	.A.....T.....A
H6	.....T.....G.....
H7	.A.CC...C.C.....T..GT..C.....CC.....
H8	.A.C.....C.....TA.GT.....T..T..CC.....
H9	.C.....T.....T.....
H10	.A.....T..G.....
H11	.A.C.....C.....C.T..GT.....CC.....
H12	.....T.....T.....
H13	.....T.....T.....C.....
H14	.A.C.....C.....TA.GT.....CC.....
H15	.A.C.....C.....T..G.....C.....
H16	.A.....T..G..A..A..T.....
H17	.A.C...C.C.....T.GT.....T..CC.....
H18	.A.C...C.C.....T.GT...C.....T..CC.....
H19	.....A..T.....
H20	.....T.....G.....
H21	.A.C.....C.....C..T..G.....A..TCC.....
H22	.A.....G.....C.....
H23	.A.C.....C.....T..G.....TCC.....
H24	.....T.....G.....T.....
H25	.A.C.....C.....TA.GT.....T..T..T..CC.....
H26	.A.C.....C.....T..GT.....G..CC.....
H27	.A.....G.....T.....
H28	.A.....G.....T..G.....
H29	.A.....T..G.....A.....
H30	.....T..C.....G.....G..A.....
H31	.....T.....C.....
H32	.....T.....T.....
H33	.A.....T..G.....G.....T.....
H34	.A.C...C.C.....T..GT.....T..G..CC.....
H35	.....T.....C.....
H36	.A.C.....C.C.....T.GT.....CC..C.....
H37	.A.....T..G.....C.....
H38	.....TT.....
H39	.....T.....T.....
H40	.A...T.A.....T..G..C.....
H41	.A.....T.C.G.....
H42	.....A..T.....
H43	.....C..T.....
H44	.A.C.....C..C.....T..G.....G.....TC.....
H45	.A.C.....C.....C..T..G.....TCC.....
H46	.....T.....T.....
H47	.A.C.....C.G.....T..GT.....CC.....
H48	.C.....T.....C.....
H49	.....T.....A.....
H50	.A.C...C.C.....T.GT.....T..CC.....G.....
H51	.....G.....T.....C.....
H52	.....T..G.....
H53	.A.....A..T..G.....
H54	.A.C.....C.....C.T..G.....CC.....
H55	.A.C.....C.....C.T..GT.....T..CC.....
H56	.....T.....C.....T.....
H57	.....T.....T.....
H58	T...T.....A..T.....
H59	.....T.....C.....
H60	.A.....T..G.....C.....C.....
H61	.....C.....T..C.....
H62	.....T.....G.....
H63	.A.....T..G.....T.....
H64	.A.....T..G.....T.....
H65	.....G.....T.....

## Diversidad Genética y Neutralidad

La diversidad genética que se obtuvo a partir del análisis de las secuencias fue alta. La diversidad haplotípica ( $h$ ) total (promedio) reveló un valor de 0.9194 ( $\pm$  0.0162) y fue similar entre todas las poblaciones (Tabla 10). Este valor indica que existe una alta probabilidad (91.94 %, valor  $h$  en porcentaje) de que dos organismos de la muestra (65 haplotipos) sean diferentes.

El valor más alto 0.9567 ( $\pm$  0.0267) corresponde a la laguna de Alvarado, mientras que el valor más bajo 0.8854 ( $\pm$  0.0624) pertenece a la laguna de Tamiahua (Tabla 10).

La diversidad nucleotídica ( $n$ ) presentó un valor total de 0.00818 ( $\pm$  0.0044) y al igual que la diversidad haplotípica, mostró valores similares entre todas las poblaciones (Tabla 10). Sin embargo, a diferencia de  $h$ , el valor más alto 0.00899 ( $\pm$  0.0050) corresponde a la laguna de Tamiahua, mientras que el valor más bajo 0.007743 ( $\pm$  0.04360) corresponde a la laguna de Pueblo Viejo (Tabla 10).

El valor promedio de diferencias entre todos los pares de haplotipos (promedio de diferencias pareadas) fue de 5.18 ( $\pm$  2.521) (Tabla 3). El valor más alto 5.6957 ( $\pm$  2.828) corresponde a la laguna de Tamiahua y el valor

más bajo  $4.9012 (\pm 2.478)$  a la laguna de Pueblo Viejo (Tabla 10). El análisis de la prueba de neutralidad (D de Tajima) dio como resultado valores negativos en todas las lagunas, pero estos no fueron estadísticamente significantes ( $P > 0.05$ ) (Tabla 10) por lo que no se rechaza la neutralidad. En cambio cuando se analizó el **total** de la muestra, la prueba D de Tajima fue significativa (Tabla 10) por lo que en este caso sí se rechazó la hipótesis nula de neutralidad.

Tabla 10. Índices de diversidad genética y su desviación estándar ( $\pm S^2$ ). Número de haplotipos, sitios polimórficos y prueba de neutralidad de Tajima (D de Tajima) de *Crassostrea virginica* en seis localidades de Veracruz, México. El orden de las localidades corresponde a su ubicación geográfica.

Laguna	n	n <sub>H</sub>	Diversidad Haplotípica ( <i>h</i> )	Diversidad Nucleotídica ( $\pi$ )	Promedio de Diferencias Pareadas	Num. de Sitios Polimórficos	D de Tajima
<b>Pueblo Viejo</b>	23	15	0.8854 ( $\pm$ 0.062)	0.0077 ( $\pm$ 0.004)	4.9012 ( $\pm$ 2.478)	27	-1.2458 (P=0.110)
<b>Tamiahua</b>	24	13	0.9022 ( $\pm$ 0.039)	0.0089 ( $\pm$ 0.005)	5.6956 ( $\pm$ 2.828)	24	-0.4217 (P=0.357)
<b>Laguna Grande</b>	22	14	0.9351 ( $\pm$ 0.036)	0.0085 ( $\pm$ 0.005)	5.3809 ( $\pm$ 2.697)	23	-0.5538 (P=0.311)
<b>La Mancha</b>	26	18	0.9446 ( $\pm$ 0.034)	0.0083 ( $\pm$ 0.005)	5.2462 ( $\pm$ 2.621)	29	-1.1464 (P=0.1323)
<b>Alvarado</b>	25	18	0.9567 ( $\pm$ 0.027)	0.0082 ( $\pm$ 0.004)	5.1733 ( $\pm$ 2.592)	28	-1.1250 (P=0.1377)
<b>El Ostión</b>	20	11	0.9158 ( $\pm$ 0.041)	0.0078 ( $\pm$ 0.004)	5.0421 ( $\pm$ 2.555)	19	-0.2213 (P=0.432)
<b>TOTAL</b>	140	65	0.9194 ( $\pm$ 0.016)	0.0082 ( $\pm$ 0.004)	5.1763 ( $\pm$ 2.521)	71	<b>-1.8774 (P=0.017)</b>

Los valores en negritas son significativamente diferentes de cero ( $P < 0.05$ )

## Estructura Poblacional

La prueba exacta de diferenciación entre poblaciones (análoga a la prueba exacta de Fisher) (Raymond and Rousset, 1995), no dio resultados significantes. Por lo que no se rechaza la hipótesis nula de distribución al azar de los individuos entre todos los pares de poblaciones (lagunas).

Los valores de  $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$  de las lagunas no fueron significantes en ninguna de las comparaciones pareadas (Tabla 11). El índice de fijación  $F_{ST}$  presentó el valor más alto entre las lagunas de Pueblo Viejo y Alvarado ( $F_{ST}= 0.00439$ ), mientras que el valor más bajo corresponde a Pueblo Viejo y la Mancha ( $F_{ST}= -0.00119$ ) (Tabla 11). El índice de fijación  $\Phi_{ST}$  presentó el valor más alto entre las lagunas de Pueblo Viejo y Tamiahua ( $\Phi_{ST}= 0.01641$ ) y el valor más bajo entre Tamiahua y Alvarado ( $\Phi_{ST}= -0.00259$ ) (Tabla 11).

Tabla 11. Distancias genéticas pareadas entre las lagunas. En el cuadro superior se muestran los valores de  $\Phi_{ST}$ , y en el cuadro inferior los valores de  $F_{ST}$ . El orden de las lagunas corresponde a su distribución geográfica de norte a sur. Ningún valor fue significativo ( $P>0.05$ ).

	Pueblo Viejo	Tamiahua	Lag. Grande	La Mancha	Alvarado	El Ostión
<b>Pueblo Viejo</b>	•	0.01641	-0.02239	-0.00121	-0.01459	-0.00827
<b>Tamiahua</b>	0.00329	•	-0.01531	-0.02757	-0.00259	-0.02345
<b>Lag. Grande</b>	-0.00968	-0.00917	•	-0.02053	-0.02091	-0.02584
<b>La Mancha</b>	-0.00119	-0.01465	-0.01244	•	-0.02046	-0.03302
<b>Alvarado</b>	0.00439	0.00236	-0.00310	-0.00436	•	-0.02739
<b>El Ostión</b>	-0.00785	-0.00526	-0.01634	-0.01547	-0.00691	•

El resultado del análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) en las lagunas estudiadas no fue estadísticamente significativo (16,000 permutaciones al azar) para ninguno de los dos índices ( $F_{ST} = -0.00618$ ,  $P = 0.8061$ ;  $\Phi_{ST} = -0.01608$ ,  $P = 0.8922$ ), por lo que en este caso no se rechaza la hipótesis nula de panmixia. Los resultados del AMOVA atribuyen alrededor del 100 % ( $F_{ST} = 100.62$ ;  $\Phi_{ST} = 101.61$ ) del total de la varianza molecular a la variación de los haplotipos dentro de las lagunas (Tabla 12 y 13); y sólo menos del 2% del total de la varianza molecular a la variación de los haplotipos entre las lagunas.

Tabla 12. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación de Wright ( $F_{ST}$ ) para todas las lagunas analizadas en este estudio.  
Índice de fijación  $F_{ST} = -0.00618$   $P = 0.79996+-0.00323$

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre lagunas	5	1.980	-0.00284	-0.62
Dentro de lagunas	134	61.920	0.46209	100.62
<b>Total</b>	139	63.900	0.45925	

Tabla 13. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación  $\Phi$  estadístico ( $\Phi_{ST}$ ) para todas las lagunas analizadas en este estudio.  
Índice de fijación  $F_{ST} = -0.01608$   $P = 0.89458+-0.00220$

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre lagunas	5	8.280	0.04150	1.61
Dentro de lagunas	134	351.470	2.62291	101.61
<b>Total</b>	139	359.750	2.58141	

Las agrupaciones realizadas de acuerdo a las zonas geográficas y/o análisis genéticos previos con otros marcadores moleculares y analizados con el AMOVA para ambos índices ( $F_{ST}$  y  $\phi_{ST}$ ) no fueron estadísticamente significativas en ninguna de ellas (Tablas 14, 15, 16, 17, 18 y 19).

Tabla 14. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación de Wright ( $F_{ST}$ ) entre grupos formados de acuerdo a las zonas geográficas (ver texto en métodos).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	0.768	-0.00041	-0.09
Entre lagunas dentro de grupos	3	1.212	-0.00251	-0.55
Dentro de lagunas	134	61.920	0.46209	100.64
<b>Total</b>	139	63.900	0.45917	

Índices de fijación:

$$F_{SC} = -0.00546 \quad P = 0.80771 \pm 0.00330$$

$$F_{ST} = -0.00636 \quad P = 0.70622 \pm 0.00393$$

$$F_{CT} = -0.00089 \quad P = 0.72772 \pm 0.00341$$

Tabla 15. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación  $\Phi$  estadístico ( $\Phi_{ST}$ ) entre grupos formados según zonas geográficas (ver texto en métodos)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	2.163	-0.02036	-0.79
Entre lagunas dentro de grupos	3	6.117	-0.02519	-0.98
Dentro de lagunas	134	351.470	2.62291	101.77
<b>Total</b>	139	359.750	2.57736	

Índices de fijación:

$$F_{SC} = -0.00970 \quad P = 0.89326 \pm 0.00235$$

$$F_{ST} = -0.01767 \quad P = 0.62673 \pm 0.00357$$

$$F_{CT} = -0.00790 \quad P = 0.86527 \pm 0.00288$$

Tabla 16. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación de Wright ( $F_{ST}$ ) entre grupos formados según análisis con alozimas (ver texto en métodos).

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	0.390	-0.00010	-0.02
Entre lagunas dentro de grupos	4	1.590	-0.00278	-0.61
Dentro de lagunas	134	61.920	0.46209	100.63
<b>Total</b>	139	63.900	0.45921	

Índices de fijación:

$$F_{SC} = -0.00606 \quad P = 0.80609 \quad \pm -0.00294$$

$$F_{ST} = -0.00628 \quad P = 0.77559 \quad \pm -0.00351$$

$$F_{CT} = -0.00022 \quad P = 0.52937 \quad \pm -0.00335$$

Tabla 17. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación  $\Phi$  estadístico ( $\Phi_{ST}$ ) entre grupos formados según análisis con alozimas (ver

Fuente variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	1.041	-0.01216	-0.47
Entre lagunas dentro de grupos	4	7.239	-0.03498	-1.36
Dentro de lagunas	134	351.470	2.62291	101.83
<b>Total</b>	139	359.750	2.57577	

texto en métodos).

Índices de fijación:

$$F_{SC} = -0.01352 \quad P = 0.89195 \quad \pm -0.00234$$

$$F_{ST} = -0.01830 \quad P = 0.77928 \quad \pm -0.00304$$

$$F_{CT} = -0.00472 \quad P = 0.86764 \quad \pm -0.00252$$

Tabla 18. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación de Wright ( $F_{ST}$ ) entre grupos formados según análisis genéticos con microsatélites (ver texto en métodos).

Fuente variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	3	1.222	0.00121	0.26
Entre lagunas dentro de grupos	2	0.758	-0.00384	-0.84
Dentro de lagunas	134	61.920	0.46209	100.57
<b>Total</b>	139	63.900	0.45946	

Índices de fijación:

$$F_{SC} = -0.00838 \quad P = 0.80115 \pm 0.00337$$

$$F_{ST} = -0.00572 \quad P = 0.69954 \pm 0.00382$$

$$F_{CT} = 0.00264 \quad P = 0.29696 \pm 0.00352$$

Tabla 19. Análisis de varianza molecular jerárquico (AMOVA) por medio del índice de fijación  $\Phi$  estadístico ( $\Phi_{ST}$ ) entre grupos formados según análisis genéticos con

Fuente variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	3	4.639	-0.00531	-0.21
Entre lagunas dentro de grupos	2	3.641	-0.03710	-0.61
Dentro de lagunas	134	351.470	2.62291	101.64
<b>Total</b>	139	359.750	2.58050	

microsatélites (ver texto en métodos).

Índices de fijación:

$$F_{SC} = -0.00606 \quad P = 0.80609 \pm 0.00294$$

$$F_{ST} = -0.00628 \quad P = 0.77559 \pm 0.00351$$

$$F_{CT} = -0.00022 \quad P = 0.52937 \pm 0.00335$$

## **Análisis Filogenético**

Los árboles filogenéticos basados en el análisis de UPGMA y NJ son congruentes entre ellos y presentan la misma topología. La topología del árbol consenso construido a través del método NJ presenta valores bajos en los nodos de re-muestreo. Se observan dos clados principales (Fig. 10), sin embargo, ninguno de estos clados corresponde con el origen geográfico de las muestras. Es decir, ninguno de los dos métodos (UPGMA y NJ) da como resultado una diferenciación geográfica entre las lagunas.

El clado A presenta en su línea basal a los haplotipos H58, H60, H49 y H30, mientras que el clado B presenta en su línea basal a los haplotipos H15 y H44 (Fig. 10). Las líneas basales en los árboles filogenéticos generalmente representan a los haplotipos más ancestrales.

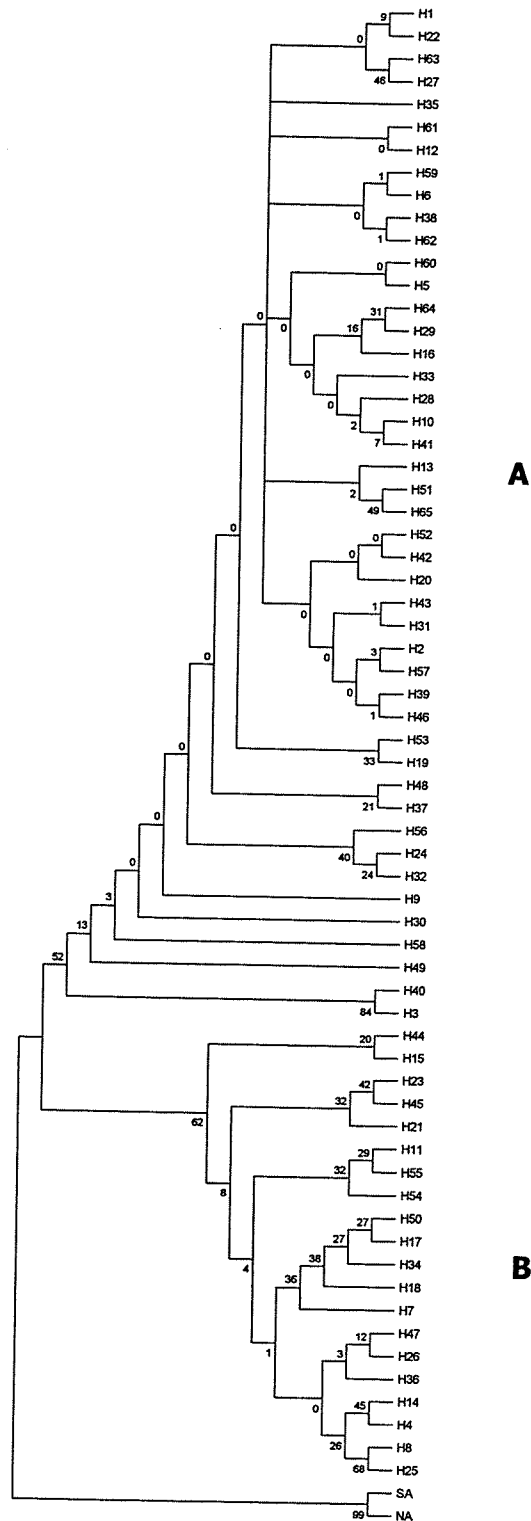


Figura 10. Relación genética entre 56 haplotipos de *Crassostrea virginica*. La distancia genética se calculó a partir del método de Kimura 2 parámetros, entre todos los pares de haplotipos. Los valores de remuestreo se obtuvieron a partir de 1,000 réplicas y son reportados en los nodos. Las secuencias del grupo externo (SA y NA) pertenecen a haplotipos del Atlántico.

## Filogeografía

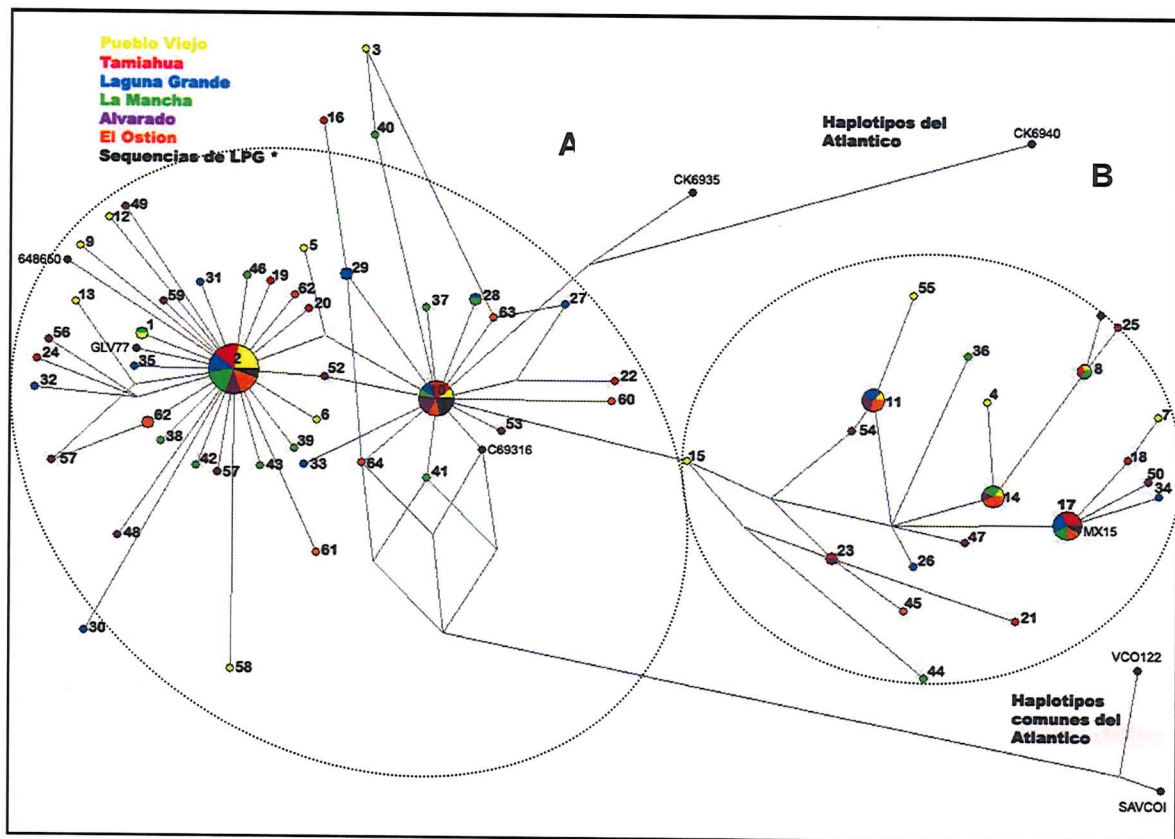
Con base en la red de mínima separación (MS; Minimum Spanning) se analizaron las relaciones entre los 65 haplotipos (Fig. 11). Esta red representa los haplotipos en forma de círculo, los cuales varían de tamaño según su frecuencia. Así, se puede observar que los haplotipos con frecuencias de más de tres organismos son H2, H10, H11, H14, y H17 (Fig. 11). Los haplotipos más frecuentes son H2 el cual está presente en casi el 25% de los organismos analizados, y H10 en aproximadamente el 12% (Tabla 9, Fig. 11).

Los haplotipos H2 y H10 parecen formar un grupo aparte, estructurado con haplotipos únicos situados en la periferia, cuyas diferencias se encuentran dadas por una a tres mutaciones (Fig. 11). Únicamente tres haplotipos (H29, H63 y H15) conforman los haplotipos basales para supuestos linajes a partir del haplotipo H10 (Fig. 11).

Los linajes de los haplotipos H29 y H63 que tienen diferencias de una sola mutación con respecto a H10, se encuentran compuestos por únicamente un haplotipo cada uno (Fig. 11). El linaje del haplotipo H15 que tiene diferencias de hasta seis mutaciones con respecto a H10, se encuentra compuesto por 19 haplotipos (Fig. 11).

Los haplotipos adyacentes a los linajes difieren por tres mutaciones, la excepción es el H36, que difiere de H15 por cuatro mutaciones. El linaje H15 parece separarse en un segundo grupo junto con los 19 haplotipos, incluyendo a los haplotipos H11, H4 y H17 que se encuentran presentes con una frecuencia del 5 % los dos primeros y del 7.5% el último en la muestra total. El resto de los haplotipos son haplotipos únicos o tienen frecuencias muy bajas de 1.4 al 3.2 %.

Los haplotipos no tienen un patrón geográfico con respecto al origen de las muestras, en la Figura 11 los colores representan al lugar de recolecta de cada laguna. Se puede observar la presencia de los haplotipos distribuidos en todos los sitios sin una separación según linajes ni grupos de haplotipos. Los haplotipos más frecuentes se encuentran distribuidos en todas las lagunas. Las secuencias de los haplotipos del Atlántico Norte presentan diferencias de 10 y 11 mutaciones con respecto a las muestras del Golfo de México. Las secuencias pertenecientes a la región del Golfo Norte (E.U.), se encuentran incluidas dentro de los haplotipos del Golfo de México determinados en el presente trabajo. Es interesante hacer notar, que en la comparación con las secuencias externas (Golfo Norte), la secuencia del haplotipo más común en el Golfo Norte (GC-1), es también el haplotipo más común en nuestro análisis (H2), mientras que la secuencia del haplotipo menos común (GC-2), es en nuestro análisis el segundo haplotipo más común (H10) (*Anexo VI*).



**Figura 11.** Red de la mínima separación de los 65 haplotipos de ADNmt de la muestra de *C. virginica*, definidos en la tabla 1. Cada haplotipo es representado por un círculo y el diámetro es proporcional a su frecuencia. Los círculos más pequeños tienen un sólo individuo. Los círculos con líneas punteadas representan a los clados. Las ramas entre los haplotipos son proporcionales al número de mutaciones entre haplotipos. Los colores indican el lugar de recolecta de la muestra y la correspondencia entre ellos es mostrada en la Figura. El color negro representa secuencias de organismos recolectados en zonas geográficas en el Golfo de México y en el Atlántico (E.U., con excepción de la secuencia MX15 de Tabasco, México), obtenidas en el Laboratorio del Dr. Patrick M. Gaffney<sup>1</sup> (LPG en la Figura). Para referencia de las secuencias y su origen, ver *Anexo VII*.

<sup>1</sup> Patrick M. Gaffney, College of Marine Studies, University of Delaware, Lewes, DE 19958, USA

## DISCUSION

---

A pesar de que la especie *C. virginica* ha sido ampliamente estudiada a través de análisis genéticos, las poblaciones que habitan las costas del Golfo de México (en particular la región centro-sur) han sido poco monitoreadas. No existe ningún estudio genético-poblacional realizado con marcadores moleculares tipo ADN mitocondrial, que nos sirva para evaluar la variabilidad haplotípica de estas poblaciones.

La importancia de estudios comparativos y complementarios con diferentes tipos de marcadores moleculares: ADN nuclear y ADN mitocondrial, ha sido fuertemente documentada a través de una gran cantidad de trabajos científicos y radica en las diferencias en las tasas mutacionales y tipos de herencia (algunos ejemplos: De Innocentis *et al.*, 2001; Hansen *et al.*, 1999; Poteaux *et al.*, 2001; Krafur, 2002).

### **Diversidad Genética y Neutralidad**

La diversidad genética en la región COXI de las poblaciones del Golfo de México (GM) fue alta, como puede observarse en las diferencias encontradas en el número de haplotipos (65) y en las diversidades genéticas de los fragmentos analizados (71 sitios polimórficos). En un estudio anterior, Reeb y Avise (1990) realizaron un análisis con RFLP's utilizando a la

molécula completa de ADNmt, y encontraron un total de 82 haplotipos en organismos del Atlántico Norte (AN) y del GM (región norte, de Brosville, Texas a Miami, Florida). En el mismo estudio encontraron 63 fragmentos de restricción, los cuáles indican sitios polimórficos. Ambos resultados demuestran que las poblaciones de *Crassotrea virginica* a lo largo de su distribución, mantienen una diversidad genética alta.

Estos datos si bien coinciden en denotar una variabilidad genética alta, hay que compararlos con cautela debido a las siguientes condiciones: 1) la técnica utilizada (RFLP's no permite analizar todo el polimorfismo nucleotídico, ya que éste depende de las enzimas utilizadas en el análisis), 2) la o las regiones utilizadas en la molécula (se ha observado variación en la tasa de mutación dependiendo de la región analizada en el ADNmt (Freeland, 2005), y 3) el número de muestras, la extensión y localización geográfica de los organismos (212 especímenes localizados en la región Norte del GM y AN, en Reeb y Avise, 1990; y 120 localizados en la región centro-sur del GM en el presente trabajo). No obstante, estos datos en conjunto nos permiten visualizar un panorama general sobre la variabilidad de haplotipos presentes a lo largo de todo el rango de distribución de *C. virginica*.

De igual manera, la diversidad haplotípica (0.9194) y nucleotídica (0.0018) encontradas en este trabajo es alta a pesar del tamaño de muestra relativamente pequeño que se manejó (N= 140). Esta diversidad genética

se debió a 56 haplotipos únicos (un sólo individuo por haplotipo), cuatro haplotipos presentes en dos o tres individuos solamente y cinco haplotipos frecuentes en la población (75 individuos).

Lo anterior podría estar indicando una elevada tasa de mutación para la región COXI en las poblaciones de la especie estudiada, o bien eventos de expansión que estén dando como resultado haplotipos que no han tenido tiempo suficiente para fijarse en la población. La prueba de neutralidad de la población total utilizando el estadístico D de Tajima proporciona resultados estadísticamente significantes. En esta prueba, diferencias significativas entre los estimadores del estadístico (D de Tajima) usualmente se atribuyen a efectos de selección, sin embargo, también pueden deberse a efectos de cuellos de botella, poblaciones en expansión, o heterogeneidad en las tasas de mutación entre sitios (Tajima, 1993). Los resultados del análisis con la D de Tajima, nos muestran valores negativos, los cuales son traducidos como un exceso de variantes en baja frecuencia, pudiendo esta baja frecuencia de nuevas mutaciones, ser un indicador de expansión en la población.

Por otro lado, la similitud entre los valores de diversidad genética (haplotípica, nucleotídica y número de haplotipos) puede indicarnos que es probable que las reducciones poblacionales ocurridas en algunas de las

lagunas como Tamiahua y El Ostión<sup>9</sup> no hayan afectado los niveles de diversidad en los bancos de ostiones. Al contrario, los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica indican una alta diversidad genética dentro de cada laguna. Reeb y Avise (1990) encontraron una diversidad genética alta a través de análisis de ADNmt en *C. virginica*, siendo mayor en el Golfo de México (0.80), que en el Atlántico (0.57).

### **Estructura Genética Poblacional y Análisis Filogeográfico**

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, no existe una estructura genética en *C. virginica* en las lagunas del Estado de Veracruz. Los resultados no significantes en la prueba exacta de Fisher nos indican que existe una distribución al azar de los individuos entre todos los pares de lagunas. De la misma manera, los valores de los índices de fijación ( $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$ ) no fueron significantes en ninguna de las comparaciones pareadas entre lagunas, lo que nos revela que no existen diferencias significativas entre ninguna de las lagunas analizadas (tabla 4).

Lo anterior fue confirmado por el análisis de AMOVA, el cual no fue estadísticamente significativo para ninguno de los dos índices ( $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$ ): los resultados indican que el 100 % de la varianza molecular se debe a la variación de los haplotipos dentro las lagunas, y sólo un 2% de esta

---

<sup>9</sup> Horacio Cruz Lugo. Dirección de Acuicultura. SAGARPA, Delegación Veracruz. Comunicación personal.

variación se encuentra entre las lagunas y no es significativa. Por lo que, el análisis de estructura genética poblacional con COXI demuestra que existe una población panmíctica en la región centro-sur del Golfo de México. El ciclo de vida de *C. virginica*, en el cual manifiestan una etapa larval planctónica de hasta tres semanas (Kennedy, 1996), aunado a las corrientes costeras del Golfo de México, las cuales son estacionales y en ambos sentidos norte-sur (Zavala-Hidalgo *et al.* 2003), pueden permitir el flujo genético entre las lagunas cercanas y generar un estado de panmixia. Sin embargo, es necesaria la combinación de análisis con el otro marcador molecular nuclear (microsatélite), más polimórfico con el que podamos realizar un análisis integrativo.

Los linajes mitocondriales encontrados con los análisis de árboles filogenéticos no son muy claros, pero muestran dos clados distintos de haplotipos, sin ninguna relación geográfica en cuanto a su distribución (fig 2). Sin embargo, se ha observado que a pesar de que estos árboles filogenéticos han sido de gran ayuda en estudios taxonómicos a nivel de especie y en niveles más altos, los cuales ha experimentado un periodo de aislamiento reproductivo suficiente para permitir la fijación de diferentes alelos; un árbol filogenético jerárquico no siempre será el más adecuado para estudios a nivel poblacional (Freeland, 2005). No obstante, puede ayudar a proporcionarnos un panorama general de la agrupación haplotípica presente en las poblaciones. El análisis realizado a través de la red de

mínima separación (MS; Minimum Spanning) nos muestra un panorama más adecuado de las relaciones filogenéticas y filogeográficas de los haplotipos de *C. virginica* dentro del Golfo de México.

MS demuestra que no existe ninguna relación geográfica que delimite la distribución de haplotipos, los dos haplotipos más frecuentes H2 y H10 se encuentran presentes en todas las lagunas y están presentes en el 36% de todos los organismos. Los otros tres haplotipos que representan al 17.8% de los organismos (H11, H14 y H17), también se encuentran distribuidos en toda la población.

Por otra parte, el MS muestra dos haplogrupos sin ninguna relación geográfica, a) representado por los haplotipos H2 y H10, estructurado con haplotipos únicos en la periferia y, b) representado por los haplotipos H11, H14 y H17 también estructurados con haplotipos con menor frecuencia en la periferia. Siguiendo algunos principios de la teoría de coalescencia, existen algunas predicciones que podemos realizar en cuanto al MS: a) Los haplotipos más frecuentes suelen ser los más antiguos; b) dentro de la red, los haplotipos viejos, se encuentran en el interior, mientras que los nuevos suelen encontrarse en la periferia, c) Los haplotipos con conexiones múltiples suelen ser los más antiguos (Freeland, 2005).

De acuerdo a lo anterior, los haplotipos H2 y H10, cumplen con estas condiciones, son los más frecuentes, se encuentran en el interior de la red y tienen un gran número de conexiones con otros haplotipos. El haplotipo H10 no obstante, parece ser el más antiguo, dado que se encuentra relacionado con los haplotipos del Atlántico, los cuales se separan de los haplotipos del Golfo de México por 10 y 11 mutaciones. De la misma forma, es el que se encuentra directamente relacionado con el haplotipo H15, el cual pertenece al segundo haplogrupo, diferenciado del haplotipo H10 por sólo tres mutaciones.

Por otro lado, nuestros resultados indican un periodo histórico de una rápida expansión poblacional, la cual puede afectar la diversidad genética de la especie y también las relaciones entre los haplotipos. La separación de los linajes mitocondriales del Golfo de México *vs* Atlántico, ha sido estimada en alrededor de 1.2 millones de años (Reeb y Avise, 1990). En una población en expansión rápida, la clasificación de linajes (la pérdida estocástica de haplotipos y linajes) es más lenta, así que más haplotipos y linajes son producidos por mutación que los que son removidos por deriva genética (Avise *et al.* 1984, 1987a), incrementando de este modo la diversidad genética. Una consecuencia de una población en expansión es que muchos de los haplotipos resultantes se encuentran estrechamente relacionados, y algunos haplotipos pueden tener altas frecuencias (McMillen A.L. y Bert T.M. 2004). Este fue el modelo general que nosotros observamos en los

haplotipos de *C. virginica* y que es confirmado por los resultados significativamente negativos que encontramos con la prueba estadística D de Tajima. No obstante, hacen falta más estudios genéticos con un mayor número de muestras y zonas geográficas dentro del Golfo, así como análisis estadísticos que demuestren o apoyen esta hipótesis.

## CONCLUSIONES

---

- La diversidad genética en la región COXI del ADNmt de *Crassostrea virginica* en el Golfo de México (GM) fue alta, como puede observarse en el número de haplotipos (65), y en la diversidad haplotípica (0.9194) y nucleotídica (0.0018) encontrada.
- Los índices de diversidad haplotípica (0.8854 a 0.9567) y nucleotídica (0.0077 a 0.0089) son similares entre las localidades (lagunas) e indican una alta diversidad genética dentro de cada laguna.
- Los resultados del análisis con la D de Tajima (tabla 3), nos muestran valores negativos, los cuales son traducidos como un exceso de variantes en baja frecuencia, pudiendo esta baja frecuencia de mutaciones nuevas, ser un indicador de expansión en la población.
- El análisis de estructura genética poblacional con COXI demuestra que existe una población panmíctica en la región centro-sur del Golfo de México, como lo demuestran los valores de los índices de fijación ( $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$ ) que no fueron significantes en ninguna de las comparaciones pareadas entre lagunas, lo que fue confirmado por el análisis de AMOVA, el cual no fue estadísticamente significativo para ninguno de los dos índices ( $F_{ST}$  y  $\Phi_{ST}$ ).

- La red de Mínima Separación (MS) demuestra que no existe ninguna relación geográfica que delimite la distribución de haplotipos, los dos haplotipos más frecuentes H2 y H10 se encuentran presentes en todas las lagunas y están presentes en el 35.7% de todos los organismos.
- Los haplotipos H2 y H10, son los más frecuentes, se encuentran en el interior de la red y tienen un gran número de conexiones con otros haplotipos.
- El haplotipo H10 no obstante, parece ser el más antiguo, dado que se encuentra relacionado con los haplotipos del Atlántico, los cuales se separan de los haplotipos del Golfo de México por 10 y 11 mutaciones.

## DISCUSIÓN GENERAL

---

Estudios genéticos previos (Reeb y Avise, 1990) con ADNmt, demuestran la existencia de dos clados genéticamente diferenciados entre las poblaciones del Atlántico Norte y del Golfo de México Norte, separados hace aproximadamente 1.2 millones de años por una divergencia en las secuencias de 2.5%. Estudios posteriores con marcadores nucleares, han apoyado esta diferenciación genética (Karl y Avise 1992; Hare y Avise, 1998; Hoover y Gaffney 2005). Esta divergencia ha sido documentada como el resultado de una barrera zoogeográfica, en la península de Florida (EU), la cual también ha originado divergencia genética en otros organismos marinos (Saunders *et al.*, 1986; Avise *et al.*, 1987). La concordancia geográfica en la divergencia del ADNmt en estas especies, sugiere un grupo común de factores históricos que iniciaron la divergencia y las restricciones similares de flujo genético (Reeb y Avise, 1990).

Dentro del Golfo de México aparentemente no existen barreras geográficas y oceanográficas. De acuerdo a nuestro análisis con el marcador mitocondrial COXI, el ciclo de vida de *C. virginica* (2-3 semanas de larva planctónica), así como las condiciones oceanográficas de la zona (Zavala-Hidalgo *et al.*, 2003) parecen promover el flujo genético entre las lagunas sin ninguna barrera oceanográfica aparente entre ellas, contrariamente a lo planteado en nuestras hipótesis. Los resultados obtenidos con el análisis de

microsatélites no se contraponen con los encontrados utilizando COXI del ADNmt. Por el contrario, parecen apoyar la hipótesis nula de panmixia en las lagunas de la región centro-sur del Golfo de México. En el análisis con microsatélites, los valores de  $F_{ST}$  no significantes en las comparaciones pareadas entre lagunas, apoyan la hipótesis de que los bancos ostrícolas de *C. virginica* en la región centro sur del Golfo de México (Veracruz), sean considerados como una sólo población.

No obstante en el presente trabajo se encontraron algunas diferencias entre estos dos marcadores moleculares en cuanto a la significación de los valores de  $F_{ST}$  pareados: cuatro valores no significantes fueron encontrados con los microsatélites, lo que es traducido como algún grado de flujo genético restringido entre algunas lagunas. Dichas diferencias en la significación de estos valores, pueden deberse a la naturaleza misma de los marcadores moleculares: el alto grado de polimorfismo encontrado en los microsatélites y su elevada tasa de mutación pueden dar como resultado algunos niveles de estructuración (Hansen *et al.*, 1999, Arnaoud-Haond *et al.*, 2003), al contrario del ADN mitocondrial. Posibles eventos de aislamiento reproductivo pueden estar presentes entre éstas lagunas, sin embargo estos eventos de divergencia pueden ser relativamente recientes y no son detectados mediante análisis de ADN mitocondrial. Los resultados con microsatélites mostraron diferencias significantes entre algunas lagunas, lo

cual puede ser explicado por factores geográficos, éxitos reproductivos diferenciales y reducciones poblacionales recientes.

En otros estudios de bivalvos en los que han realizado análisis con estos dos tipos de marcadores moleculares han encontrado una congruencia en los resultados de estructura genética. En un estudio en el abulón *Haliotis midae*, ambos marcadores moleculares mostraron una estructura genética en las poblaciones analizadas (Evans *et al.*, 2004). En las poblaciones europeas del ostión *Ostrea edulis*, los análisis con ADNmt (Díaz-Almela *et al.*, 2004) apoyaron la estructuración genética encontrada con microsatélites (Launey *et al.*, 2002).

Es relevante mencionar que la discrepancia entre los resultados de ambos marcadores no tiene una explicación exclusiva en la naturaleza misma de estos marcadores. Por lo que existe otra explicación plausible que puede ser mencionada.

El análisis con microsatélites, mostró diferencias significativas entre lagunas cercanas, mientras que las lagunas lejanas geográficamente fueron encontradas sin ninguna diferencia significativa en los valores de  $F_{ST}$  pareados. Este modelo de estructura genética puede corresponder a un evento llamado por Hedgecock (1994) como parches caóticos (chaotic patchiness), el cual se origina por el muestreo de un grupo de individuos

exitosos en algún momento o espacio, que no reflejan precisamente las variantes genéticas de la población. Esto puede originar que los valores significantes en los  $F_{ST}$  fueran distintos a los obtenidos entre microsatélites y ADNmt.

Dado lo anterior, es imperativo un análisis más detallado que incluya un número de muestra mayor, que tenga una mayor amplitud geográfica, y un muestreo temporal de los organismos. De la misma forma, se recomienda la homogenización del muestreo con ADNmt y la utilización de otro tipo de marcador molecular nuclear donde se pueda comparar la filogeografía de la especie.

No obstante lo anterior, con este trabajo se demostró que *C. virginica* en el Golfo de México tiene una variabilidad genética elevada con ambos marcadores, y que es posible considerar a la población como panmíctica, con algunas excepciones entre las lagunas donde encontramos flujo genético restringido. Además de reconocer las localidades con mayor y menor variabilidad genética nuclear, Pueblo Viejo y Tamiahua respectivamente, lo cual debe de ser considerado para su futuro manejo pesquero y de cultivo.

## RECOMENDACIONES

---

A pesar de la alta variabilidad genética encontrada mediante el análisis con ADNmt, se recomienda priorizar el cuidado y la protección de los bancos ostrícolas de las lagunas de Tamiahua, Alvarado y El Ostión; debido a los resultados encontrados con el análisis de microsatélites, donde indican niveles menores de variabilidad genética, en comparación con el resto de las lagunas.

Por otro lado, se recomienda realizar un plan de manejo para *C. virginica* que contemple el repoblamiento de organismos, tomando en cuenta los niveles de variabilidad genética y las relaciones genéticas entre los bancos ostrícolas de las diferentes lagunas. El repoblamiento se recomienda que sea a partir de las lagunas Pueblo Viejo y Laguna Grande, ya que además de ser las lagunas con mayor variabilidad genética, presentan índices menores de endogamia. En el caso de La Mancha, debido al aislamiento genético de *C. virginica* encontrado mediante el análisis de microsatélites, no se recomienda realizar extracciones para repoblar otras lagunas.

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

Se recomienda realizar otro estudio genético con un marcador nuclear diferente mediante análisis de "polimorfismos nucleares de un solo nucleótido" (SNP's), para complementar el análisis de la estructura poblacional, eliminar el sesgo de los alelos nulos y determinar la concordancia filogeográfica con los análisis realizados en el presente trabajo.

## Literatura Citada

---

- Adamkewicz L., Taub S.R. and Wall J.R. 1984. Genetics of the clam *Mercenaria mercenaria*. I. Mendelian inheritance of allozyme variation. *Biochemical Genetics*. 22: 215-219
- Aljanabi S.M. and Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*. 25:4692-4693
- Arnaud-Haond S., Bonhomme F. and Blanc F. 2003. Large discrepancies in differentiation of allozymes, nuclear and mitochondrial DNA loci in recently founded Pacific populations of the Pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal of Evolution Biology*. 16:388-398.
- Arnaud-Haond S, Vonau V, Bonhomme F, Boudry P, Blanc F, Prou J, Seaman T, Goyard E. 2004. Spatio-temporal variation in the genetic composition of wild populations Of pearl oyster (*Pinctada margaritifera cumingi*) in French Polynesia Following 10 years of juvenile translocation. *Molecular Ecology* 13 (7): p 2001-2007
- Arnaud S., Galtier N., Monteforte M., Blanc F. and Bonhomme F. 2000. Genetic structure and variability of protected populations of pearl oysters (*Pinctada mazatlanica*) from American Pacific coasts. *Conserv. Gen.* 1:299-308.

- Astane J., Gosling E., Wilson J. and Powell E. 2005. Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Molecular Ecology*. 14:1655-1666.
- Avise J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sinauer Associates Inc. USA. pp 684.
- Avise J.C. 2000. *Phylogeography. The History and formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA. pp. 314
- Avise J.C., Neigel J.E. and Arnold J. 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular and Evolution*. 20:99-105.
- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A. and Saunders N.C. 1987a. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annual Reviews Ecology Systematics*. 18:489-522
- Avise J.C., Reeb C.A. and Saunders N.C. 1987b. Geographic population structure and species differences in mitochondrial DNA of mouth-brooding marine catfishes (*Ariidae*) and demersal spawning toadfishes (*Bratrachoididae*). *Evolution* 41:991-1002.
- Beaumont A.R. and Hoare K (Eds). 2003. *Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. IV. Genetics considerations in the hatchery*. Blackwell-Science Ltd. pp

- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. and Bonhomme F. 2000. Genetix, A Windows Based Software for Population Genetic Analyses. Laboratoire Genome Populations, Interactions. CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France. <http://www.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>
- Bierne N., Launey S., Naciri-Graven Y. and Bonhomme F. 1998. Early effect of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* larvae. *Genetics* 148: 1893-1906.
- Brookfield, I.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*. 5:453-455.
- Brown B.L., Franklin D.E., Gaffney P.M., Hong M., Dendantos D. and Kornfield I. 2000. Characterization of microsatellites loci in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Molecular Ecology*. 9:2217-2219.
- Brown B.L. and Paynter K.T. 1991. Mitochondrial DNA analysis of native and selectively inbred Chesapeake Bay oysters, *Crassostrea virginica*. *Marine Biology* 110:343-352.
- Buroker N.E. 1983a. Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast and the Gulf of Mexico. *Marine Biology* 75:99-112.
- Buroker N.E. 1983b. Genetic differentiation and population structure of the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) in Chesapeake Bay. *Journal Shellfish Research* 3:153-167.

- Carriker M. R. and Gaffney P.M. 1996. A Catalogue of Selected Species of Living Oysters (*Ostracea*) of the World. in: Kennedy V.S. and Newell R.I.E. (Eds) The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College. USA.
- Chakraborty R., de Andrade M., Daiger S.P. and Budowle B. 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals Human Genetic.* 56:45-57.
- Chapuis M.-P. and A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution.* 24:621-631.
- Chanley P.E. 1958. Survival of some juvenile bivalves in water of low salinity. *Proceeding Natural Shellfish Association.* 48:52-65.
- Contreras F. y Castañeda O. 1985. Los ecosistemas costeros del Estado de Veracruz. Gobierno del Edo. de Veracruz. SEDAP. Dir. Gral. de Pesca. México.
- De Innocentis S., Sola L., Cataudella S. and Bentzen P. 2001. Allozyme and microsatellite loci provide discordant estimates of population differentiation in the endangered dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) within the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology.* 10:2163-75.
- De la Rosa Vélez J. 1986. Variabilidad genética poblacional en ostiones de la especie *Crassostrea virginica* del Golfo de México. Tesis.

Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. Universidad Autónoma de México. Pp. 124.

- DeWoody J.A. and Avise J.C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*. 56:461-473.
- Diaz-Almela E., Boudry P., Launey S., Bonhomme F. and Lapegue S. 2004. Reduced Female Gene Flow in the European Flat Oyster *Ostrea edulis*. *Journal Heredity*. 95:510-6.
- Eisen J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein D.B. and Schlötterer C. (eds). *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press. New York. Pp.
- Estoup A., Rousset F., Michalakis Y., Cornuet J.M., Adriamanga M. and Guyomard R. 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology*. 7: 339-353.
- Evans B.S., Sweijid N.A., Bowie R.C.K., Cook P.A. and Elliot N.G. 2004. Population genetic structure of the perlemoen *Haliotis midae* in South Africa: evidence of range expansion and founder events. *Marine Ecology Progress Series*. 270: 163-172.
- Excoffier L., Smouse P. and Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131:479-491.

- Excoffier L., Laval G. and Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Fairbrother, J.F. and A.R. Beaumont. 1993. Heterozygote deficiencies in a cohort of newly settled *Mytilus edulis* spat. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 73:647-653.
- Freeland J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & sons, Ltd., Inglaterra.
- Gaffney P.M. 1994. Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: More light? En: Beaumont A.R. (Ed) *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman & Hall, London.
- Gaffney P.M. 1996. Biochemical and population genetics. En: Kennedy V.S. and Newell R.I.E. (eds) *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College, USA.
- Gaffney P., Davis C. and Hawes R. 1992. Assessment of drift and selection in hatchery populations of oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture* 105:1-20.
- Galtsoff P.S. 1964. *The American Oyster, Crassostrea virginica* Gmelin. Department of the Interior Fish and Wildlife Services, USA. 64:480.

- García de León F.J., Chikhi L. and Bonhomme F. 1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Molecular Ecology*. 6:51-62.
- Gilg, M.R. and Hilbish T.J. 2003. The geography of marine larval dispersal: coupling genetics with fine-scale physical oceanography. *Ecology*. 84:2989-2998.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Hansen M.M., Mensberg K.L.D. and Berg S. 1999. Postglacial recolonization patterns and genetic relationships among whitefish (*Coreogonus sp*) populations in Denmark, inferred from mitochondrial DNA and microsatellite markers. *Molecular Ecology*. 8:239-252.
- Hare M.P. and Avise J.C. 1998. Population structure in the American oyster as inferred by nuclear genes genealogy. *Molecular Biology and Evolution*. 15:119-128.
- Hartl D.L. and Clark A.G. 1997. *Principles of Population Genetics*, Sinauer Associates, Sunderland, MA. Pp 542.

- Hedgecock D. and Okasaki N.B. 1984. Genetic diversity within and between populations of American oysters (*Crassostrea*). *Malacologia*. 25:539-549.
- Hedgecock D. 1994. Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organism? In: Beaumont A.R. (Ed) *Genetics and evolution of aquatic organism*. Chapman and Hall, London.
- Hellberg M.E., Burton R.S., Neigel J.E. and Palumbi S.R. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*. 70:273-290.
- Hoover C.A. and Gaffney P.M. 2005. Geographical variation in nuclear genes of the eastern oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Journal Shellfish Research*. 24:103-112.
- Hughes C.R. and Queller D.C. 1993. Detection of highly polymorphic microsatellites loci in a species with little allozyme polymorphism. *Molecular Ecology*. 2:131-137.
- Huvet A., Lapègue S., Magoulas A. and Boudry P. 2000. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Conservation Genetic*. 1:251-262.
- Huvet A., Fabioux C., McCombie H., Lapègue S. and Boudry P. 2004. Natural hybridization between genetically differentiated populations of *Crassostrea gigas* and *C. angulata*

highlighted by sequence variation in flanking regions of a microsatellite locus. *Marine Ecology Progress Series*. 272: 141–152.

Jarne P. and Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*. 11:424–429.

Jiménez, B.M.L. Vega, O.E. y Castro L.G. 2002. Tendencia de la pesquería de ostión a nivel nacional, regional y local. Primer Foro Regional sobre ostión de Tamaulipas, Veracruz y Tabasco. Tuxpan, Veracruz, 25 a 26 de abril. Instituto nacional de la Pesca. México.

Johnson M.S. and Black R. 1982. Chaotic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria sp.* *Marine Biology*. 70:57-164.

Karl S.A. and Avise J.C. 1992. Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLPs. *Science*. 256:100-102.

Kenchington E.L., Patwary M.U., Zouros E. and Bird C.J. 2006. Genetic differentiation in relation to marine landscape in broadcast-spawning bivalve mollusk (*Placopecten magellanicus*). *Molecular Ecology*. 15:1781-1796.

Kennedy V.S. 1983. Sex ratios in oysters, emphasizing *Crassostrea virginica* (Gmelin) from Chesapeake Bay, Maryland. *Veliger* 25:329-338.

- Kennedy V.S. 1996. Biology of larvae and Spat. In: Kennedy V.S. and Newell R.I.E. (eds) *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College. USA.
- Klinbunga S. 1996. Genetic variation and population structure of giant tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). Doctoral Thesis, University of Stirling. 356p.
- Klinbunga S., Khamnamtong B., Puanglarp N., Jarayabhand P., Yoosukh W. and Menasveta P. 2005. Molecular taxonomy of cupped oysters (*Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand based on COI, 16s, and 18s rDNA polymorphism. *Marine Biotechnology*. 7, 306–317.
- Kumar S., Tamura K., and Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163
- Krafsur E.S. 2002. Population structure of the tse tse fly *Glossina pallidipes* estimated by allozyme, microsatellite and mitochondrial gene diversities. *Insect Molecular Biology*. 11:37-45.
- Lambert D.M. and Millar C.D. 1995. DNA Science and Conservation. *Pacific Conservation Biology*. 2:21-38.
- Launey S., Ledu C., Boudry P., Bonhomme F. and Naciri-Graven Y. 2002. Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis*) as revealed by microsatellite polymorphism. *The Journal of Heredity*. 93:331-337.

- Lapègue S., Ben Salah I., Batista F. M., Heurtebise S., Neifar L. and Boudry P. 2006. Phylogeographic study of the dwarf oyster, *Ostreola stentina*, from Morocco, Portugal and Tunisia: evidence of a geographic disjunction with the closely related taxa, *Ostrea aypouria* and *Ostreola equestris*. *Marine Biology*. 150:103–110.
- Larson R.J. and Julian R.M. 1999. Spatial and temporal genetic patchiness in marine populations and their implications for fisheries management. *CalCOFI*. 40:94-99.
- Loosanoff V.L. and Nomejko C.A. 1951. Existence of physiologically different races of oysters, *Crassostrea virginica*. *Biological Bulletin*. 101:151-156.
- Magoulas A., Gjetvaj B., Terzoglou V. and Zouros E. 1998. Three polymorphic microsatellites in the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Animal Genetics*. 29:69-70.
- McDonald J.H., Brian C., Verreli C. and Geyer L.B. 1996. Lack of geographic variation in anonymous nuclear polymorphisms in the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Molecular Biology and Evolution* 13:1114-1118.
- McMillen A.L. and Bert T.M. 2004. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the blue crab *Callinectes sapidus* in the eastern United States. *Marine Biology*. 145:769-777.

- Milbury C. A., Meritt Æ D. W., Newell Æ R. I. E. and Gaffney P. M. 2004. Mitochondrial DNA markers allow monitoring of oyster stock enhancement in the Chesapeake Bay. *Marine Biology*. 145:351–359
- Milbury C. A. and Gaffney P. M. 2005. Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology*. 7:697-712.
- McGoldrick, Hedgecock, English L., Baoprasertkul y Ward R.D. 2000. The transmission of microsatellite alleles in Australian and north American stocks of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles. *Journal of shellfish research*. 19: 779-788.
- Naciri Y., Vigouroux Y., Dallas J., Desmarais E., Delsert C. and Bonhomme F.. 1995. Identification and inheritance of (GA/TC)<sub>n</sub> and (AC/GT)<sub>n</sub> repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Molecular Biology and Biotechnology* 4:83-87.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Newkirk G.F., Haley L.E., Wangh D.L. and Doyle R. 1977. Genetics of larvae and spat growth rate in the oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biology*. 41:49-52.
- Ó Foighil D., Gaffney P.M. and Hilbish T.J. 1995. Differences in mitochondrial 16S ribosomal gene sequences allow discrimination

among American [*Crassostrea virginica* (Gmelin)] and Asian [*C. gigas* (Thunberg) *C. ariakensis* Wakiya] oyster species. *Journal of Experimental in Marine Biology and Ecology*. 192:211–220

Palacios-Fest M. and Vargas-Rangel C. 1998. Pesquería de Ostion. In: Guzmán-Amaya P, *et al.* (Eds.) *La Pesca en Veracruz y sus perspectivas de desarrollo*.

Park, Stephen. MS Tools v 3.1 Smurfit Institute of Genetics, Trinity College, Dublin 2, Ireland spark@tcd.ie / sdepark@hotmail.com; <http://acer.gen.tcd.ie/~sdepark/ms-toolkit/>

Pérez-Enríquez R., Takemura M., Tabata K. and Taniguchi N. 2001. Genetic diversity of red sea bream *Pagrus major* in western Japan in relation to stock enhancement. *Fisheries Science*. 67:71-78.

Posada D. and Crandall K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note*. 14:817-818.

Poteaux C., Berrebi P. And Bonhomme F. 2001. Allozymes, mtDNA and microsatellites study introgression in a stocked trout population in France. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 10:281-292.

Raymond M. and Rousset F. 1995. GENEPOP (versión 3.3): population genetic for exact test ecumenism. *Journal of Herdity*. 86:248-249.

- Reeb C.A. and Avise J.C. 1990. A genetic discontinuity in a continuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics*. 124:397-406.
- Reece K.S., Ribeiro W.L., Gaffney P.M., Carnegie R.B. and Allen Jr. S.K. 2004. Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of Null Alleles and Non-Mendelian Segregation Ratios. *Journal of Heredity*. 95:346-352.
- Rice W.R. 1989. Analysing tables of statistical tests. *Evolution* 41:223-235.
- Robles-Hernández, R. 2006. Biología de la reproducción del ostión Americano *Crassostrea virginica* en Veracruz, México; en condiciones naturales y de laboratorio. Tesis Doctoral, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.
- Rogers P. y García-Cubas A. 1981. Evolución gonádica a nivel histológico de *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791). Del sistema fluvio lagunar Pom-Atasta, Lagúna de Términos, Cam., México (Mollusca-Bivalvia). *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM*. 8:21-42.
- Rose C.G., T.P. Paynter and Hare M.P. 2006. Isolation by distance in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in Chesapeake Bay. *Journal of Heredity*. 97:158-170.
- Rousset, F. 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistic under isolation by distance. *Genetics* 145:1219-1228.

- Rozas J., Sánchez-DelBarrio J.C., Messeguer X. and Rozas R. 2003. DnaSP DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497
- SAGARPA. 2002. Anuario estadístico de pesca 2001. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Mexico, D.F.
- Saunders N.C., Kessler L.G. and Avise L.C. 1986. Genetic variation and geographic differentiation in mitochondrial DNA of the horse shoe crab *Limulus polyphemus*. *Genetic*. 112:613-627.
- Schlötterer C. and Tautz D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*. 20:211-215.
- Schlötterer C. and Pemberton J. 1994. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. In: Schierwater B.S., Wagner G.P., and DeSalle R. (eds.), *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Birhauser Verlag, Basel, Switz. pp 203-214.
- Shumway S.E. 1996. Natural Environmental Factors. En: Kennedy V.S. and Newell R.I.E. (eds) *The Eastern Oyster Crassostrea virginica*. Maryland Sea Grant College. USA. pp
- Smouse P.E., Long J.C. and Sokal R.R. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel Test of matrix correspondance. *Systematics Zoology* 35: 627-632.

- Spencer C.C., Neigel J.E. and Leberg P.L. 2000. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Molecular Ecology*. 9:1517-1528.
- Taberlet P. 1996. The Use of Mitochondrial DNA Control Region Sequencing in Conservation Genetics. In: Smith T.B. and Wayne R.K. (Eds) *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press. Pp 617.
- Tajima F. 1993. Measurement of DNA polymorphism. In: N. Takahata y A.G. Clarks (Eds). *Mechanisms of molecular evolution. Introduction to molecular paleopopulation Biology*. Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc. Tokyo, Japan.
- Tendengren M., Andree C., Johannesson K. and Kautsky N. 1990. Genotypic and phenotypic differences between Baltic and North Sea populations of *Mytilus edulis* evaluated through reciprocal transplantations. III Physiology. *Marine Ecology Progress Series*. 59:221-227.
- Thompson R.J., Newell R.I.E., Kennedy V.S. and Roger M. 1996. Reproductive Processes and Early Development. In: Kennedy V.S. and Newell R.I.E. (eds) *The Eastern Oyster *Crassostrea virginica**. Maryland Sea Grant College. USA.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M. and Shipley P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting

genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535-538.

Wakefield J.R. and Gaffney P.M. 1996. DGGE reveals additional population structure in American oyster (*Crassostrea virginica*) populations. *Journal Shellfish Research*. 15:513.

Weir BS, 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer, Sunderland, MA.

Weir B.S. and Cockerham C.C. 1984. Estimating-Fstatistics for the análisis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to system of mating. *Evolution*. 19:395-410.

Zavala-Hidalgo J., S.L. Morey and J. O'Brien. 2003. Seasonal circulation on the western shelf of the Gulf of Mexico using a high-resolution numerical model. *J. Geophys. Res.* 108(C12): 3389, DOI 10.1029/2003JC001879.

Zhang D.X., Hewitt G.M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*. 12:563-584.

Zouros E. and D.W. Foltz. 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia* 25:583-591.

**Anexo I**

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

Laguna	Ubicación	No. de muestra ( <i>n</i> )
Pueblo Viejo (PV)	22.15°N 97.90°W	50
Tamiahua (Ta)	21.10°N 97.58°W	40
Laguna Grande (LG)	20.07°N 96.66°W	40
La Mancha (LM)	19.63°N 96.45°W	50
Alvarado (AL)	18.79°N 95.83°W	50
El Ostión(LO)	18.18°N 94.70°E	50

**ANEXO II**  
**PROTOCOLO**  
**EXTRACCIÓN DE ADN CON SALES Y PROTEINASA K**  
**(Aljanabi y Martínez, 1997)**

***Soluciones Stock:***

- *Buffer de homogenización de sales*

Tris pH 7.4 a 8.4 10 mM

Na Cl 400 mM

EDTA pH 8.0 2mM

- SDS 20% (concentración final de 400 µg/mL).
- Proteinasa K 20 mg/ml (concentración final de 400 µg/mL).
- NaCl 6M
- Isopropanol 99%
- Etanol 70% ó Isopropanol al 30%
- Te 0.1 X

***Materiales y Equipo:***

Horno (55-65°C)

Vórtex

Centrífuga

***Procedimiento:***

1. Cortar 50 - 100 mg de tejido finamente con navaja o bisturí.
2. Homogenizar el tejido en un tubo ependorff con 400 µL de **buffer de homogenización de sales**.
3. Agregar 40 µl de SDS 20% (concentración final 2%) y 2 µl de **proteínasa K** 20 mg/ml (concentración final de 100 µg/ml).
4. Incubar a 55 -65 ° C durante al menos 1 hora (o toda la noche).
5. Agregar 350 µl **NaCl** 5M (o 300 µl **NaCl** 5M).

6. Agitar con vórtex durante 30 seg. (a máxima velocidad).
7. Centrifugar a 11000 – 12000 rpm.durante 30 min.
8. Transferir el sobrenadante a otro tubo ependorff nuevo.
9. Agregar un volumen igual de **isopropanol** al 99% a cada tubo (750-800  $\mu$ l).
10. Mezclar bien (en caso de no observar nada; se recomienda dejar toda la noche a -20° C en el siguiente paso).
11. Incubar a -20° C durante una hora (-80° C durante media hora).
12. Centrifugar a 4° C a 12000-14000 rpm durante 20 min.
13. Desechar el sobrenadante y tener cuidado de **no** desechar el pellet.
14. Agregar al pellet dos volúmenes de **etanol** al 70% (ó un volumen de **isopropanol** al 30%, dos veces).
15. Centrifugar a 4° C a 12000-14000 rpm. durante 10 min.
16. Secar las muestras en rotoevaporador (si se cuenta con el o si no dejar secar a temperatura ambiente (hasta que este completamente seco el tubo) hasta que el pellet quede transparente.
17. Resuspender en 100  $\mu$ l **TE** 0.1X o **agua dde** (destilada, desionizada y **estéril**)-si se va a preservar el DNA por más tiempo, se recomienda utilizar **TE** 1X.
18. Dejar resuspendiendo toda la noche a temperatura ambiente o 2 horas a 65° C.
19. Etiquetar debidamente cada tubo con el código de la muestra e incluir la fecha. Guardar a -80° C (a -20° C si se va a utilizar en las próximas semanas o a 4° C si se utiliza en los siguientes días).

***Nota: La cantidad de TE o agua en la que se resuspenda el DNA, va a ser en función del tamaño del pellet obtenido***

**ANEXO III****PROTOCOLO****ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA AL 6% Y UREA 7.5 M.*****Soluciones stock:***

- Acrilamida refrigerada (Urea 7.5 M, acrilamida:bis-acrilamida 19:1 6 %, TBE 1X).
- *TBE 10 X (Tris-ácido 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.

Incubadora o termociclador a 95 °C.

***Procedimiento:***

1. Colocar boca arriba un par de vidrios, limpiar con alcohol al 70 % utilizando un pañuelo desechable.
2. Agregar en un vaso de precipitados de 50-100 ml, 70 ml de solución stock de acrilamida refrigerada (Urea 7.5 M, acrilamida:bis-acrilamida 19:1 6 %, TBE 1X= Tris-ácido bórico 0.09 M, EDTA 0.002M).
3. Agregar 350 µl de APS 10%, y 20-35 µl de TEMED, agitar ligeramente.
4. Colocar el vidrio sin muesca boca arriba con los separadores. Verter lentamente la acrilamida en el medio del vidrio y deslizar pausadamente el otro vidrio conforme se agrega la acrilamida. *Tratar de que no se*

*formen burbujas.* Una vez que los vidrios quedan completamente empalmado

colocar el "peine" de manera invertida en el extremo con muesca. *El gel polimerizará en aproximadamente 30 mins.*

5. Enjuagar con agua de la llave la cara exterior de los vidrios y retirar el peine.. Montar adecuadamente en la cámara de electroforesis. Llenar las celdas con solución amortiguadora TBE 1X.
6. Conectar la cámara a una fuente de poder (1600-1800 volts) y precalentar el gel hasta que alcance los 50-55 °C (de 15-30 min).
7. Poco antes de que el gel se ha pre-calentado, desnaturalizar los productos de *PCR* calentando por 5 min a 90° 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, reservar 4 carriles para cada base de una 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 un vidrio cuidadosamente.

## **ANEXO IV**

### **PROTOCOLO**

### **VISUALIZACIÓN DE MICROSATÉLITES EN GELES DE POLIACRILAMIDA.**

#### ***Quimioluminiscencia (Kit Phototope-Star Detection, New England)***

#### ***Soluciones stock:***

Kit Phototope-Star Detection (New England):

- Estreptavidina (1 mg/ml)
- Fosfatasa alcalina biotinilada (0.5 mg/ml)
- CDP-Star (25 mM)
- Sol. de dilución CDP-Star (25 X)

Sol. de bloqueo (SDS 5%, NaCl 125 mM, Fosfato de sodio 25 mM, pH 7.2)

Sol. de lavado I (SDS 0.5%, NaCl 12.5 mM, Fosfato de sodio 2.5 mM)

Sol. de lavado II (10 X) (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 9.5)

Sol. reveladora 6 X(Kodak GBX)

Sol. fijadora 6 X(Kodak GBX)

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

Papel filtro.

Membrana de nylon (no nitrocelulosa) cargada positivamente. Poro 45 μ.  
(Nytran-N, Scheleicher & Schuell)

Tubos de hibridación.

Horno de hibridación.

Cuarto de revelado oscuro.

Película de rayos X (Kodak X-Omat).

Cassette de revelado.

**Procedimiento:**

1. Cortar previamente 5 fragmentos de papel filtro 3M y un fragmento de membrana de nylon (Nytran-N, Scheleicher & Schuell) de tamaño suficiente para cubrir el área donde se esperan los alelos (productos de *PCR*). Marcar el lado de la membrana de nylon que va a estar en contacto con el gel (con lápiz).
2. Desmontar los vidrios y colocarlos sobre una superficie plana. Con la ayuda de una espátula levantar uno de los dos vidrios con cuidado.
3. Colocar un fragmento de papel filtro 3M en el área donde se esperan los productos de *PCR*. Presionar ligeramente para que se adhiera el gel al papel.
4. Cortar con cuidado el gel con una navaja de bisturí por el contorno del papel filtro. Retirar el papel filtro junto con el fragmento de gel adherido.
5. Colocar 2 fragmentos de papel filtro (*mismas dimensiones que el anterior*) humedecidos en TBE 0.5X sobre una superficie plana nivelada.
6. Colocar el papel con el gel hacia arriba sobre los papeles humedecidos. Colocar un fragmento de membrana de nylon (Nytran-N, Scheleicher & Schuell) humedecida en TBE 0.5X con la cara más lisa hacia el gel. Agregar 2 papeles secos y por último una superficie plana (p ej. vidrio) que pese aproximadamente 2 kg.
7. Esperar aproximadamente 25 min. hasta que los papeles superiores a la membrana se encuentren humedecidos (*el tiempo de transferencia puede variar según el lote de membrana aunque sea de la misma marca*). Para garantizar una transferencia de ADN exitosa es importante verificar que la difusión del líquido sea a través de la membrana y no por los bordes, por lo que es recomendable no empapar demasiado los papeles inferiores sino solamente lo suficiente.
8. Retirar cuidadosamente la membrana, eliminando cualquier fragmento de gel adherido. Fijar el ADN a la membrana secando completamente en un horno a 70° C, aproximadamente 10 min.

9. Colocar la membrana en un tubo de hibridación y agregar consecutivamente los reactivos del kit Phototope-Star Detection (New England) y subsecuentes lavados (Tabla II.1). Todo esto en un horno de hibridación con movimiento a temperatura ambiente. *Si el tamaño de la membrana no permite realizar esto en un tubo de hibridación, se puede colocar en una charola de plástico sobre un agitador de geles.*

*Incubación y lavados para revelar usando el kit Phototope Star detection:*

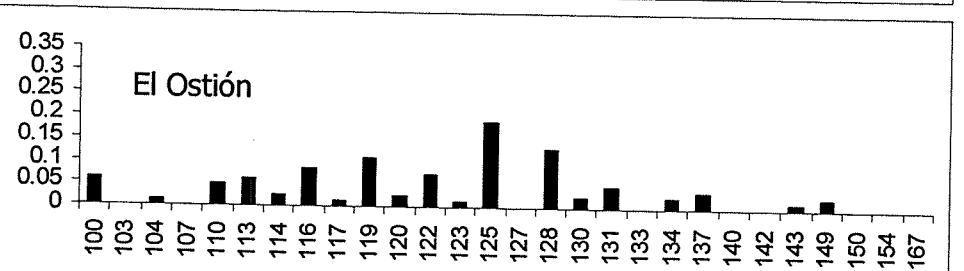
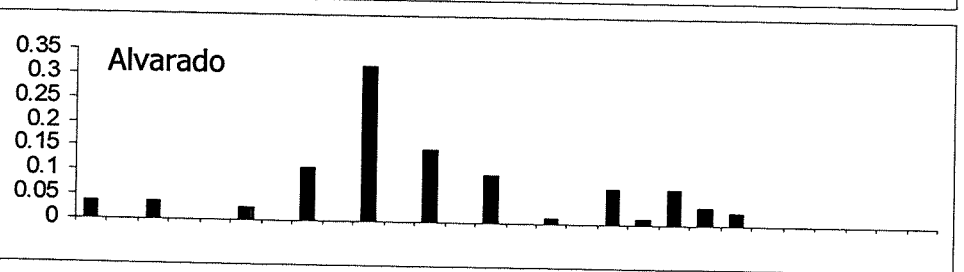
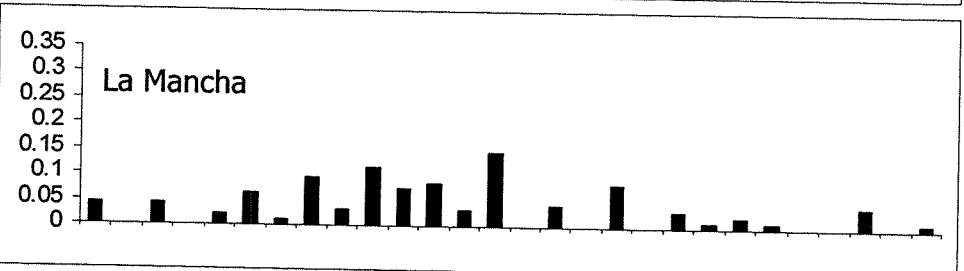
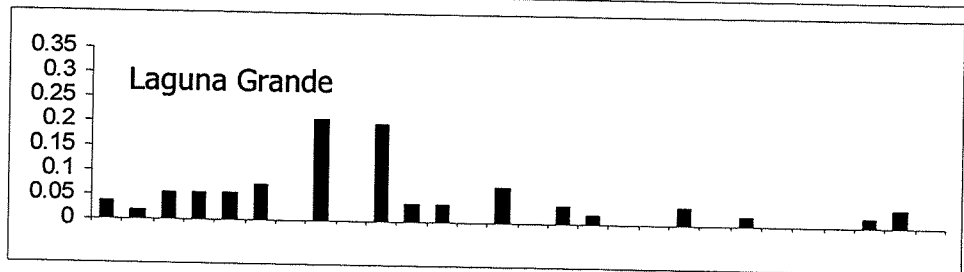
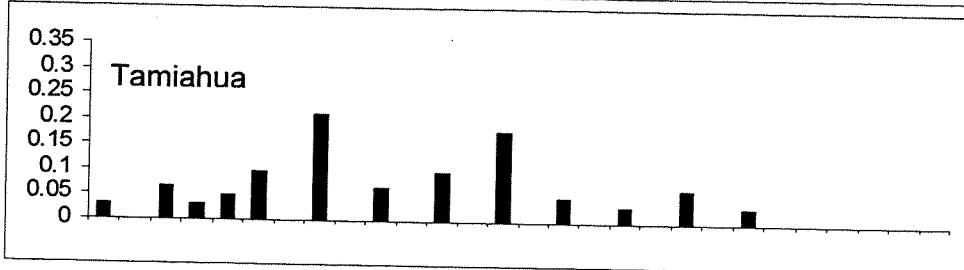
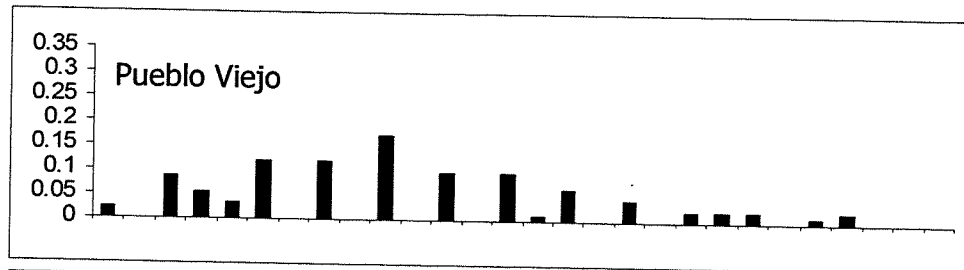
<b>Repeticiones ml/cm2</b>	<b>Solución</b>	<b>Tiempo (min.)</b>	
1	de Bloqueo	5	0.1
1	Estreptavidina		0.05 (µl/ cm2)
	en sol de bloqueo	5	0.05
2	de lavado I	5	0.5
1	Biotin alcalin fosfatasa		0.05 (µl/ cm2)
	en sol de bloqueo	5	0.05
1	de Bloqueo	5	0.5
2	de lavado II (1X)	5	0.5
1	Reactivo CDP-Star	5	0.25(µl/ cm2)
	en sol CDP-Star 1X		0.025

10. Envolver la membrana en papel plástico, eliminando burbujas y arrugas.
11. En un cuarto oscuro de revelado fotográfico (luz roja de wataje adecuado) colocar la membrana en contacto con una película de rayos X (Kodak X-Omat) en un cassette de revelado. Dejar 10-30 min en exposición.
12. Sumergir la película 5-15 seg en sol. reveladora 1 X (Kodak GBX), hasta que aparezcan los productos de *PCR* como bandas con buena resolución. Enjuagar en agua corriente. Sumergir 1 min. en sol. fijadora 1 X (Kodak GBX). Enjuagar en agua corriente. Dejar secar.
13. Observar sobre un transiluminador de luz visible.

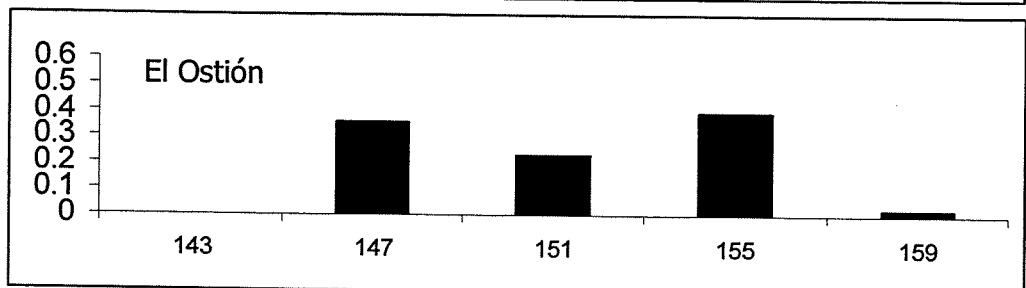
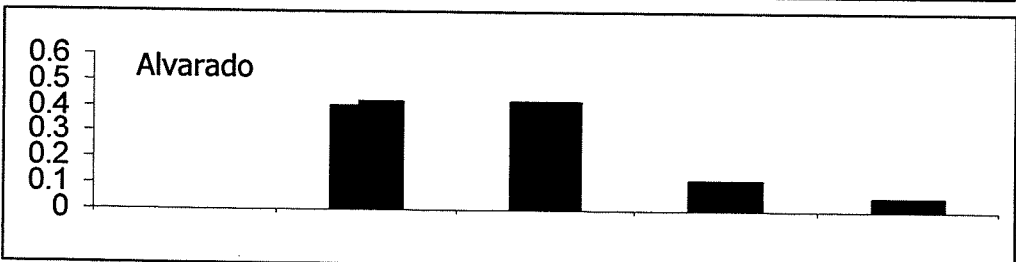
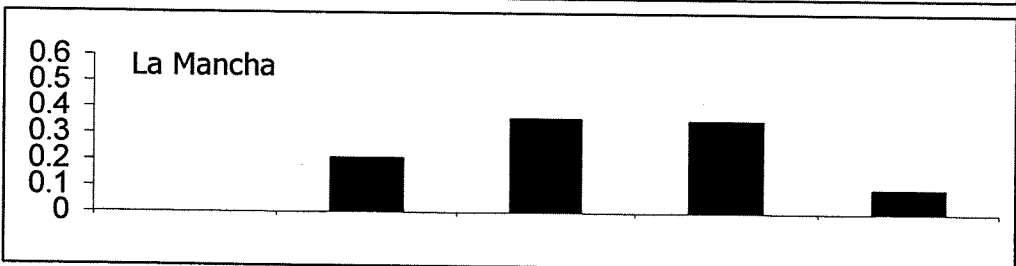
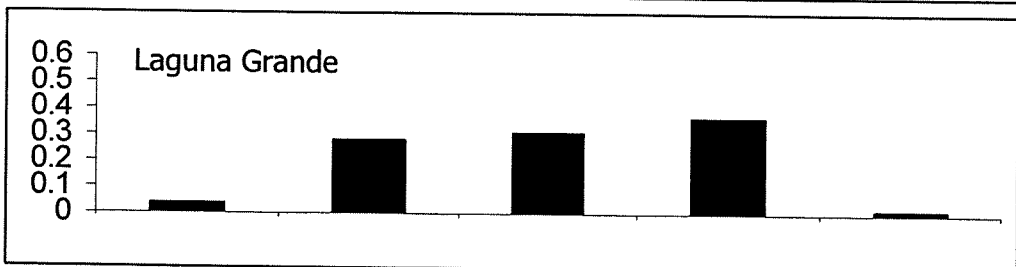
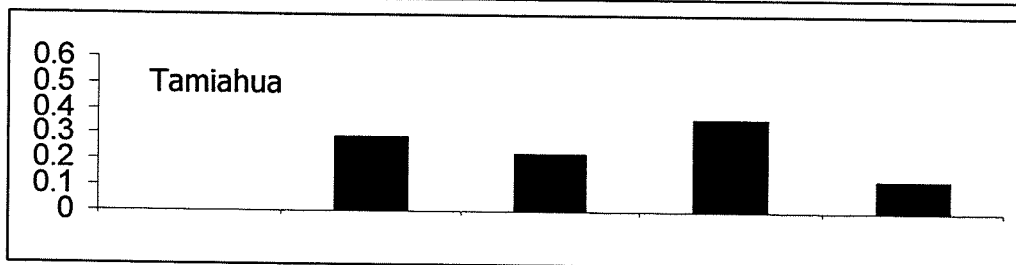
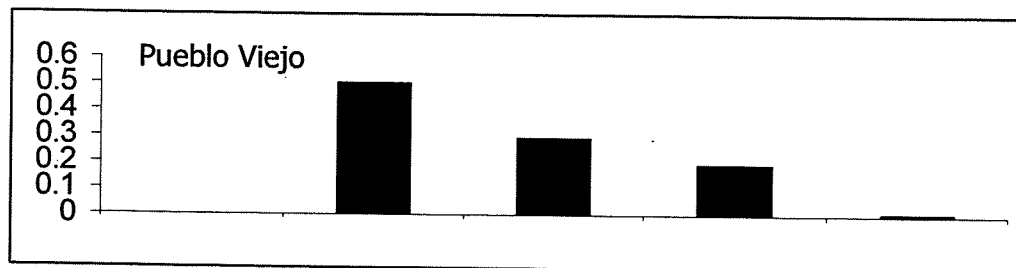




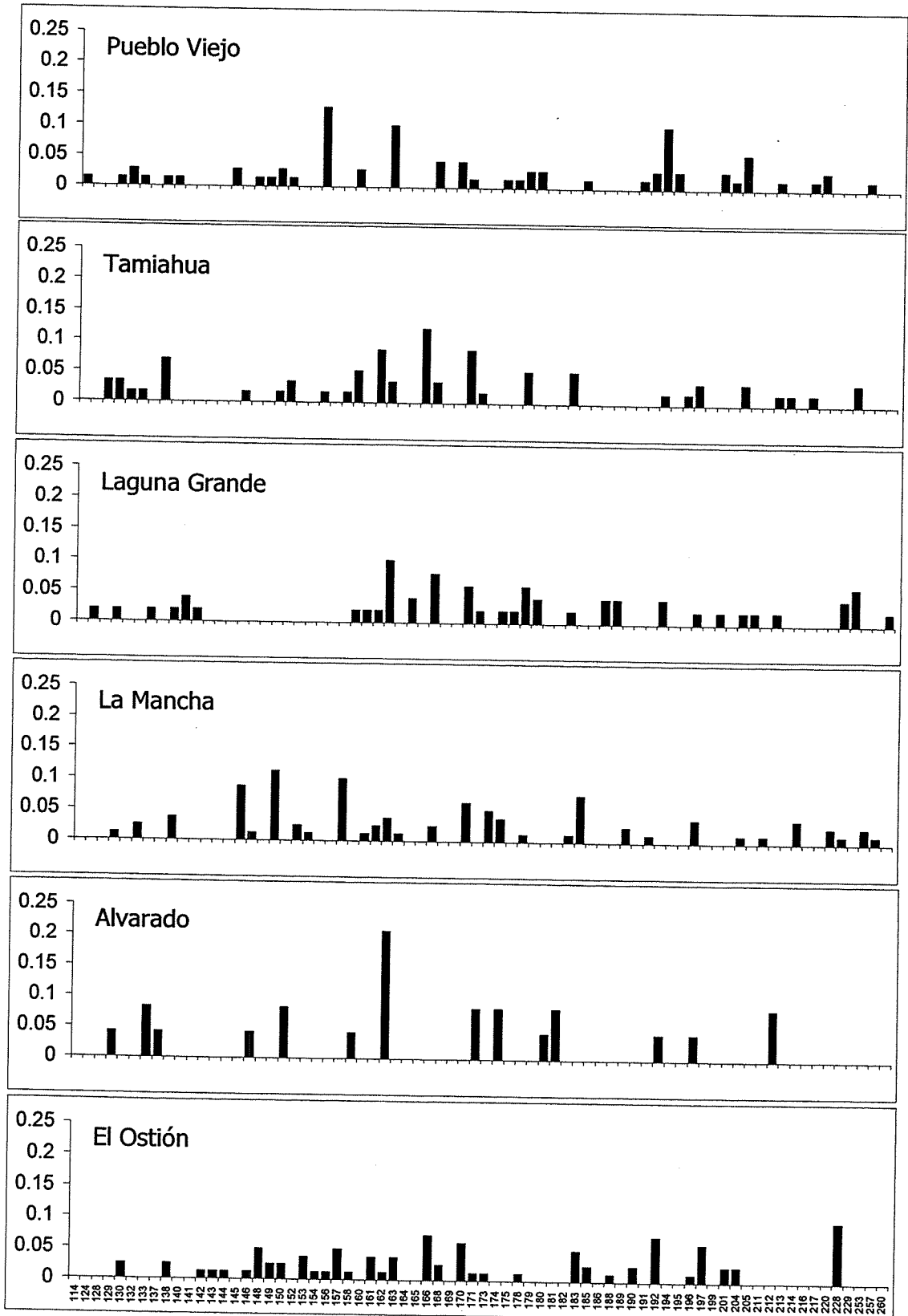
Cvi9



## Cvi11



### Cvi13



## Anexo VI

En la tabla se muestran los valores globales estimados de  $F_{ST}$  (Weir, 1990), con y sin corrección del método **ENA** (exclusión de alelos nulos, por sus siglas en inglés) (Chapuis y Estoup, 2007).

	Fst no utilizando <b>ENA</b>	Fst utilizando <b>ENA</b>
<b>Valores globales</b>	0.019	<b>0.019</b>
<b>Por Locus</b>		
<b>Cvi13</b>	0.012	<b>0.010</b>
<b>Cvi8</b>	0.038	<b>0.036</b>
<b>Cvi6</b>	0.008	<b>0.007</b>
<b>Cvi9</b>	0.010	<b>0.007</b>
<b>Cvi11</b>	0.034	<b>0.037</b>

Los valores en negritas son significativamente diferentes de cero ( $P < 0.05$ )

En la tabla se muestran los valores de  $F_{ST}$  pareados con la corrección del método **ENA** (Chapuis y Estoup, 2007).

	PV	TA	LG	LM	AL
<b>TA</b>	<b>0.019</b>				
<b>LG</b>	0.012	0.010			
<b>LM</b>	<b>0.030</b>	<b>0.031</b>	<b>0.014</b>		
<b>AlI</b>	0.005	<b>0.024</b>	<b>0.015</b>	<b>0.034</b>	
<b>LO</b>	0.012	<b>0.021</b>	0.004	0.011	<b>0.029</b>

Los valores en negritas son significativamente diferentes de cero ( $P < 0.05$ )

**ANEXO VII**

En la tabla se muestran las secuencias obtenidas en el laboratorio de Dr. Patrick Gaffney (College of Marine Studies, University of Delaware, Lewes, DE 19958, USA). Se presenta el sitio de recolecta del organismo correspondiente, así como el linaje al cual pertenece y el Haplotipo al que corresponde en el presente trabajo.

Haplotipo	Linaje	Secuencia	Sitio de recolecta
H17	Golfo de México	MX158	Tabasco, México
H10	Golfo de México	GLV77	Galveston, Texas, E.U.
		GC-2	Haplotipo menos común en el Golfo de México
		CK6942	Cedar Key, Florida, E.U.
H2	Golfo de México	SQ1	Secuencia de referencia
		PA3741	Port Aransas, Texas, E.U.
		GC-1	Haplotipo más común en el Golfo de México
ninguno	Golfo de México	PA6952	Port Aransas, Texas, E.U.
ninguno	Golfo de México	CLV71	Galveston, Texas, E.U.
ninguno	Golfo de México	C69316	Cedar Key, Florida, E.U.
ninguno	Golfo de México	648650	?
ninguno	Atlántico	CK6935	Cedar Key, Florida, E.U.
ninguno	Atlántico	CK6940	Cedar Key, Florida, E.U.
ninguno	Atlántico	VCO122	?
ninguno	Atlántico	SAVCOI	Haplotipo <i>estándar</i> del Atlántico, común en Georgia y Carolina del Sur, E.U.