CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA ALMEJA DE SIFÓN *Panopea globosa* (DALL, 1898) EN EL NOROESTE DE MÉXICO

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biología Marina)

p r e s e n t a

L a u r a I z a s c u m P é r e z V a l e n c i a

La Paz, B.C.S. marzo de 2011

Conformación del comité:

Comité tutorial y comité revisor de tesis.

Dr. Pedro Cruz Hernández- Director de tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Alberto Eugenio Aragón Noriega
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Dr. Ricardo Pérez Enríquez
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Jurado de examen:
Dr. Pedro Cruz Hernández
Dr. Eugenio Alberto Aragón Noriega
Dr. Ricardo Pérez Enríquez

Suplente:
Dra. María Teresa Sicard González

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 02 del mes de marzo del 2011, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA ALMEJA DE SIFÓN *Panopea globosa* (DALL, 1898) EN EL NOROESTE DE MÉXICO.

Presentada por el alumno:

Laura Izascum Pérez Valencia

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biología Marina.**

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

LA COMISION REVISORA

Dr. Pedro Cruz Hernández
DIRECTOR DE TESIS

Dr. Ricardo Pérez Enríquez
CO-TUTOR

Dr. Eugenio Alberto Aragón Noriega
CO-TUTOR

DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

La almeja de sifón *Panopea globosa* es un bivalvo sésil, cuya distribución abarca el Golfo de California hasta Bahía Magdalena. Debido a su alta rentabilidad, su pesca inició el año 2002, aún sin tener un conocimiento amplio sobre su biología. Para establecer un plan de manejo adecuado para la especie, es necesario saber si estamos tratando con una sola población o bien con varias de ellas. Con el objetivo de conocer los niveles actuales de diversidad genética y determinar si existe estructura genética poblacional se realizó un análisis basado en microsatélites. Primeramente se identificaron marcadores microsatélite específicos para la especie, mediante la construcción de 5 librerías genómicas enriquecidas, de las cuales se diseñaron 36 pares de cebadores obteniéndose dos marcadores polimórficos útiles. Se analizaron organismo colectados en 3 localidades del Golfo de California [San Felipe (SF), Puerto Peñasco (PP), Guaymas (GU)] y una localidad de la costa occidental de la península de Baja California Sur [Bahía Magdalena (BM)] . Se estimó la variabilidad genética expresada en, número de alelos (n_A), número de alelos efectivos (n_e), heterocigosidad observada (*Ho*), heterocigosidad esperada (*He*), riqueza alélica (*AR*) y coeficiente de endogamia (F_{IS}). Se realizaron pruebas de Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) y desequilibrio de ligamiento. Para detectar estructura genética poblacional se calcularon los valores pareados de F_{ST} y 3 Análisis Moleculares de Varianza, (AMOVA) con las siguientes jerarquías: Golfo de California vs Pacífico; PP-SF vs BM-GU y PP-SF vs BM vs GU. Se encontraron niveles moderados de variabilidad genética (n_A=13.37, $n_{e=}$ 7.48, *AR*= 11.31, *Ho*=0.71, *He*= 0.87, F_{IS}= 0.26). No se observó desequilibrio por ligamiento. No se observó EHW en la mayoría de las localidades, debido a déficit de heterocigotos, causado por alelos nulos. Se observaron diferencias genéticas significativas entre BM y las dos localidades del Alto Golfo, SF y PP (F_{ST}= 0.018, F_{ST}= 0.036, respectivamente). Ninguna de las comparaciones entre los grupos formados para el AMOVA mostró algún valor significativo, sin embargo BM, tiene una tendencia a ser una localidad distinta del resto. En el presente análisis preliminar con dos loci microsatélites, se concluye que los valores de variabilidad y estructura genética pueden estar sugiriendo que existe estructura genética poblacional, en donde BM es una población distinta a las del Alto Golfo de California, lo cual es explicado en base a los factores ambientales que influyen en la dispersión larval. Con el fin de realizar un análisis poblacional más robusto se recomienda ampliar el estudio con el uso de al menos seis loci microsatélites polimórficos adicionales.

Palabras clave: *Panopea globosa*, variabilidad genética, estructura genética, microsatélites.

ABSTRACT

The geoduck clam *Panopea globosa* is a sessile bivalve, whose distribution covers the Gulf of California to Bahia Magdalena. Due to its high profitability, fishery began in 2002, even without extensive knowledge about its biology. To establish an adequate management plan for the species, it is necessary to know whether we are dealing with a single population or several of them. With the goal of knowing the population genetic structure, specific microsatellite markers were identified, through the construction of 5 enriched genomic libraries. 36 pairs of primers were designed and only two yielded polymorphic markers. Samples from 3 location in the Gulf of California [San Felipe (SF), Puerto Peñasco (PP), Guaymas (GU)] and one from the Pacific [Bahia Magdalena (BM)] were analyzed. We estimated the genetic variability expressed in number of alleles (n_A), number of effective alleles (n_e), observed heterozygosity (*Ho*), expected heterozygosity (*He*), allelic richness (*AR*) and inbreeding coefficient (F_{IS}). Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium were tested as well. To detect population genetic structure F_{ST} paired values were calculated and three Analysis Molecular of Variance, AMOVA (Gulf of California vs Pacific PP-SF vs BM-GU, PP-SF vs GU vs BM). We found moderate levels of genetic variability (n_A = 13.37, n_e = 7.48, *AR* = 11.31, *Ho* = 0.71, *He* = 0.87, F_{IS} = 0.26). Linkage disequilibrium was not observed. Deviation to HWE was observed due to heterozygote deficiencies, caused by null alleles in most locations. Significant genetic differences were observed between BM and the two localities of the Upper Gulf, SF and PP (F_{ST} = 0.018, F_{ST} = 0.036, respectively). None of the comparisons between the groups formed for the AMOVA showed any significant *F* value, however BM has a tendency to be a different location from the rest. In this analysis approach with two microsatellite loci, we conclude that the values of variability suggested population genetic structure, where BM is a distinct population of the Upper Gulf of California, probably due to environmental factors influencing larval dispersal. To make a more robust population analysis is recommended to extend the study to at least six additional polymorphic microsatellite loci.

Key words: *Panopea globosa*, genetic variability, genetic structure, microsatellites.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo al ALETS, a mi familia y a mi querida Mina.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por la formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Al apoyo económico otorgado por el Programa de Posgrado en los últimos meses.

A mi director Pedro Cruz Hernández por toda su ayuda, esfuerzo y sacrificio en la realización de la tesis. MIL GRACIAS.

A mis asesores Ricardo Pérez Enríquez y Alberto Aragón Noriega por sus valiosas aportaciones.

Agradezco especialmente a todas las personas que me ayudaron a obtener las muestras: Sergio A. Pérez (CEDO) por las muestras de San Felipe y Puerto Peñasco y por la compra de los cebadores. Al Dr. Alberto Aragón y al M.C. Edgar Alcántara (CIBNOR Guaymas) por las muestras de Guaymas. Al Dr. Daniel Lluch y al M.C. Sergio Peláez por las muestras de Bahía Magdalena.

A la M.C. Yareli Esquer Garrigós por el aislamiento de los microsatélite, por el diseño de los cebadores y por sus valiosos consejos. Por estar al pendiente.

A Rosa María Morelos, por enseñarme a trabajar en el laboratorio. Gracias por todo tu empeño.

A mi querido amigo Ignacio Leyva, por todos sus consejos, por el apoyo tanto académico como moral, por el interés en mi trabajo. Te estoy infinitamente agradecida ¡ANDELE, ANDELE!

A mi amigo David, por apoyo moral y académico durante mi convalecencia.

A la M.C Susana Ávila, a Fernando Aranceta y a Miguel Tripp por sus recomendaciones.

A todo el personal de posgrado y del laboratorio de cómputo por todo su respaldo.

A los amargueitors y suricatos (Vanesa, Jorge conejo, Jorgito, Miguel araña, Scarry, Noé) por todas la fiestas y los buenos ratos que me hicieron pasar. En especial gracias a Nacho y a la suricata bebe (Ale), su amistad es muy valiosa

para mi, gracias por ser mis confidentes, gracias por hacerme ver que no es malo ser un amargueitor. A todos les deseo lo mejor.

Agradezco de manera especial a mi amiga Irma Vaquera y a su familia, por recibirme en su hogar y ayudarme a establecerme en esta ciudad.

A mis amigos y amigas de Guadalajara por estos dos y medio de echarme porras y apoyarme a pesar de la distancia. En especial quiero agradecer a mis comadrejas Vero Palomera y Vero Rosas ¡Por Narnia!!!

Agradezco a mi familia: A mi hermano Sergio Pérez por invitarme a colaborar con él, por ser un excelente hermano, agradezco su infinito apoyo y sus consejos y por recibirme en su casa. Te quiero mucho. A Claudia Ballinez mi cuñis, gracias por su amistad y confianza, hacerme sentir bienvenida y tratarme como una hija mas. A mis papás, por todo lo bueno de mi vida y por las becas Pérez-Castillo que siempre me sacan del brete. A mi hermano Carlos y su familia, por estar al pendiente de mí todo este tiempo.

Y por ultimo pero el más importante, agradezco a mi esposo Alejandro Núñez por ser mi cómplice y mi todo. Sin su apoyo nunca lo hubiera logrado.

Y aquí comienza la ingratitud…

Índice General

1. INTRODUCCIÓN **1**
1.1 Aspectos biológicos 1
1.2 Flujo genético y estructura genética poblacional 3
1.3 Marcadores moleculares: microsatélites 6
2. ANTECEDENTES **7**
3. JUSTIFICACIÓN **9**
4. HIPÓTESIS **10**
5. OBJETIVOS **11**
6. MATERIALES Y MÉTODOS **12**
6.1 Área de recolecta y preservación de muestras 12
6.2 Extracción de ADN genómico. 13
6.3 Aislamiento y caracterización de microsatélites 13
6.4 Pruebas de amplificación mediante *PCR* y estandarización. 14
6.5 Visualización de productos de *PCR* 16
6.6 Análisis Estadístico 16
6.6.1 Variabilidad genética 16
6.6.2 Prueba de desequilibrio de ligamiento 17
6.6.3 Estructura genética poblacional 17
7. RESULTADOS **19**
7.1 Aislamiento y caracterización de microsatélites 19
7.2 Diseño de cebadores y pruebas de amplificación 20
7.3 Análisis estadístico 24
7.3.1 Variabilidad genética 24
7.3.1.1 Número de alelos, heterocigosidad y coeficiente de endogamia 24
7.3.1.2 Incidencia de alelos nulos 25
7.3.1.3 Frecuencias alélicas 25

7.3.1.4 Desequilibrio de ligamiento 26
7.3.2 Estructura genética poblacional 30
8. DISCUSIÓN **32**
8.1 Aislamiento y caracterización de microsatélites 32
8.2 Variabilidad genética 38
8.3 Estructura genética poblacional 42
9. CONCLUSIONES **46**
10. PERSPECTIVAS **48**
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **49**
12. ANEXOS **61**

Lista de Tablas

Tabla I. Resultados de la obtención de microsatélites en las librerías genómicas en base a las sondas utilizadas, clonas secuenciadas, número de microsatélites identificados y porcentaje de éxito obtenido.

Tabla II. Frecuencia en cada genoteca de los motivos de repetición en los microsatélites a los cuales se les pudieron diseñar pares de cebadores para su amplificación por *PCR*.

Tabla III. Loci microsatélites amplificados que coincidieron con el tamaño esperado, especificando la secuencia de los cebadores, la repetición y determinación de polimorfismo (M: monomórfico, P: Polimórfico) y temperatura de alineamiento (°C) para la *PCR*. Se muestran en negritas los dos loci microsatélites que presentaron patrones alélicos legibles.

Tabla IV. Variabilidad genética de *P.globosa* en las localidades (SF: San Felipe; PP: Puerto Peñasco; SF: San Felipe; GU: Guaymas). Se presenta el tamaño de muestra analizado (*N*), número de alelos (n_A) alelos efectivos (n_e), Riqueza alélica (*AR*), heterocigocidad esperada (*He*), heterocigocidad observada (*Ho*) y el índice de fijación (F_{IS}). Los valores en negritas indican desequilibrio de Hardy-Weinberg con P <0.05.

Tabla V. Comparaciones pareadas de los valores de F_{ST} para cada localidad. Debajo de la diagonal se muestra el valor de F_{ST} y por encima de la diagonal el valor de *P*. Los valores en negritas indican que son significativamente diferentes con P< 0.05.

Tabla VI. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de estructura genética poblacional de *P. globosa*. Los valores de *P* indican que los valores de los estadístico *F* no son significativamente diferentes de 0.

Tabla VII. Éxito en la identificación de microsatélites para diferentes especies de moluscos bivalvos.

Lista de Figuras

Fig. 1. Sitios de recolecta (*) de *P. globosa* en el Golfo de California y en la costa occidental de la península de Baja California.

Fig. 2. Patrones de bandeo observados en los seis microsatélites polimórficos identificados. *Loci con patrones alélicos claros en donde a pesar de la presencia de "bandas repetidas" (*stutters*) fue posible identificar organismos homocigotos y heterocigotos. [1]Loci con exceso de bandas por individuo (más de dos), sin un claro patrón para distinguir genotipos. [2]Locus con dos regiones amplificadas (y mas de dos bandas en cada una), en donde en los tamaños esperados se observa baja amplificación.

Fig. 3. Frecuencias alélicas para el locus *Pglo2* en las diferentes localidades analizadas.

Fig. 4. Frecuencias alélicas para el locus *Pglo12* en las diferentes localidades analizadas.

ANEXOS

ANEXO 1. Pares de cebadores diseñados para amplificar por *PCR* regiones microsatélite en *Panopea globosa,* a partir del análisis de secuencias de cinco genotecas enriquecidas con diferentes sondas microsatélite.

1. INTRODUCCIÓN

En México, la pesquería de almeja generosa o almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall 1898), es relativamente reciente, CONAPESCA tiene registros de arribo desde el año 2002 y desde entonces se ha observado un incremento en su captura, siendo su principal mercado el continente asiático. Así por ejemplo, durante 2006 y 2007 la pesquería de almeja generosa fue de 1,171 toneladas (SAGARPA, 2007). En 2008 se registraron aproximadamente 904,727 sólo para el Golfo y 340,186 kilogramos para el Pacífico (www.conapesca.sagarpa.gob.mx).

La información acerca de las poblaciones de *P. globosa* es escasa, desconociéndose que factores o parámetros biológicos pueden influir en la abundancia, distribución y estructura poblacional de la especie. Dada su importancia comercial, así como la presión social por hacer uso del recurso, es primordial generar la información necesaria para el adecuado manejo de *P. globosa* (Aragón-Noriega et al, 2007).

1.1 Aspectos biológicos

Las almejas del genero *Panopea* pertenecen a la Familia Hiatellidae y están entre los bivalvos excavadores más grandes del mundo. La especie que más se ha estudiado es *Panopea generosa* (Gould, 1850), que se distribuye desde el sur de Alaska hasta Baja California, puede alcanzar una longitud de concha de 212 mm y un peso vivo (incluyendo concha) de 3.25 kg (Goodwin y Pease, 1989). Son organismos de vida larga, con una edad media de 20 – 60 años y una edad individual de hasta 168 años (Bureau et al., 2002). Cabe aclarar que por casi 25 años existió un problema de sinonimia en el que de manera equivocada se refería a *P. generosa* como si fuera la extinta *P. abrupta* (Conrad, 1849) (Vadopalas et al., 2010).

Los bivalvos hiatelidos pueden estar enterrados hasta un metro de profundidad en el sustrato, y habitar fondos arenosos, fango-arenosos e incluso en sitios donde

hay una combinación de arena y grava. Los bancos más abundantes de *P. generosa* en Washington ocurren a profundidades cercanas a los 18 metros, en sustratos arenosos y fango-arenosos (Feldman et al., 2004).

P. generosa presenta sexos separados, siendo sexualmente activos entre los 4 y 107 años de edad. En las hembras la edad reproductiva es a los 7 años y en los machos a los 6 años (Andersen, 1971). El período reproductivo inicia a finales de abril y alcanza su máximo a finales de Junio. Las hembras tienen la capacidad de desovar varias veces y llegan a liberar más de 20 millones de huevos. Sus larvas tienen una de las etapas de vida libre más largas entre los moluscos (más de 40 días) antes de fijarse al sustrato, no obstante, el reclutamiento de juveniles es muy bajo (Goodwin, 1976; 1979). Los adultos de esta especie suelen encontrarse agregados, formando bancos con altas densidades de organismos (Goodwin, 1976).

En contraste, *P. globosa* ha sido reconocida como endémica del Golfo de California (Hendrickx et al., 2005; Aragón et al., 2007; Rocha et al., 2010). Sin embargo, es importante señalar que en Bahía Magdalena existía incertidumbre sobre cuál era la especie residente. Actualmente, y derivado de estudios realizados en el CIBNOR, se ha determinado que la especie residente en Bahía Magdalena es *P. globosa*. En uno de estos estudios, se han realizado prospecciones de toda el área de la Bahía y posteriormente muestreos mensuales a lo largo de un año en la parte central que es donde se realiza la captura comercial (González-Peláez, Sergio, Com. Pers.) llegando a la conclusión y con asesoría del taxónomo experto Paul Valentich-Scott, Curador de Malacología del Museo de Historia Natural de Santa Bárbara, Ca. (González-Peláez et al., 2010; González-Peláez, et al., *en preparación*) que la especie es *P. globosa*. De manera paralela, existe otro estudio en curso, en el cual mediante metodologías novedosas de morfometría geométrica (Leyva-Valencia et al., *en revisión*) y análisis con ADNm y nuclear (Leyva-Valencia et al., 2010), en donde se comparan muestras representativas de diferentes localidades de almeja de Sifón, tanto de *P.*

generosa (Baja California) como de *P. globosa (*Golfo de California*)*, la localidad de Bahía Magdalena inequívocamente se agrupó como *P. globosa.* Otra prueba más de que los organismos analizados en el CIBNOR y recolectados directamente en Bahía Magdalena pertenecen a *P. globosa*, fue que en el laboratorio de Genética Acuícola del CIBNOR (Cruz, Pedro CIBNOR, Com. Pers.) los marcadores microsatélites desarrollados para *P. generosa* (Vadopalas y Bentzen, 2000; Kaukinen et al., 2004) no amplificaron en muestras de esta localidad, pero si lo hicieron en muestras de Ensenada, B.C. en donde se reconoce que la especie es *P. generosa*. De ahí la necesidad de desarrollar marcadores específicos para *P. globosa,* lo cual se aborda en el presente estudio de tesis.

El conocimiento acerca de *P. globosa* es incipiente, por ende, las estrategias de manejo pesquero en México se han basado en la información biológica de *P. generosa* (SAGARPA, 2007). Sin embargo, los primeros estudios sobre el desarrollo gametogénico de *P. globosa* señalan periodos reproductivos desfasados entre ambas especies. Por ejemplo, en Washington, E.U.A., *P. generosa* inicia su desarrollo gametogénico en septiembre, alcanzando la madurez gonádica entre abril-mayo, y desovando durante junio-julio, los meses más cálidos del año (15-20 °C) (Goodwin, 1976; Goodwin y Pease, 1989). Por el contrario, en *P. globosa* el ciclo gametogénico comienza en (otoño), cuando la temperatura del agua aún es cálida (20-28 °C) mientras que el desove ocurre en invierno, entre enero y febrero (15-18 °C) (Aragón et al., 2007, Calderón-Aguilera et al., 2010). A pesar de esta diferencia con *P. generosa,* el patrón es consistente con los encontrados para otras especies de bivalvos intermareales que se presentan en el Golfo y se correlaciona con la alta disponibilidad estacional de alimento para las larvas (Villalejo-Fuerte et al., 1996, Calderón-Aguilera et al., 2010).

1.2 Flujo genético y estructura genética poblacional.

La genética de poblaciones es una disciplina que puede ayudarnos a obtener información valiosa con respecto a la ecología de las poblaciones de almeja

generosa que ocurren en las costas de la Península de Baja California y el Golfo de California.

La identificación y caracterización genética de los bancos naturales, son esenciales para asegurar su conservación (Shaklee y Bentzen, 1998). El desarrollo de la genética de poblaciones ha permitido por ejemplo, determinar el aislamiento reproductivo o la ocurrencia de flujo genético entre poblaciones de la misma especie. El estudio del flujo genético, se refiere a todos los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra, este intercambio puede darse en mayor o menor grado, tanto en genes nucleares o en genomas uniparentales como la mitocondria o el cloroplasto, debido al intercambio de gametos, semillas individuos juveniles o adultos, así como por eventos de extinción y recolonización de poblaciones enteras (Shaklee y Bentzen, 1998). El flujo genético es muy importante en la determinación de la estructura de las poblaciones, ya que puede actuar como una fuerza que mantiene integrada a la especie, influyendo en sus procesos ecológicos (Whitlock y McCauley, 1999).

Cuando el flujo genético entre las poblaciones de una especie es alto, todas ellas evolucionan de manera conjunta (a menos que sea contrarrestado por selección o deriva génica), pero si es muy bajo, entonces, comienzan a divergir lo que puede contribuir al aislamiento reproductivo y el establecimiento de linajes evolutivamente independientes.

Prácticamente todos los organismos se caracterizan por formar agregaciones discontinuas de individuos en espacio y tiempo. Las especies que se reproducen sexualmente, típicamente exhiben PANMIXIA (intercambio de gametos al azar) que al menos presentan unidades geográficas o temporales locales, las cuales pueden llegar a establecer ensamblajes de alto nivel. A menudo el flujo genético entre estas unidades geográficas es suficiente para homogenizar las frecuencias alélicas a través del tiempo dentro de estos ensambles de alto nivel, los cuales son llamados “poblaciones” o “stocks” (Shaklee y Bentzen, 1998).

Los stocks son un nivel de organización biológica muy importante porque representan los componentes de adaptación y evolución de las especies, su carácter genético está ampliamente determinado por la interacción del flujo genético (incluyendo la migración), deriva genética y la adaptación (Shaklee y Bentzen, 1998).

La historia de vida de los bivalvos incluye una etapa de larva planctónica, que si bien presenta una capacidad de locomoción, está limitada. Con la ayuda de las corrientes las larvas pueden dispersarse a través de las cuencas oceánicas (Hohenlohe, 2004), contribuyendo a mantener el flujo genético entre poblaciones. En consecuencia, la conectividad e intercambio de variantes alélicas entre las poblaciones de las almejas del género *Panopea* es altamente dependiente de las corrientes oceánicas (Vadopalas y Bentzen, 2000).

En el Noroeste de México, existen características oceanográficas que potencialmente permiten el flujo genético por dispersión larval. En el Golfo de California, la ocurrencia de un giro anticiclónico de noviembre a abril, ocasiona que la corriente cerca de la costa fluya fuertemente hacia el sur del Golfo (Marinone, 2003). El periodo reproductivo de *P. globosa* en el Alto Golfo (Calderón-Aguilera et al., 2010) y en la región central (Aragón-Noriega et al., 2007) coincide con estas corrientes, por lo que se podría potenciar el flujo genético. Por otra parte Bahía Magdalena es una zona de transición templada tropical influenciada por la Corriente de California (CC) con un flujo predominante hacía el ecuador y la Corriente mexicana (CM) con flujo hacía el polo (Hernández-Trujillo et al., 2010) y cuyas temperaturas superficiales oscilan entre 20.3 °C en los meses de enero y febrero y 26.9 °C en agosto y septiembre (Lluch et al., 2000). El flujo potencial entre corrientes del Golfo y las del Pacífico pudiera ser limitado, ya que el encuentro de estas corrientes puede actuar como una barrera.

Estimar la diferenciación genética entre localidades es necesario para entender si se trata de poblaciones aisladas; en especial en las pequeñas poblaciones que

están sujetas a la deriva génica, lo cual afectará su potencial evolutivo debido a la fijación de mutaciones deletéreas (Wright, 1977; Madsen et al., 1996; Higgings y Lynch, 2001). Por tanto, el conocimiento sobre la estructura poblacional ayuda a generar estrategias de conservación y de manejo (Balloux y Lugon, 2002).

1.3 Marcadores moleculares: microsatélites.

Los microsatélites o secuencias de repetición simple SSRs (Simple Sequence Repeats) son regiones de ADN con secuencias cortas de una a seis pares de bases (pb) repetidas en tándem, es decir la misma secuencia una tras otra llegando a medir toda la región hasta 100pb (Schlötterer, 2000). Los microsatélites se clasifican según el motivo de la repetición, pudiendo ser di-, tri-, tetra-, penta- o hexanucleótidos. Estas regiones repetidas se encuentran tanto en procariontes como en eucariontes, aunque inicialmente se descubrieron en el genoma humano (Litt y Luty, 1989; Weber y May, 1989). El origen de tal polimorfismo aún está en debate, aunque aparentemente es debido un proceso de “deslizamiento de hebras” que ocurre durante la replicación del ADN (Schlötterer y Tautz, 1992). Los loci microsatelites son extremadamente polimórficos, pueden presentar decenas de alelos por cada locus y tasas de mutación tan altas como 10^{-3} o 10^{-4}, razón por la que son apropiados para utilizarlos en genética de poblaciones (Zhivotovsky y Feldman, 1995).

Los microsatélites presentan herencia mendeliana y son marcadores codominantes, lo que permite definir loci y diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos, estimar su porcentaje y las frecuencias alélicas de las diferentes variantes en una población (Jarne y Lagoda, 1996).

2. ANTECEDENTES

Para conocer la dinámica y conectividad de poblaciones que están sujetas a explotación, son necesarios estudios sobre los patrones de distribución, abundancia, estructura de edades, crecimiento, reproducción, estructura poblacional, morfología y variabilidad genética, entre otros (Rocha-Olivares et al., 2010).

De las 6 especies actuales del género *Panopea*, los primeros estudios sobre genética de poblaciones han sido realizados con *P. generosa*, así por ejemplo, Van Koeveringe (1998) utilizó la subunidad III de la Citocromo oxidasa (COIII) del ADN mitocondrial, para analizar la estructura genética de esta especie en la Columbia Británica (CB), aunque no logró rechazar la hipótesis nula de panmixia. El autor argumentó que el poder estadístico para detectar subdivisiones fue bajo, debido principalmente a que solo usó un locus y el tamaño de muestra utilizado fue reducido (6.5 individuos en promedio). Vadopalas et al. (2004) analizaron la estructura genética de la población de *P. generosa* en Washington, utilizando 11 loci de aloenzimas y 7 microsatélites. Los autores observaron bajos niveles de diferenciación genética, argumentando que la capacidad de dispersión de las larvas de *P. generosa*, puede estar influenciada por la complejidad hidrológica y batimétrica de la zona de estudio, ocasionando tanto la homogeneidad genética como unlujo genético direccional. Por otra parte Miller et al. (2006) estudiaron la estructura poblacional de *P. generosa* a una escala geográfica mayor, incluyendo la Columbia Británica, su análisis con 8 microsatélites polimórficos, evidenció una correlación entre la divergencia genética y la distancia existente entre los sitios de muestreo, sugiriendo que los resultados se ajustan a un modelo de estructura genética de aislamiento por distancia. Los autores concluyeron que las poblaciones de *P. generosa* presentan intercambio genético a escalas espaciales pequeñas (de 50 a 300 Km) y un flujo genético tipo “stepping stone” a escalas intermedias (de 500 a 1000 Km), además, identificaron

regiones que pueden ser consideradas poblaciones separadas, proponiendo el establecimiento de tres unidades de manejo para la región.

El único estudio sobre variabilidad genética y morfológica entre *P. generosa* y *P. globosa* de México, es el de Rocha-Olivares et al. (2010), en el cual los autores reportaron diferencias morfométricas entre ambas especies. Sus análisis genéticos utilizando marcadores nucleares de ADN ribosomal (5.8S, 18S, ITS-1, ITS-2), mostraron diferencias inter-específicas, con una aparente mayor diversidad genética en *P. globosa* que en *P. generosa*, aunque debido al reducido número de muestras y localidades, no pudieron inferir algún patrón de variación genética intra-específico.

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios recientes realizados en las poblaciones de *P. globosa* han revelado que existen marcadas diferencias tanto ambientales como biológicas, con su congénere *P. generosa*. Por ende la estrategia de manejo que se ha realizado para su explotación pesquera, utilizando los parámetros biológicos de *P. generosa* podría no ser el adecuado para el aprovechamiento racional de este recurso.

Las poblaciones con bajas tasas de reclutamiento y elevada longevidad como en el caso del género *Panopea*, son susceptibles a diversas alteraciones genéticas, por ejemplo, la reducción del éxito reproductivo, deriva génica y depresión por endogamia. Las actividades humanas como la sobreexplotación pesquera y la acuicultura, bien pueden reducir los tamaños poblacionales, comprometiendo la variabilidad y respuesta de las poblaciones a un medio ambiente cambiante.

Para reducir al máximo estos riesgos, es muy importante poder realizar una evaluación de la estructura genética de la población que se quiere explotar comercialmente. La pesquería de *P. globosa* es una actividad relativamente reciente, de tal manera que el estudio de genética poblacional puede proporcionar información relevante sobre la variabilidad genética de sus poblaciones, de la ocurrencia de flujo genético, así como de su estructura poblacional. Esta información podrá ser utilizada en la planeación de estrategias de manejo acordes a las características de esta especie e incluso puede utilizarse para el establecimiento de programas de monitoreo de la variabilidad genética al interior de las poblaciones para determinar el posible impacto de la actividad pesquera o acuícola sobre las mismas.

4. HIPÓTESIS

Considerando las corrientes imperantes en el Golfo de California durante el periodo reproductivo de *Panopea globosa* (invierno), las localidades del Alto Golfo presentarán elevada conectividad, vía larvas planctónicas, siguiendo el giro anticiclónico de las corrientes con un flujo genético en dirección San Felipe-Puerto Peñasco, definiéndose como una sola población. Se presentará cierto flujo genético del Alto Golfo en dirección Guaymas, el cual dependiendo de su magnitud bien podría contribuir a disminuir el proceso de diferenciación genética, ya que el flujo genético en dirección Guaymas-Alto Golfo aparentemente no es posible ya que las corrientes invernales cuando la almeja desova van en dirección norte-sur. Se espera que la población ubicada en Bahía Magdalena en la costa del Pacífico, la cual aparentemente se encuentra en el límite geográfico de la distribución de la especie, se encuentre aislada de las poblaciones del Golfo, representando una población genéticamente diferenciada y por tanto una unidad de manejo diferente.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la variabilidad y estructura genética poblacional de *Panopea globosa* en el Noroeste de México.

5.2 Objetivos particulares

- Aislar, identificar y caracterizar regiones microsatélite a partir de la generación de genotecas enriquecidas.
- Diseñar cebadores específicos para la amplificación de loci microsatélite en *P. globosa* y optimizar su amplificación.
- Determinar la variabilidad genética de *P. globosa* dentro y fuera del Golfo de California.
- Determinar si *P. globosa* presenta estructura genética poblacional.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área de recolecta y preservación de muestras.

Se recolectaron individuos de *Panopea globosa* en tres localidades a lo largo del Golfo de California: San Felipe, BC. (SF), Puerto Peñasco, Son. (PP) y Guaymas, Son. (GU) y una localidad en la costa occidental de la península de Baja California, Bahía Magdalena, BCS. (BM) (Fig.1).

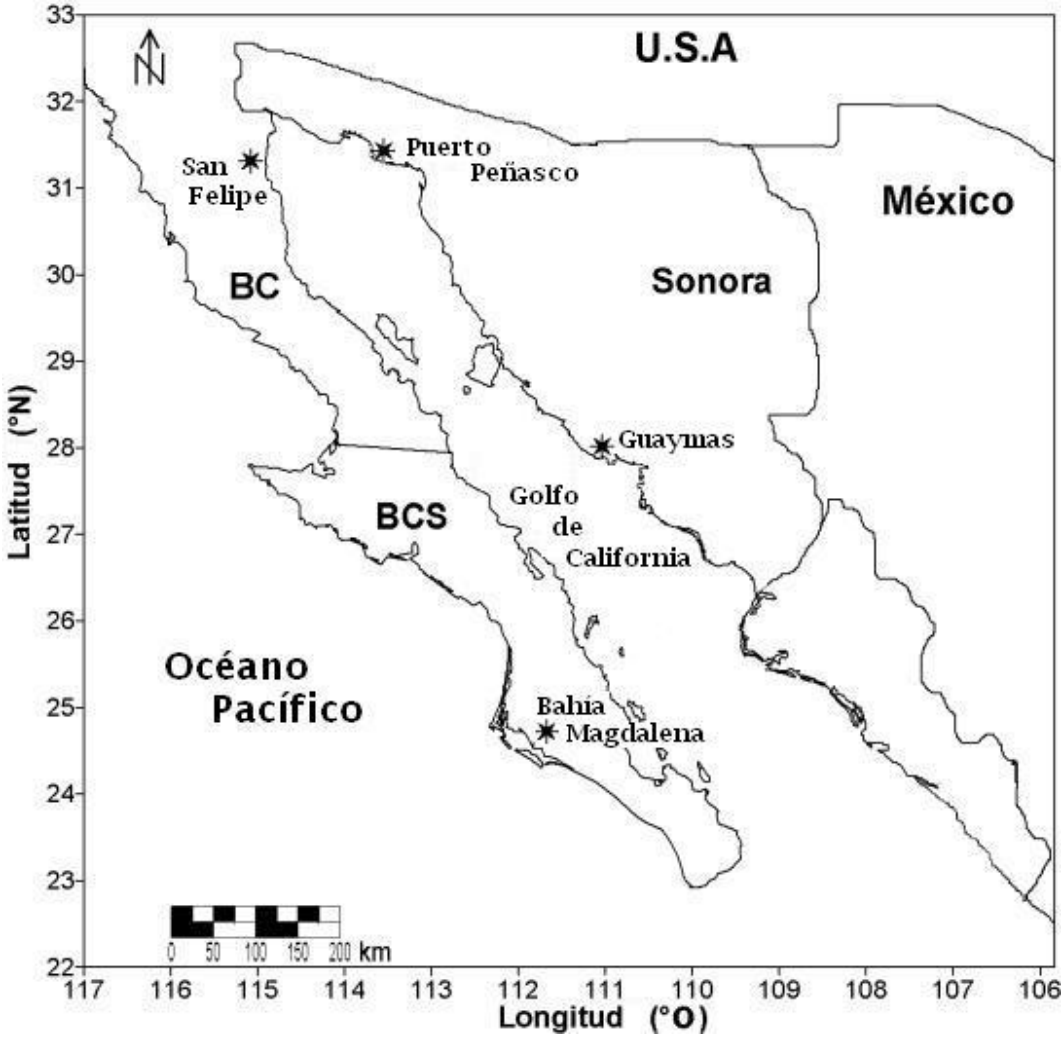

Fig. 1. Sitios de recolecta (*) de *P. globosa* en el Golfo de California y en la costa occidental de la península de Baja California.

En cada localidad se recolectaron 50 individuos a partir de los 20 m de profundidad mediante buceo con compresor y dirigiendo agua a presión para liberar a los organismos del fondo. De los individuos recolectados en PP, GU y BM, se disectó un pequeño fragmento de tejido de sifón. Para los individuos de SF se obtuvo tejido de músculo aductor. Cada fragmento de tejido fue preservado en tubos de microcentrifugación de 1.5 ml. con etanol al 80 % hasta su procesamiento.

6.2 Extracción de ADN genómico.

Se probaron dos protocolos de extracción para la obtención de ADN genómico (Sweijd et al., 1998; Brent Vadopalas Universidad de Washington, *com. per.*) para determinar con cual se obtenía mejor calidad de ADN. Finalmente se utilizó el protocolo propuesto por Sweijd et al. (1998). La concentración de ADN de cada individuo fue determinada con la ayuda de una escalera de bajo peso molecular (Low DNA Mass Ladder, 100-2000 pb. Invitrogen) corriendo en geles de agarosa al 1%, teñidos en bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta BioDoc-It Imaging System (UVP).

6.3 Aislamiento y caracterización de microsatélites.

Se construyeron 5 librerías genómicas enriquecidas con las sondas de hibridación $(CT)_{15}$, $(GT)_{15}$, $(GATA)_{10}$, $(CTGT)_6$ y una mezcla de las sondas $(CT)_{15}$-$(GT)_{15}$ (Mix) empleando la metodología propuesta por Gleen y Schable (2005), la cual se describe a continuación de manera resumida. Primeramente se digirió el ADN genómico con la enzima de restricción RsaI [1µM] (NEBL) para producir fragmentos de distintos tamaños. A estos últimos, se les unió con la ayuda de una ligasa T4 (Boehringer) adaptadores Super SNX24 (5'GTTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATC;

5'pGATTCTGCTAGCTAGGCCTTAAACAAAA) de doble cadena que facilitaron la amplificación por *PCR* de los fragmentos de repetición y la unión del ADN a un vector de clonación (Pcr 4-TOPO, Invitrogen). Posteriormente se emplearon las sondas antes mencionadas marcadas con biotina en su extremo 5´ para recuperar los fragmentos de ADN que contenían las secuencias microsatélite complementarias a estas sondas y que se recuperaron después de su amplificación por *PCR* mediante perlas magnéticas (Dynabeads M-280, Invitrogen). En seguida, se realizaron una serie de lavados con soluciones a diferentes astringencias para obtener únicamente los fragmentos enriquecidos con microsatélites. La cantidad de fragmentos enriquecidos se incrementó mediante amplificación por *PCR* y se clonaron empleando un kit comercial (TOPO TA Cloning Kit for sequencing, Invitrogen). En base a este sistema de clonación, todas las clonas que crecieron resultaron ser recombinantes y fueron secuenciadas en analizador automático ABI PRISM 3730XL (MACROGEN, Korea) y analizadas empleando los programas de cómputo, Chromas v.1.31 (Technelysium Pty Ltd) y Sequencher v.4.1. (Gene Codes Corporation). Finalmente se diseñaron cebadores utilizando el programa de cómputo PRIMER 3 v.0.4. (Rozen y Skaletky, 2000).

6.4 Pruebas de amplificación mediante *PCR* y estandarización.

A partir de 192 clonas secuenciadas se lograron diseñar 36 pares de cebadores. Para estandarizar la amplificación por *PCR* de las 36 regiones microsatélite, se usó el ADN genómico de 3 individuos de *P. globosa* de Puerto Peñasco, probando un gradiente de temperatura entre los 48-60 °C. En los casos en los que los pares de cebadores no mostraron productos de amplificación se incrementó hasta 5 veces más el $MgCl_2$ (7.5mM) y hasta 6 veces más la polimerasa Taq. Se manejaron reacciones de *PCR* de 10 µl de volumen final bajo las siguientes concentraciones:

Concentración final	Reactivo
1-50 ng/µl	ADN genómico
1 X	Buffer
1.5-7.5 mM	$MgCl_2$
0.2 mM	dNTPs
0.5 µM	Cebadores (sentido y antisentido)
0.2 mg/ml	BSA
0.024-0.15 U/µl	Taq Polimerasa

Se afora a 10 µl con agua MilliQ

Los ciclos del termociclador (Icycler BIORAD) para la *PCR* en gradientes de temperatura se establecieron con una desnaturalización inicial por 5 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 45 s a 4 diferentes temperaturas de alineación (48,52.6,57.9 y 60 °C), y 45 s a 72 °C. Finalmente con una extensión de 10 minutos a 72 °C.

Los pares de cebadores que mostraron producto a determinada temperatura de alineamiento, concentración de cloruro de magnesio y polimerasa taq se probaron en seis individuos provenientes de diferentes localidades de muestreo, incluyendo los tres individuos de Puerto Peñasco, dos más de San Felipe y uno de Guaymas con los que se afinaron aún más las condiciones para la *PCR* y se detectaron los loci polimórficos. En los loci en los que se observaron mas de dos bandas por individuo, posiblemente atribuibles a bandas repetidas (*stutters*) y/o productos inespecíficos se probó la amplificación propuesta por Yoshida et al. (2005), que incluye una desnaturalización inicial de 0 segundos a 94°C, seguido por cinco ciclos de desnaturalización a 94°C por cinco segundos, alineamiento a 59°C por 60 segundos y extensión a 59°C por 60° y posteriormente 20 ciclos con desnaturalización a 94°C por 0 segundos, extensión a 59°C por 60 segundos y alineamiento a 59°C por 60 segundos. Por último, se dejó a 59°C durante una hora.

6.5 Visualización de productos de *PCR*

Los productos de *PCR* junto con una escalera de 10-pb (10 bp DNA Ladder, Invitrogen) fueron analizados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5% y urea al 7.5 M, corriendo por electroforesis en cámaras verticales de secuenciación manual (Owl Separation Systems) a 70 y 90 watts (geles de 20 cm x 45 cm, y 34 cm x 45 cm, respectivamente) por aproximadamente 2.5 horas. Los geles fueron teñidos con Sybr Gold (Rodzen et al., 1989) y visualizados en un scanner FMBIO III Multi Viex (HITACHI).

6.6 Análisis Estadístico

6.6.1 Variabilidad genética.

Se generaron bases de datos que incluían los genotipos de los individuos de cada localidad para los dos loci microsatélite analizados, usando la utilidad MS Tools (Park, 2001) para el programa Excell (2003). Dicha utilidad genera los formatos específicos para analizar los datos en los diferentes programas manejados. Se revisaron los errores genotípicos (alelos nulos, “bandas fantasma” o *stutters*, “*allelic drop out*”, y errores tipográficos) mediante el programa Micro-Cheker ver 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004).

Para cada localidad se obtuvieron los niveles de variabilidad genética expresada en términos de número de alelos (n_A), heterocigosidad esperada (*He*) y heterocigosidad observada (*Ho*) usando el programa ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier et al., 2005); así como el índice de fijación (*Fis*) para lo cual se utilizó el programa FSTAT ver 9.2.3. (Goudet, 2001). Se calcularon los alelos efectivos (n_e), tal como se describe en Hartl y Clark (1997); en donde n_e = 1/sumatoria de la homocigosidad esperada.

Para cada locus en cada localidad se determinó si existía ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), en base a la comparación de la *Ho y He*, en el programa

ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier et al., 2005). Se realizó una corrección de Bonferroni para ajustar el valor critico de significancia (Rice, 1989).

Se estimó la riqueza alélica (*AR*) para cada localidad mediante el método de rarefracción, el cual considera el tamaño mínimo de muestra, utilizando el programa FSTAT ver 9.2.3. (Goudet, 2001).

Se determinó si existían diferencias en las frecuencias alélicas entre localidades mediante el programa GENEPOP 4.0 (Raymond y Rousset, 1995). Este programa prueba la hipótesis nula de que los alelos se encuentran en igual frecuencia en todas las poblaciones analizadas utilizando pruebas exactas de Fisher de manera pareada entre poblaciones. El análisis se basa en algoritmos de cadenas de Markov. Los parámetros establecidos fueron 10,000 desmemorizaciones, 1000 batches y 5,000 iteraciones. Se realizó una prueba secuencial de Bonferroni para ajustar el valor crítico de significancia (Rice, 1989).

6.6.2 Prueba de desequilibrio de ligamiento.

Se determinó el desequilibrio de ligamiento entre los loci utilizando el programa ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier et al., 2005) comparando ambos loci en cada localidad. La hipótesis nula de dicha prueba establece que los genotipos de un locus son independientes de los genotipos de otro locus. Se realizó una corrección de Bonferroni para ajustar el valor crítico de significancia (Rice, 1989).

6.6.3 Estructura genética poblacional.

Se verificó la estructura genética a partir de las estimaciones del índice de fijación F_{ST} de manera pareada entre localidades mediante el programa ARLEQUIN ver. 3.1

(Excoffier et al., 2005). El cálculo del estadístico F_{ST} permite determinar las diferencias genéticas entre las localidades en donde los valores de F_{ST}= 0 indican que no hay diferenciación genética entre ambas localidades, mientras que los valores estadísticamente diferentes a 0 son un indicativo de diferenciación poblacional, es decir presencia de estructura genética. Se realizó una corrección secuencial de Bonferroni para ajustar el valor crítico de significancia en las pruebas múltiples (Rice, 1989).

Se calculó el valor global de F_{ST}, al realizar un análisis de varianza molecular (AMOVA por sus siglas en ingles) global, sin determinar grupos o jerarquías. Para determinar la variabilidad genética contenida dentro y entre agrupaciones de localidades se realizaron AMOVAs jerárquicos con el programa ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier et al., 2005). En base a las significancias de las comparaciones pareadas de F_{ST}, se realizaron tres AMOVA, en donde las localidades se agruparon siguiendo diferentes criterios, los cuales se describen a continuación:

a) Localidades dentro del Golfo (SF-PP-GU) *vs* localidad al Pacífico (BM)
b) Alto Golfo (SF-PP) *vs* (GU-BM)
c) Alto Golfo (SF-PP) *vs* GU vs BM

7. RESULTADOS

7.1 Aislamiento y caracterización de microsatélites

De las 5 librerías genómicas generadas con las diferentes sondas, se obtuvieron y secuenciaron 192 clonas, de las cuales 119 contenían repeticiones microsatélite que variaron de acuerdo al tipo de sonda empleada. En las secuencias enriquecidas con las sondas $(CT)_{15}$ y $(GT)_{15}$ se identificaron 18 y 5 regiones microsatélite respectivamente, mientras que para $(GATA)_{10}$ solo se identificó una secuencia y para $(CTGT)_6$ se encontraron 53. En el caso del enriquecimiento con la sonda mixta $(CT)_{15}$-$(GT)_{15}$ se identificaron 42 secuencias con repeticiones microsatélite (Tabla I). El porcentaje total de clonas con microsatélites en relación al número de clonas secuenciadas resultó del 62%. (Tabla I).

Tabla I. Resultados de la obtención de microsatélites en las librerías genómicas en base a las sondas utilizadas, clonas secuenciadas, número de microsatélites identificados y porcentaje de éxito obtenido.

Librería genómica	Clonas secuenciadas	Microsatélites obtenidos	Porcentaje de éxito[1] en la obtención de microsatélites (%)
$(CT)_{15}$	50	18	36
$(GT)_{15}$	12	5	41.67
$(GATA)_{10}$	10	1	10
$(CTGT)_6$	74	53	71.62
$(CT)_{15-(}GT)_{15}$	46	42	91.30
Total	192	119	62

[1]Éxito en la obtención de microsatélites = (microsatélites obtenidos / clonas secuenciadas)100.

7.2 Diseño de cebadores y pruebas de amplificación

De las secuencias que contenían microsatélites se descartaron 83 para el diseño de cebadores debido a tres razones principales: *a)* las secuencias, aun cuando se observaban regiones microsatélite, no fueron de buena calidad; *b)* el motivo de repetición se encontraba muy cerca de la región que incluye parte de la secuencia del vector de clonación + el adaptador SuperSNX24; y *c)* las zonas flanqueantes a la zona de repetición contenían largas secuencias de poli-A o Poli-T. De las secuencias restantes se diseñaron 36 pares de cebadores para ser sintetizados (ANEXO I).

En la tabla II se analiza la frecuencia y composición de los motivos de repetición en las 36 clonas que presentaron regiones microsatélite. Sobresale la presencia de microsatélites de dinucleótidos, los cuales fueron exclusivamente $(CT)_n$ y $(GT)_n$ (52.78 %), y efectivamente identificados principalmente en las tres genotecas en que se usaron sondas con esos motivos de repetición. También se observó una elevada proporción de tetranucleótidos (44.44 %) en su mayoría identificados con la sonda $(CTGT)_6$. Solamente se identificó un microsatélite trinucleótido (2.78 %).

En cuanto al rendimiento en la obtención de microsatélites de cada genoteca no hubo una relación directa en cuanto al número de microsatélites obtenidos, y el número de cebadores que se lograron diseñar; por decir, en la genoteca con el mayor éxito en la obtención de microsatélites, $(CT)_{15}$-$(GT)_{15}$, se obtuvieron 42 microsatélites (Tabla I) y se lograron diseñar 9 pares de cebadores (Tabla II), número muy similar a los cebadores diseñados (8) con la genoteca $(CT)_{15}$, en la cual se obtuvieron menos microsatélites (18). Para el caso de los tetranucleótidos, si se observó una mayor correlación; la genoteca $(CTGT)_6$, en la cual se presentó el mayor número de regiones microsatélites (53) (Tabla I), se lograron diseñar el mayor número de pares de cebadores (16) (Tabla II).

Tabla II. Frecuencia en cada genoteca de los motivos de repetición en los microsatélites a los cuales se les pudieron diseñar pares de cebadores para su amplificación por *PCR*.

Genoteca	**Di-**		**Tri-**		**Tetra-**		**Total por genoteca**
					Nucleótidos		
$(CT)_{15}$	$(CT)_n$	6	$(CAA)_n$	1	$(CCGA)_n$	1	8 (22.22 %)
$(GT)_{15}$	$(GT)_n$	2					2 (5.56 %)
$(GATA)_{10}$					$(GATA)_n$	1	1 (2.78 %)
$(CTGT)_6$	$(CT)_n$ $(GA)_n(GT)_n$	1 1			$(CTGT)_n$	14	16 (44.44 %)
$(CT)_{15}$-$(GT)_{15}$	(CT) (GT)	7 2					9 (25.00 %)
Total	19 (52.78 %)		1 (2.78 %)		16 (44.44 %)		36 (100.00 %)

De los 36 cebadores analizados en tres y posteriormente en seis individuos, 23 fueron eliminados debido a tres razones: *a)* no se observó amplificación bajo ninguna de las condiciones de *PCR* empleadas; *b)* los productos amplificados no correspondían con el tamaño (pb) esperado; o *c)* amplificaban bandas inespecíficas. Los 13 pares de cebadores restantes amplificaron productos del tamaño esperado. Posteriormente, 7 microsatélites fueron descartados ya que resultaron monomórficos (Tabla III). Seis microsatélites fueron polimórficos, de los cuales, solamente dos, (*Pglo2* y *Pglo12*), presentaron patrones alélicos legibles (Tabla II). En la figura 2 se pueden observar los geles con los seis microsatélites polimórficos, incluyendo los cuatro loci con patrones alélicos difíciles de interpretar (*Pglo 9, Pglo 20, Pglo 28,* y *Pglo 31*). En estos cuatro loci, las estrategias recomendadas para eliminar bandas extras (Yoshida et al., 2005) no fueron suficientes para obtener patrones sencillos de bandeo.

Tabla III. Loci microsatélites amplificados que coincidieron con el tamaño esperado, especificando la secuencia de los cebadores, la repetición y determinación de polimorfismo (M: monomórfico, P: Polimórfico) y temperatura de alineamiento (°C) para la *PCR*. Se muestran en negritas los dos loci microsatélites que presentaron patrones alélicos legibles.

Locus	**Secuencia de cebador 5'- 3'**	**Repetición**	**P/M**	**Tamaño esperado pb**	**T(C°)**
Pglo2	F:ACATATCAAATATACATCTGGTC R:GTTTAAGGGTCTCGTGG	**$(AG)_{32}$**	**P**	**114**	**55**
Pglo6	F:GTTCTCCGTGATCGAGTGGT R:TTGGTGGAGGAAAACCTCAG	$(CT)_2CG(CT)_2GT$	M	182	55
Pglo7	F:GCTTAGACTACTGCCTCAAG R:CAAACGGTAACCATGTTC	$CATA(CAA)_4CATACAA$	M	143	55
Pglo9	F:GTATGTGTTTCCAGCATAGTG R:AAGGTGACATCAATAACGAG	$(GT)_{56}$	P	265	52
Pglo12	F:CATCCACCTATCCGGTAAG R:CACGTAAACGATATATCTGCAC	**$(CTGT)_7$ $(CTGC)_3$**	**P**	**173**	**50**
Pglo16	F:GTTACCGCCTTGGAACG R:ACGCCTACCTAAAGCCCA	$(GA)_3(GT)_9$	M	343	55
Pglo20	F:GCACCAAGTTTGAAGTCAATC R:CTTACTCCAGGTGACGCTCTAG	$(CAGA)_6(GT)_{12}GAAA(GA)_{10}$	P	207	55
Pglo22	F:CATAGAGGCAGAAAGAAGGT R:AGGACCACCCACTAGCA	$(ACAG)_{13}$	M	212	48
Pglo23	F:AAGTTAAGGACTATAACGGCAGA R:CGTGAACATTACTGACAAAAGA	$(ACAG)_{13}$	M	250	52
Pglo28	F:GAGTTAATCGAAAGAGCACTG R:AACGCAACCTCTCCTAGTT	$(GT)_{21}$	P	184	55
Pglo31	F:ACGGAATGTCATTTCATCAG R:GCAACCTCTCCTAGTTTCG	$(AG)_{25}$ $(AG)_{19}$	P	150	55
Pglo33	F:CAGAATCCGCTAGAGATCA R:ATGCAGATAATACACAAACGA	$(CT)_{39}$	M	208	55
Pglo36	F:CATGAGGTTAGGAACGAA R:AGCTGTAATGTTAGACCGA	$(CT)_4GT(CT)_{23}$	M	262	48

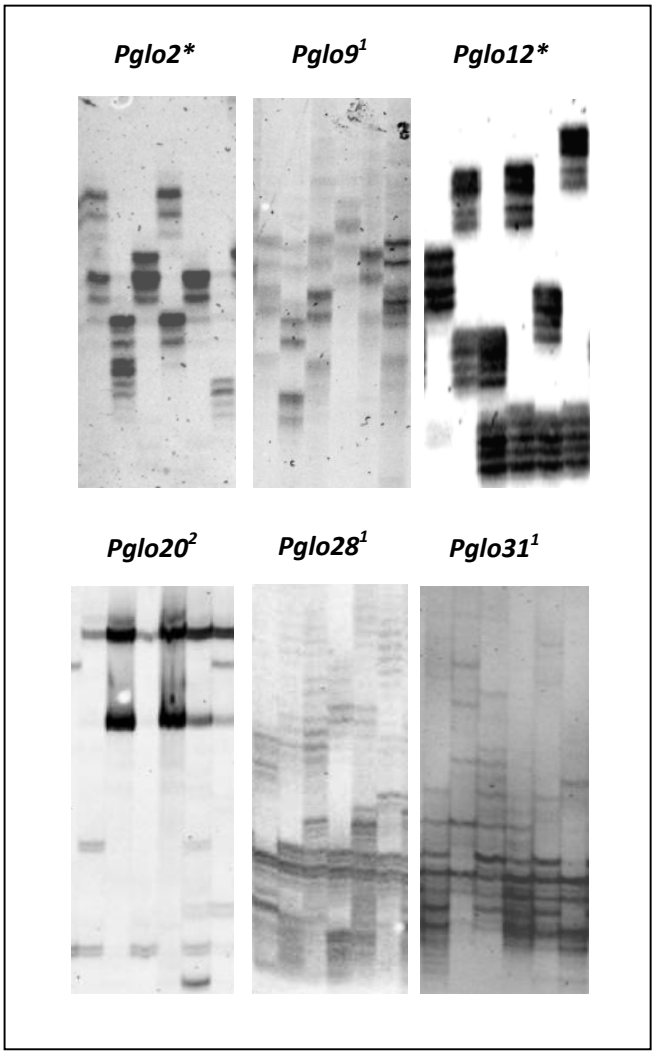

Fig. 2. Patrones de bandeo observados en los seis microsatélites polimórficos identificados. *Loci con patrones alélicos claros en donde a pesar de la presencia de "bandas repetidas" (*stutters*) fue posible identificar organismos homocigotos y heterocigotos. [1]Loci con exceso de bandas por individuo (más de dos), sin un claro patrón para distinguir genotipos. [2]Locus con dos regiones amplificadas (y mas de dos bandas en cada una), en donde en los tamaños esperados se observa baja amplificación.

Las reacciones para la amplificación del microsatélite *Pglo2* en la totalidad de las muestras de cada localidad se llevaron a cabo en volúmenes de 10µl, con concentraciones finales de 1-50 ng/µl de ADN genómico, 0.5 µM de cada cebador, buffer 1X, $MgCl_2$ 2mM, 0.2 mM de dNTPs, BSA 0.2 mg/ml, Taq polimerasa 0.024 U/µl. Los ciclos programados en el termociclador fueron los previamente descritos en la metodología.

Para el microsatélite *Pglo12* también se llevaron a cabo reacciones en volúmenes de 10µl con las siguientes concentraciones: 1-50 ng/µl de ADN genómico, 0.5 µM de cada cebador, buffer 1X, $MgCl_2$ 7.5 mM, 0.2 mM de dNTPs, BSA 0.2 mg/ml, Taq DNA polimerasa 0.15 U/µl. Para este microsatélite, sobresale la elevada cantidad de cloruro de magnesio y taq polimerasa para obtener suficiente producto. Los ciclos programados en el termociclador fueron los manejados en la metodología, a excepción de la temperatura de alineamiento (50 °C).

7.3 Análisis estadístico

7.3.1 Variabilidad genética

7.3.1.1 Número de alelos, heterocigosidad y coeficiente de endogamia.

En las localidades para los dos loci analizados se encontraron en promedio de 12 a 15 alelos (n_A), la riqueza alélica (*AR*) promedio se observó entre 10 y 12.4 mientras que el número promedio de alelos efectivo (n_e) se encontró entre 6.11 y 8.83. Para todos estos estimadores BM presentó los valores mayores, mientras que PP los menores (Tabla IV).

Se observó una heterocigosidad observada (*Ho*) entre 0.62 y 0.82 y una heterocigosidad esperada (*He*) entre 0.84 y 0.90. Nuevamente BM presentó los mayores valores de variabilidad (*Ho*=0.82, *He*=0.9) y PP los menores (*Ho*=0.625,

He=0.84). A partir de la comparación entre heterocigosidades observadas y esperadas, se observa que solo el locus *Pglo2* en SF se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Todos los valores del índice de fijación (F_{is}) fueron significativamente diferentes de 0, lo que nos indica que todas las localidades presentaron déficit de heterocigotos. (Tabla IV). La localidad con el menor valor promedio de F_{is} fue BM (0.0865), en tanto que PP presentó el valor más alto (0.2675).

7.3.1.2 Incidencia de alelos nulos.

El análisis de la distribución esperada de homocigotos en cada loci (Micro-Checker ver. 2.2.3), sugirió la presencia de alelos nulos en la mayoría de los loci en las cuatro localidades, a excepción de *Pglo2* en BM y *Pglo12* en PP y BM; de tal manera que BM fue la única localidad que no presentó alelos nulos para ambos loci.

7.3.1.3 Frecuencias alélicas.

En las figuras 3 y 4 se presentan las frecuencias alélicas para los loci *Pglo2* y *Pglo12* respectivamente, para cada localidad. Para el locus *Pglo2* sobresale el alelo 104 el cual fue prácticamente el más abundante en PP, SF y GU (0.23-0.33), mientras que en BM el alelo más abundante fue el 106 (0.18). En las localidades del Alto Golfo (PP y SF), el segundo alelo más frecuente fue 108, (0.25, 0.15, respectivamente). Tanto en GU como en BM se observa un incremento en el alelo 116 (0.15), convirtiéndose en el segundo alelo mas frecuente. De esta manera, el patrón general de las frecuencias alélicas para el locus *Pglo2*, es más similar entre SF y PP, que entre GU y BM. La prueba exacta de Fisher determinó que las frecuencias alélicas después de un ajuste secuencial de Bonferroni ($P < 0.016$), eran significativamente diferentes entre las dos localidades del Alto Golfo (SF y PP) con respecto a BM, y entre PP y GU.

En el locus *Pglo12*, el alelo más abundante no fue el mismo para las cuatro localidades. En SF los alelos 168 (0.18) y 176 (0.18) fueron los mas frecuentes seguidos muy de cerca por los alelos 172 (0.15) y 174 (0.17). En cambio en la otra localidad del Alto Golfo (PP), el alelo 174 fue el más abundante (0.26) seguido del alelo 178 (0.17). En GU y BM, si se observaron los mismo alelos mas abundantes, 178 (0.31-0.20) y 174 (0.14 y 0.17), resumiéndose finalmente en un patrón de frecuencias alélicas mas similar entre estas dos localidades. La prueba exacta de Fisher, después del ajuste de Bonferroni, ($P < 0.05$) no detectó diferencias significativas entre ninguna de las localidades.

Una prueba exacta de Fisher, considerando las frecuencias alélicas de ambos loci de manera simultanea, después de un ajuste secuencial de Bonferroni ($P < 0.0125$) determinó diferencias significativas entre BM con respecto a las dos localidades del Alto Golfo (PP y SF).

7.3.1.4 Desequilibrio de ligamiento.

Los resultados de esta prueba, después del ajuste de Bonferroni ($P < 0.0125$) indicaron que no hay desequilibrio de ligamiento entre los dos loci en ninguna de las localidades.

Tabla IV. Variabilidad genética de *P.globosa* en las cuatro localidades (SF: San Felipe; PP: Puerto Peñasco; SF: San Felipe; GU: Guaymas). Se muestra el tamaño de muestra analizado (*N*), número de alelos (n_A) alelos efectivos (n_e), Riqueza alélica (*AR*), heterocigocidad esperada (*He*), heterocigocidad observada (*Ho*) y el índice de fijación (F_{IS}). Los valores en negritas indican desequilibrio de Hardy-Weinberg con P <0.05.

Localidad	**Estimador**	**Locus**		
		Pglo2	***Pglo12***	**Promedio**
SF	***N***	42	33	37.5
	n_A	16	10	13
	n_e	7.94	6.95	7.44
	AR	13.06	9.17	11.11
	Ho	0.74	0.67	0.70
	He	0.89	**0.86**	0.87
	F_{IS}	0.16	0.23	0.20
PP	***N***	42	39	40.5
	n_A	12	13	12.5
	n_e	4.96	7.26	6.11
	AR	9.57	11.33	10.45
	Ho	0.48	0.77	0.62
	He	**0.81**	**0.87**	0.84
	F_{IS}	0.41	0.12	0.26
GU	***N***	42	21	31.5
	n_A	16	10	13
	n_e	8.97	6.13	7.55
	AR	13.29	10	11.64
	Ho	0.76	0.62	0.69
	He	**0.9**	**0.86**	0.88
	F_{IS}	0.15	0.28	0.21
BM	***N***	47	38	42.5
	n_A	16	14	15
	n_e	9.54	8.11	8.8
	AR	12.53	11.55	12.04
	Ho	0.85	0.79	0.82
	He	**0.91**	**0.89**	0.9
	F_{IS}	0.06	0.11	0.08
Promedio	***N***	43.25	32.75	38
	n_A	15	11.75	13.37
	n_e	7.85	7.11	7.48
	AR	12.11	10.51	11.31
	Ho	0.70	0.71	0.71
	He	0.87	0.87	0.87
	F_{IS}	0.33	0.188	0.26

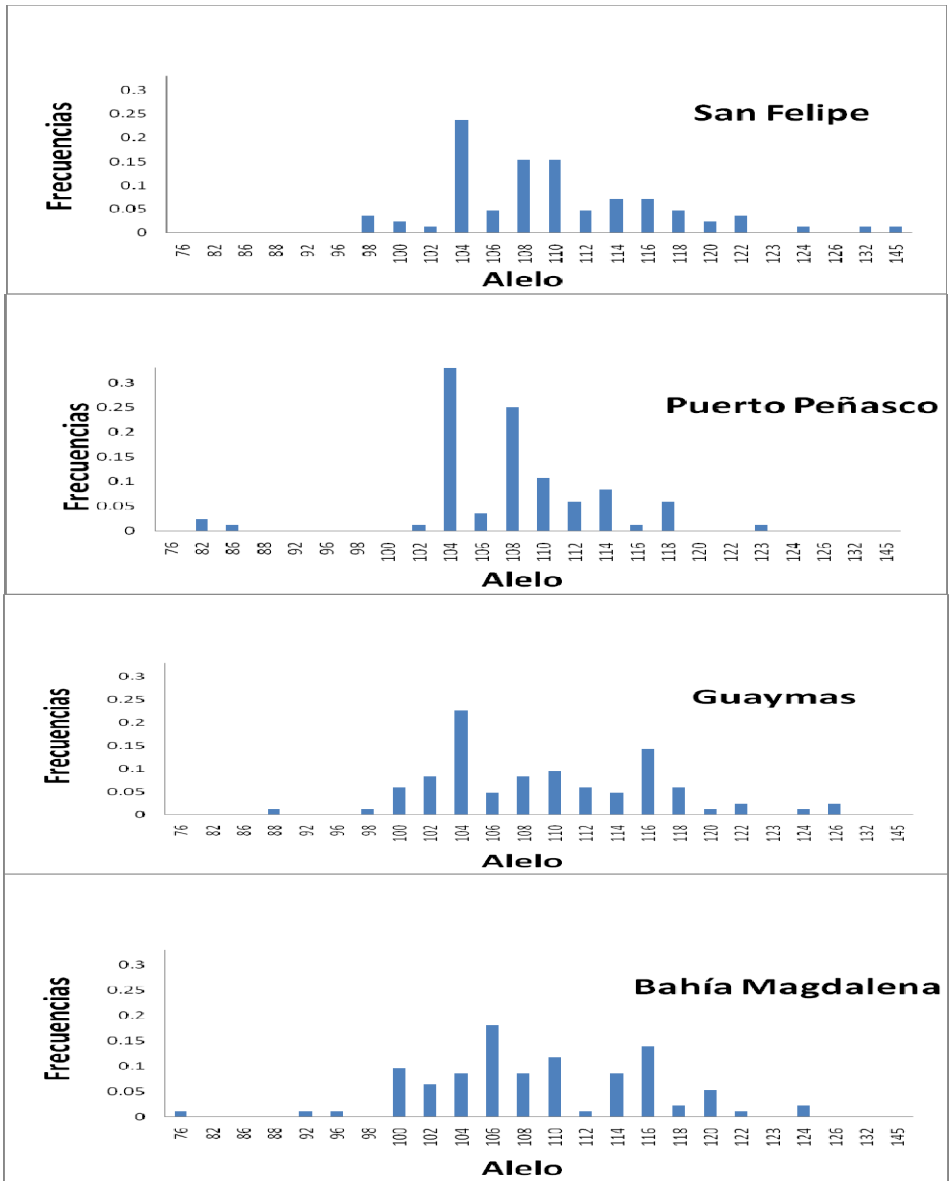

Fig. 3. Frecuencias alélicas para el locus *Pglo2* en las diferentes localidades analizadas.

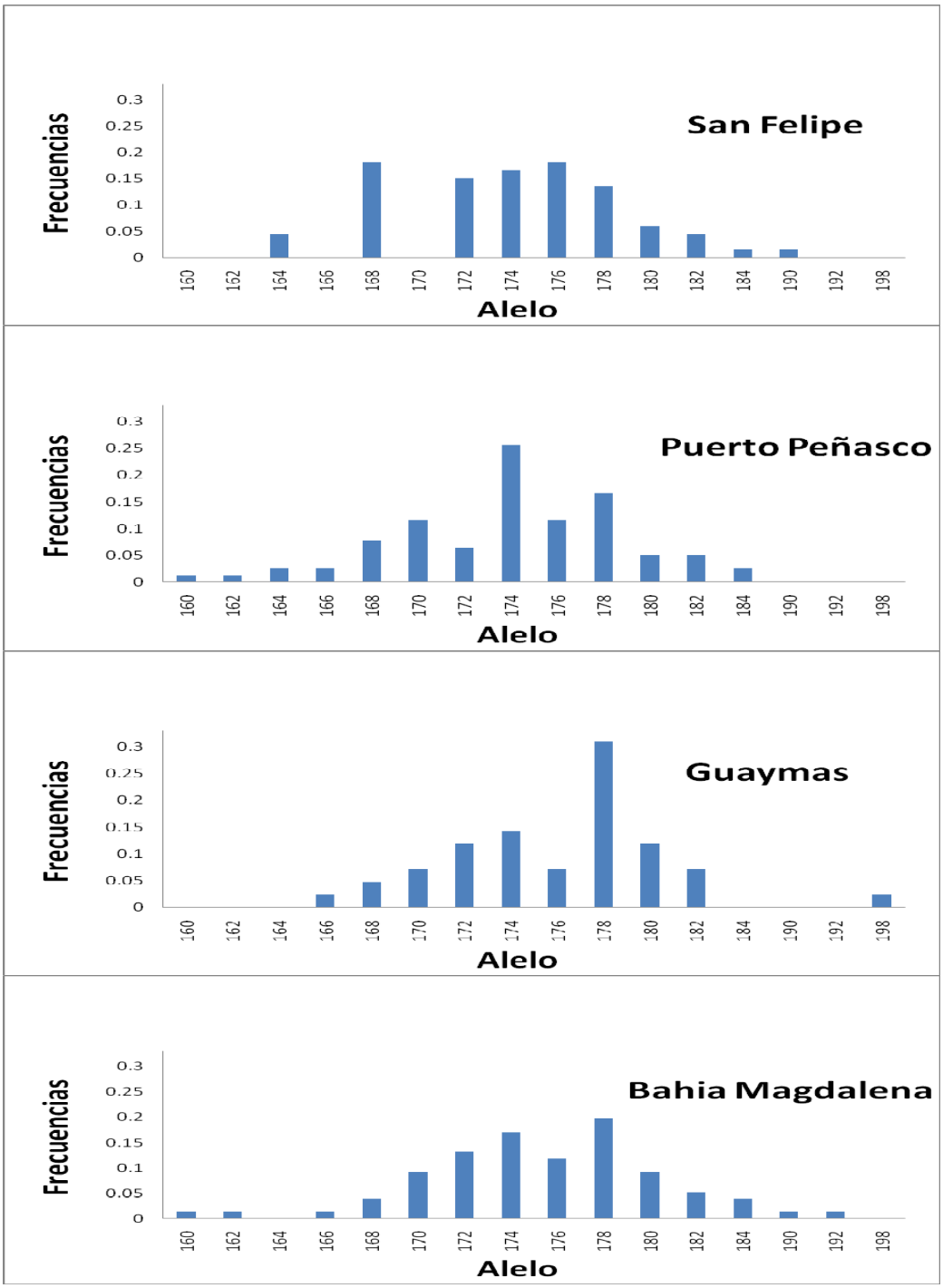

Fig. 4. Frecuencias alélicas para el locus *Pglo12* en las diferentes localidades analizadas.

7.3.2 Estructura genética poblacional

Se observaron valores pareados de F_{ST} estadísticamente significativos entre BM y las dos localidades del Alto Golfo, SF y PP, lo que indica diferenciación genética poblacional. De todas las comparaciones el mayor valor de F_{ST} se observó entre PP y BM (0.036) (Tabla V). Las tres localidades del Golfo de California no se diferenciaron genéticamente, con valores pareados de F_{ST} = 0. La localidad geográficamente intermedia (GU) no se diferenció genéticamente con las dos localidades del Alto Golfo, ni con BM.

Tabla V. Comparaciones pareadas de los valores de F_{ST} para cada localidad. Debajo de la diagonal se muestra el valor de F_{ST} y por encima de la diagonal el valor de *P*. Los valores en negritas indican que son significativamente diferentes con P< 0.05

	SF	PP	GU	BM
SF	-	0.294	0.961	**0.004**
PP	0.004	-	0.997	**0.000**
GU	0.000	0.000	-	0.995
BM	**0.018**	**0.036**	0.000	-

El análisis de varianza molecular (AMOVA) sin hacer agrupaciones mostró un valor global de F_{ST} de 0.0134, el cual estuvo próximo a la significancia estadística (P = 0.0564). Los AMOVAs jerárquicos (Tabla VI) mostraron que el mayor porcentaje de variación en cada uno de los grupos probados se encontró dentro de las poblaciones con valores hasta del 100% del total de la varianza, sin embargo los valores de F_{ST} y la varianza no fueron significativos.

Ninguna de las agrupaciones formadas para encontrar estructura genética entre las localidades (Golfo de California *vs* Pacífico, PP-SF *vs* BM-GU, PP-SF *vs* BM *vs*

GU) mostró algún valor significativo para los índices de fijación (F_{CT}), sin embargo se puede observar que la agrupación formada por el Golfo de California *vs* Pacífico mostró los valores mayores (F_{CT}= 0.02671), seguida de valores menores en las otras dos agrupaciones probadas, lo que podría estar indicando que BM es una localidad distinta al resto (Tabla VI).

Tabla VI. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de estructura genética poblacional de *P. globosa*. Los valores de *P* indican que los valores de los estadísticos *F* no son significativamente diferentes de 0.

Estructura probada	**Fuente de variación**	**Varianza**	**% de variación**	**Estadístico *F***	**Valor *P***
Golfo de California *vs* Pacífico	Entre grupos	0.01632	2.67	F_{CT}= 0.02671	0.25
	Dentro de los grupos	-0.00885	-1.45	F_{SC}= -0.01488	0.99
	Dentro de las poblaciones	0.60367	98.78	F_{ST}= 0.01222	0.60
PP-SF *vs* BM-GU	Entre grupos	0.00958	1.58	F_{CT}= 0.01579	0.33
	Dentro de los grupos	-0.00679	-1.12	F_{SC}= -01137	0.98
	Dentro de las poblaciones	0.60367	99.54	F_{ST}= 0.01579	0.60
PP-SF *vs* BM-GU	Entre grupos	-0.00401	-0.66	F_{CT}= -0.00665	0.67
	Dentro de los grupos	0.00295	0.49	F_{SC}= 0.00486	0.29
	Dentro de las poblaciones	0.60367	100.18	F_{ST}= -0.00176	0.61

8. DISCUSIÓN

8.1 Aislamiento y caracterización de microsatélites.

El porcentaje de éxito en la obtención de microsatélites mediante la estrategia de enriquecimiento empleada en éste trabajo fue del 62 % (Tabla I). Este valor concuerda con el valor de éxito que generalmente ha sido reportada en otros trabajos, la cual varía entre 20 y 90% (Zane et al., 2002). En la Tabla VII se compara el éxito obtenido, expresado en porcentaje de microsatélites identificados, entre diferentes especies de moluscos bivalvos; en donde se observa un intervalo de 43.94 % (*Crassostrea corteziensis*) a 93.94 % (*Panopea generosa*).

De forma particular, el porcentaje de éxito en la obtención de microsatélites fue variable entre las cinco librerías genómicas generadas por enriquecimiento con diferentes sondas. Las genotecas con mayor porcentaje fueron las de la sonda $(CTGT)_6$ y la mezcla de sondas $(CT)_{15}$-$(GT)_{15}$, mientras que las sondas $(GT)_{15}$, $(CT)_{15}$ y $(GATA)_{10}$ presentaron los valores más bajos. El éxito tan dispar en la obtención de microsatélites entre las diferentes genotecas pareciera contradictorio, sobre todo si se compara el elevado éxito con las sondas mezcladas $(CT)_{15}$-$(GT)_{15}$ (91.30 %) con el moderado éxito obtenidos en las genotecas con las sondas $(CT)_{15}$ (36 %) y $(GT)_{15}$ (41.67) por separado, ya que en esencia se estaban buscando las mismas regiones microsatélite (CT y/o GT). Lo anterior, se podría explicar debido a que al enriquecer con la mezcla de sondas se están obteniendo regiones tanto $(CT)_n$, como $(GT)_n$, asegurándose así una mayor obtención de microsatélites de cualquiera de estos dos motivos. Sin embargo, el éxito diferencial entre genotecas podría deberse también a que en la generación de estas mismas se pudieron haber usado diferentes condiciones de astringencia al momento del enriquecimiento; en donde probablemente en la genoteca con la mezcla de sondas se hayan manejado condiciones menos astringentes (ej. temperaturas de hibridación mas bajas) lo cual puede propiciar que se obtengan

más regiones microsatélite (Gleen y Schable, 2005), ya sea de motivos $(CT)_n$ o $(GT)_n$. Lo mismo pudo haber ocurrido (baja astringencia en el enriquecimiento) al generar la genoteca con la sonda $(CTGT)_6$.

Es importante recalcar que el estimador del éxito en la obtención de microsatélites, se calcula en base a la relación de microsatélites encontrados sobre el total de clonas secuenciadas (primer cuello de botella), y no es propiamente el número de microsatélites que son efectivamente amplificados por *PCR* y son considerados finalmente como marcadores útiles para evaluar polimorfismo, como se analizará mas adelante específicamente para el grupo de moluscos bivalvos.

De manera interesante, de los 36 pares de cebadores diseñados (ANEXO 1, Tabla II), las regiones microsatélite por amplificar fueron los motivos de repetición buscados en los enriquecimientos, en donde solamente un par de cebadores fueron diseñados para un microsatélite extra (un trinucleótido). Lo anterior nos confirma la utilidad del uso de las genotecas enriquecidas para la obtención de microsatélites de manera dirigida. De hecho, los seis microsatélites polimórficos obtenidos corresponden a los motivos de repetición buscados (ANEXO 1); en donde finalmente un microsatélite di- $(AG)_n$ (*Pglo2*) y un tetra-nucleótido $(CTGT)_n$ (*Pglo12*) dieron patrones alélicos confiables para distinguir entre genotipos (homocigotos y heterocigotos) y surgieron de clonas enriquecidas con estos motivos.

En lo que respecta a la composición de los microsatélites, el análisis general de las secuencias obtenidas en las cuatros genotecas mostró que los motivos de repetición más abundantes fueron los dinucleótidos (52.78 %), seguidos de los tetranucleótidos (44.44 %). En el caso de los dinucleótidos se identificó un mayor número de microsatélites conteniendo el motivo de repetición $(CT)_n$, en 14 de 19 clonas, en tanto que con $(GT)_n$ fueron 5 de las 19 clonas (Tabla II). Tóth et al. (2000) sugieren que en la mayoría de los eucariontes, los dinucleótidos son el motivo de repetición más frecuente, específicamente el motivo $(AC/GT)_n$. Cruz et

al. (2005) revelan que el motivo más abundante para otro bivalvo, *Mytilus galloprovincialis* fue la repetición $(AC/GT)_n$, coincidiendo con lo observado por Tóth et al. (2000). Estas variaciones en dinucleótidos mas abundantes entre especies de bivalvos, tanto en el tipo como en la frecuencia del motivo de repetición pueden deberse a características propias de la especie estudiada (Tóth et al., 2000). En *Panopea globosa*, resulta interesante que la proporción de microsatélites $(CT)_n$:$(GT)_n$ fue muy similar en la genoteca con sondas mezcladas (7:2) que la observada entre las genotecas $(CT)_n$ y $(GT)_n$ (6:2) (Tabla II); denotándose la mayor abundancia de motivos $(CT)_n$. Sin embargo, por los tamaños de muestra analizados no podemos concluir que esta sea la real abundancia en el genoma de *P. globosa*.

Por otra parte los tetranucleótidos, aunque parecen ser menos abundantes que los dinucleótidos en la mayoría de los taxa (Tóth et al., 2000), en nuestro caso su frecuencia fue casi similar a la de los dinucleótidos. Sin embargo, lo anterior no puede ser un reflejo de la abundancia real de estas regiones en el genoma de *P. globosa*, sino que más bien son resultado de un sesgo al dirigir la búsqueda de los microsatélites usando sondas de tetranucleótidos, que en nuestro caso particular fueron exitosas. Para la especie, *P. generosa*, Vadopalas y Bentzen (2000) y Kaukinen et al. (2004) al aislar microsatélites observaron igualmente una elevada frecuencia de tetranucleótidos puesto que sus *genotecas* fueron enriquecidas con esos motivos (Tabla VII).

Retomando el punto sobre el éxito en la obtención de microsatélites, nuestros resultados muestran una baja eficiencia en la obtención de marcadores útiles, siendo solamente dos los amplificados por *PCR* y con lecturas confiables. En los reportes con bivalvos (Tabla VII), con esfuerzos inferiores al nuestro (45 a 66 clonas secuenciadas), se han obtenido de 4 a 10 microsatélites polimórficos útiles. Solamente existe un reporte de hace mas de diez años en *Crassostrea gigas* en donde se obtuvieron 3 microsatélites (Magoulas et al., 1998).

El segundo gran cuello de botella en la obtención de microsatélites, es la estandarización de la amplificación por *PCR* de los microsatélites a partir de los cebadores diseñados. El éxito en esta etapa es muy variado en los reportes previos con moluscos bivalvos, que va de 7.3 a 53.8 %. Específicamente para *P. generosa*, existen tres esfuerzos para desarrollar marcadores microsatélites, en donde el éxito se situó entre 30.77 y 40 % (Tabla VII). Sin embargo, en éstos estudios el número de marcadores polimórficos útiles (4-6) se ubica entre los más bajos reportados para bivalvos en la última década. En nuestro caso particular de 36 pares de cebadores diseñados fue posible amplificar 13 microsatélites, sin embargo siete resultaron monomórficos, y de los seis polimórficos solamente dos fueron interpretables en términos genéticos (genotipos claros). Nuestros rendimientos en la obtención de microsatélites a lo largo de todo el proceso son muy similares a los reportados en uno de los estudios antes mencionados para *P. generosa* (Tabla VII; Vadopalas y Bentzen, 2000), en donde secuencian poco menos de la mitad de clonas que en nuestro estudio, con un éxito ligeramente superior en la obtención de regiones microsatélites, poco menos de la mitad de cebadores diseñados, para obtener finalmente seis microsatélites polimórficos, de los cuales solamente cuatro fueron analizados en un posterior estudio poblacional (Vadopalas et al., 2004). Ha sido tan baja la obtención de marcadores polimórficos útiles en *P. generosa* por equipos diferentes de trabajo (Tabla VII), que para los análisis poblacionales ha sido necesario hacer acopio de todos los marcadores disponibles y/o identificar mas marcadores (Vadopalas et al., 2004; Miller et al., 2006).

Con nuestros resultados y el análisis previo en moluscos, el problema en la identificación de microsatélites en *Panopea*, no parece ser la obtención de secuencias con esos motivos, sino más bien el diseño de cebadores y amplificación de microsatélites útiles por *PCR*. McInerney et al. (2010), señalan que las dos características principales del genoma de los organismos que son responsables de la inconsistencia y/o interferencia para amplificar microsatélites

por *PCR*, son: 1) presencia de regiones flanqueantes inestables y 2) ocurrencia de ADN críptico repetitivo. Atendiendo a la primera explicación, una elevada tasa de mutación en las regiones flanqueantes que es en donde se alinean los cebadores diseñados, puede ser la causa por la cual no se lograron amplificar 23 regiones microsatélite en *Panopea globosa*. En lo que respecta a la ocurrencia de ADN repetitivo críptico en las regiones flanqueantes de los microsatélites, esto se refiere a que estas regiones tengan similitud con los sitios a donde se alinean los cebadores, provocando la amplificación de productos de tamaños no esperados, dando patrones que no corresponden a la lectura de un solo loci. Lo anterior se ha tratado de explicar asociando la proximidad que tienen algunos microsatélites con elementos transponibles (TEs), los cuales ya han sido detectados en moluscos (Gaffney et al., 2003). McInerney et al. (2010) al estudiar tres especies de moluscos gasterópodos aportó evidencias que apoyan la hipótesis de la presencia de un TE, que se ha comportado como un agente dispersor de regiones microsatélite en el genoma de estas especies. En el presente estudio, en cuatro de los microsatélites polimórficos (*Pglo9, Pglo20, Pglo28* y *Pglo31*) se observaron patrones de bandeo muy complejos, con múltiples bandas por organismo, denotando polimorfismos aparentemente reales, pero difíciles de interpretar como un solo locus (Fig. 2).

Tabla VII. Éxito en la identificación de microsatélites para diferentes especies de moluscos bivalvos.

Especie	Estrategia	Número de clonas secuenciadas	Clonas con microsat. (con microsat. buscados)	% de microsat.	Pares de cebadores diseñados	Microsat. polimórficos útiles	% de marcadores útiles	Referencia
Crassostrea gigas	Hibridación $(GT)_n$	-	8	-	8	3	37.5	Magoulas et al., 1998
	Enriquecimiento $(CA)_n$, $(CT)_n$		123		123	9	7.3	Sekino et al., 2003
	Enriquecimiento $(CA)_n$, $(GA)_n$, $(ATG)_n$	-	-	-	22	8	36.4	Yamtich et al., 2005
Crassostrea virginica	Hibridación $(ATG)_7$, $(AAAC)_5$		13		13	7	53.8	Brown et al., 2000
Crassostrea corteziensis	Enriquecimiento $(GT)_n$-$(CT)_n$, - $(CT)_n$, $(CTGT)_n$	45		43.93	33	10	30.3	Cruz et al., 2007
Panopea generosa	Enriquecimiento $(GATA)_4$	82	62 (59)	75.6	16	6	37.5	Vadopalas y Bentzen, 2000
Panopea generosa	Enriquecimiento							Kuakinen et al., 2004
	$(GACA)_n$	33	(31)	93.94	10			
	$(GATA)_n$	22	(10)	45.45	3	4	30.77	
	Hibridación $(GATA)_9$	66	30	50	10	4	40	
Panopea globosa	Enriquecimiento		38)					Presente estudio
	$(CT)_{15}$	50	18	36				
	$(GT)_{15}$	12	5	41.67				
	$(GATA)_{10}$	10	1	10				
	$(CTGT)_6$	74	53	71.62				
	MIX $(CT)_{15}(GT)_{15}$	46	42	91.30				
	Total	192	119	62	36	2	5.5	

% de microsatélites = (clonas con microsatélites / total de clonas secuenciadas).
% de marcadores útiles = (microsatélites polimórficos útiles / pares de cebadores diseñados).

8.2 Variabilidad genética

El nivel de diversidad genética, en términos de heterocigosidad y número de alelos promedio, para *Panopea globosa* mostró valores moderados (n_A = 12-15, *AR*= 10-12.4, *Ho*= 0.62-0.82, *He*= 0.84-0.90), comparando con lo obtenido previamente para la especie *P. generosa* (n_A = 27.3-31, *Ho*= 0.55-0.77 , *He*= 0.88-0.99, Vadopalas et, al., 2004; n_A = 21-60, *Ho*= 0.53-0.93, *He*=0.91-0.97, Kaukinen et al. 2004; *AR*=16-38 *Ho*= 0.68-0.91, *He*= 0.91-0.98; Miller et al., 2006,), en donde se puede observar que se obtienen mayores valores sobre todo en el número de alelos (n_A , *AR*). Sin embargo, en estos estudios, ya sea el número de localidades (16-17), el tamaños de muestra (100-200 individuos) y el número de loci analizados (7-8), fue superior a lo evaluado en nuestro estudio, lo cual incrementa la posibilidad de obtener estimaciones de variabilidad genética superiores, sobre todo en el número de alelos. En nuestro estudio la principal limitante es el número de loci analizados combinado posiblemente con el moderado polimorfismo *per se* que puedan tener éstos. Lo anterior no implica que *Pglo2* y *Pglo12* no sean marcadores adecuados para estudios poblaciones en *P. globosa*, ya que de hecho los marcadores con moderado polimorfismo son más deseables que los de elevado polimorfismo, debido a que éstos últimos pueden conducir a errores de muestreo o errores al momento de tomar las lecturas. En los estudios con *P. generosa* mencionados, en ninguna localidad, ningún marcador de los 15 reportados tienen un número de alelos (n_A) inferior a 15, en tanto que en nuestros marcadores, el locus más polimórfico (*Pglo2*) tiene como máximo 16 alelos en ciertas localidades. Muy probablemente en los estudios con *P. generosa* se haya dado preferencia a la identificación de marcadores moleculares con elevado número de repeticiones, que normalmente generan marcadores de elevado polimorfismo, ya que los mismos autores llegan a recomendar el diseño de cebadores en regiones microsatélites de tetranucleótidos con más de 10 repeticiones (Kaukinen et al., 2004). Por tanto, para *P. globosa* es necesario obtener más marcadores polimórficos que nos permitan hacer un análisis más

robusto que sea más representativo del genoma de *P. globosa.* Actualmente la exigencia en las revistas especializadas es usar al menos ocho marcadores polimórficos (ej. *Molecular Ecology Resources,* Blackwell Publishing Ltd).

Comparando los valores de variabilidad de *P. globosa* con lo reportado para otros moluscos bivalvos, se observan valores más similares en el número de alelos, posiblemente debido al uso de marcadores con moderado polimorfismo. Huvet et al. (2000) al evaluar solo 4 microsatélites reportan para *Crassostrea gigas* valores mas aproximados a los nuestros (n_A= 13-49, *Ho*= 0.54-0.90, *He*= 0.83-0.96), en donde, uno de los locus evaluados presentó un elevado polimorfismo (49 alelos), pero los otros tres loci presentaban valores moderados (13-15 alelos). Específicamente para un bivalvo que habita también en el Océano Pacífico y en el Golfo de California, *Nodipecten subnodusus,* Petersen et al. (2010) reportan para 14 loci, valores promedio de variabilidad genética (n_A= 11.2-14.1, Ho= 0.70-0.77, He= 0.83-0.96) que se aproximan más a los observados con los dos loci evaluados en *P. globosa.*

Al interior de las localidades de *P. globosa*, los mayores valores de diversidad se detectaron en BM y los menores en PP; las localidades de GU y SF se situaron intermedias (Tabla IV). No se observó ningún efecto debido al tamaño de muestra mínimo manejado, el cual fue de 42 individuos para el locus *Pglo2* y 21 para *Pglo12,* ya que con el método de rarefacción empleado para la estimación de riqueza alélica (*AR*), se siguió observando la misma clasificación en orden descendiente de variabilidad (BM, GU, SF, PP) (Tabla IV). De acuerdo con lo anterior todos los índices fueron buenos indicadores de diversidad genética.

BM además de ser la localidad con mayor diversidad genética presentó el menor valor de F_{IS} (0.08), lo que se podría interpretar como la localidad con menor endogamia. PP en cambio presentó el valor más grande de F_{IS} (0.26), lo cual coindice en que sea la localidad con menor variabilidad genética. SF y GU tienen valores de F_{IS} similares y más cercanos a los valores de PP (0.20 y 0.21

respectivamente). El coeficiente de endogamia indica que en todas las localidades hubo un exceso de homocigotos. Sin embargo este estimador debe de manejarse con cautela para definir el grado de consanguinidad en poblaciones naturales, ya que es sensible a artefactos de la técnica, como lo son los alelos nulos, los cuales se describen a continuación.

Tal como se muestra en la tabla IV, de las 8 pruebas de equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), todas excepto una (SF para *Pglo2*) presentaron desequilibrio por déficit de heterocigotos. En los trabajos previos con *P. generosa* (Vadopalas et al., 2004; Kaukinen et al., 2004; Miller et al. 2006) en la mayoría de los casos no se observa EHW, debido a un déficit de heterocigotos. Esta deficiencia se puede deber a la presencia de alelos nulos, efecto Wahlund, endogamia, apareamiento no azaroso o por selección (Hedgecock, 1994). En el caso de nuestro estudio, con base en los resultados del programa Micro-Cheker ver. 2.2.3, se sugiere que el exceso de homocigotos se debe a la presencia de alelos nulos en la mayoría de los casos, descartando la posibilidad de errores técnicos, como lo son la omisión de alelos por tamaños muy grandes (*large allele dropout*), y errores de lectura debido a bandas fantasma repetidas (*stutters*). La deficiencia en heterocigotos en loci microsatélite en poblaciones silvestres de bivalvos pareciera ser la regla y no la excepción (Naciri et al., 1995; Huvet et al., 2000; McGoldrick et al., 2000; Launey et al., 2002; Hedgecock et al., 2004; Astanei et al., 2005; Carlsson y Reece, 2007; Petersen et al., 2010). Aunque el déficit de heterocigotos ha sido atribuido a cualquiera de los factores genéticos antes mencionados, los alelos nulos son normalmente el problema mas común para los microsatélites desarrollados para bivalvos. Vadopalas et al. (2004), así como Kaukinen et al. (2004) mencionan que para *P. generosa* el déficit de heterocigotos en la mayoría de sus loci, es debido a la presencia de alelos nulos ocasionados por mutaciones en las regiones flanqueantes.

En *Crassostrea virginica* ya se ha demostrado que existen polimorfismos en las regiones flanqueantes de los microsatélites (Reece et al., 2004), que han ocasionado la presencia de alelos nulos, por lo que se cree que la tasa de éxito relativamente baja de los cebadores para amplificar en la *PCR* es debida al alto polimorfismo en el genoma de esta especie. También se ha observado que el elevado grado de polimorfismo en el ADN nuclear de ostiones, particularmente en regiones no codificantes, resulta en la dificultad de diseñar cebadores que con certeza amplifiquen las regiones deseadas en todos los individuos (Hedgecock et al., 2004). Por lo antes expuesto, en *P. globosa* es probable que la presencia de alelos nulos se deba a este carácter evolutivo aparentemente propio de los bivalvos, que es presentar una elevada tasa de mutación y por ende polimorfismo en las regiones flanqueantes a los microsatélites. Explicaciones recientes a esta propensión a mutar incluyen las derivadas durante el proceso de recombinación genética y la acción de elementos transponibles (TEs) (Gaffney et al., 2003; McInerney et al., 2010).

En el caso de PP (*Pglo2*) y BM (*Pglo2, Pglo12*), ya que el déficit de heterocigotos no es atribuible a alelos nulos, es posible que se presente por alguna de las razones previamente planteadas (endogamia, deriva genética, no panmixia, selección). Sin embargo con nuestro análisis preliminar con dos microsatélites, y la falta de información biológica sobre las poblaciones naturales, es difícil sustentar que alguno de estos procesos y en qué grado esten ocurriendo en *P. globosa*, y no solamente en las dos localidades donde no se observaron alelos nulos, sino también en el resto de localidades con alelos nulos, ya que la presencia de éstos puede llegar a enmascarar cualquier efecto genético.

Si consideramos que los menores valores del coeficiente de endogamia F_{IS}, se presentaron justamente en BM para ambos loci y el locus *Pglo12* en PP (0.06-0.12), y al no haber efecto de alelos nulos, estos podrían reflejar de mejor manera la endogamia en *P.* globosa, y no los valores observados en presencia de alelos nulos (0.15-0.48). En los trabajos con *P. generosa* (Vadopalas et al., 2004; Miller

et al. 2006) las estimaciones de F_{IS} en los loci con alelos nulos son igualmente elevadas (0.26-0.42) y mucho menores en los loci en EHW (0.03-0.05).

8.3 Estructura genética poblacional.

En el presente estudio, como resultado de una primera aproximación al evaluar dos loci microsatélite, los niveles de estructura genética expresados en valores de F_{ST} pareados demuestran que existe marcada diferenciación genética entre BM y las localidades del Alto Golfo (Tabla 5), poblaciones separadas por al menos 1,385 km. Estos resultados coinciden con el hecho de que las frecuencias alélicas de estas localidades también fueron significativamente diferentes, así como los niveles de variabilidad genética, sobre todo al comparar BM con PP. Los valores significativos de F_{ST} observados en *P. globosa* (0.018-0.036) son superiores a los obtenidos en estudios previos con *P. generosa* (0.0007-0.0033, Vadopalas et al., 2004; 0.0013- 0.0059, Miller et al., 2006). Cabe resaltar, que como se mencionó anteriormente estos dos estudios fueron realizados con loci microsatélites altamente polimórficos, por lo que se pueden obtener valores de F_{ST} muy bajos pero significativos (Ryman et al., 2006); inversamente en la escala de marcadores moleculares conforme estos son menos polimórficos (ej. alozimas) los valores de F_{ST} tienden a ser mayores. Por tanto, con nuestros valores de F_{ST} no podemos asegurar que en *P. globosa* exista una mayor estructuración genética que en *P. generosa*. Una vez que se analicen más marcadores moleculares y algunos con elevado polimorfismo, muy probablemente los valores de F_{ST} entre especies puedan ser más equiparables.

En nuestros resultados, las localidades del Golfo (PP, SF y GU) no se diferenciaron entre sí (F_{ST} = 0 – 0.004; P = 0.05), lo cual nos indica la presencia de un elevado flujo genético entre éstas. La conectividad entre moluscos marinos regularmente se explica por el alto potencial de dispersión de huevos y larvas. La baja estructura poblacional encontrada en ostras (Benzie and Smith-Keune, 2006;

Rose et al., 2009: Galindo-Sánchez et al., 2008) mejillones (Zhan et al., 2009) y pectínidos (Kenchington et al., 2006) se atribuye principalmente a la acción de las corrientes. Tremblay et al. (1994) encontraron que los efectos biológicos y ambientales determinan hacia dónde se dispersan las larvas.

Las corrientes del Golfo de California durante los meses de noviembre a abril se mueven en un giro anticiclónico que ocasiona que la corriente fluya fuertemente hacia el sur (Marinone, 2003). Las larvas de *P. globosa* no solo se ven afectadas intensamente por las corrientes, sino también por factores ambientales como la temperatura y la productividad primaria. Calderón-Aguilera et al (2010) señala que el desarrollo gametogénico de *P. globosa* en el Alto Golfo de California inicia cuando la temperatura desciende durante los meses octubre-enero y el desove ocurre entre los meses de enero y febrero cuando la temperatura es de ~ 16 °C justo cuando se presenta el mayor pico de producción fitoplanctónica en el Alto Golfo y las corrientes se dirigen hacia el sur. Aragón-Noriega et al. (2007) por otra parte, menciona que en *P. globosa* en el centro del Golfo de California (Guaymas) el desove ocurre en los meses de enero y febrero (~ 18 °C). Por tanto, la nula diferenciación genética observada en nuestro estudio, podría ser explicada por el flujo larval en dirección Norte-Sur en el Golfo, es decir de las localidades del Alto Golfo (PP y SF) hacia la localidad de GU. Existen programas estadísticos para determinar la dirección del flujo genético (ej. MIGRATE 2.8; Beerli, 2004), sin embargo con los datos solamente de dos loci, nos encontramos limitados estadísticamente para realizar este tipo de análisis.

Específicamente para la región Noroeste de México, existe un estudio molecular con otro bivalvo, la almeja mano de león *Nodipecten subnodusus*, en donde también se evaluó la estructura genética poblacional, al comparar localidades tanto de las costas occidental y oriental de la península de Baja California (Petersen et al., 2010). En dicho estudio se evaluaron 10 microsatélites y se observó que los valores de G'_{ST} (análogo a F_{ST}) y un AMOVA indican una diferenciación estadística significativa entre cuatro localidades del Golfo de

California con respecto a una en el Pacifico, demostrando que no existe flujo genético entre las localidades del Golfo con respecto a la del Pacífico.

En nuestro caso, el AMOVA global y los diferentes AMOVAs jerárquicos, no mostraron valores significativos de ninguno de los estimadores de *F* (entre grupos: F_{CT}; dentro de grupos: F_{SC}; dentro de poblaciones: $F_{ST.}$), pese a que se observó una variación muy grande al interior de las poblaciones (aprox. al 100%), tal como ocurre en estos análisis con marcadores polimórficos como los microsatélites. Lo anterior, nos está indicando que la prueba está perdiendo poder estadístico al comparar solamente con dos microsatélites. Sin embargo se observa cierta tendencia, en la que BM tiende a diferenciarse de todas las localidades del Golfo de California con un F_{CT} no significativo de 0.027.

Existe un estudio previo con otro pectínido en la región Noroeste de México, *Argopecten ventricosus*, en donde mediante un análisis comparativo del crecimiento y supervivencia de organismos crecidos simultáneamente en una localidad en el Pacífico (Bahía Magdalena) y una localidad en el Golfo de California (Bahía Concepción), se detectaron diferencias genéticas. Tales diferencias las atribuyeron a que la propia península esta actuando como una barrera geográfica que ha contribuido al aislamiento reproductivo de estas poblaciones, además de adaptación a condiciones ambientales con diferente grado de estrés (Cruz et al., 1998). Es bien conocido que el aislamiento reproductivo entre poblaciones, derivado de este tipo de barreras puede resultar en diferenciación genética como una consecuencia no solo de la deriva genética, sino aún más importante, de procesos de selección natural y adaptación a las condiciones ambientales (Avise, 1980).

Bahía Magdalena puede ser caracterizado como un ambiente templado, con temperatura máxima en septiembre (26.9 ± 1.0 °C; Lluch-Belda et al., 2000), y valores mínimos de enero a febrero (20.3 ± 1.0 °C; Bizarro, 2008). Bahía Magdalena es conocida por tener afloramientos costeros de alta productividad,

que persisten durante todo el año, aunque el periodo más intenso se produce durante la primavera y principios del verano (Bakun & Nelson 1977). En cambio el Alto Golfo es una región cálida-templada, con temperaturas cerca de la costa variando considerablemente de 29.2 ° C en agosto a 15.8 ° C en enero (Calderón et al. 2010); durante el invierno se producen enriquecimientos de nutrientes por la surgencia costera, causando una alta productividad primaria (Lluch-Cota et al. 2007).

Nuestro estudio es una primera aproximación a la estructura genética de la almeja de sifón *Panopea globosa*, en donde se manifiesta el aislamiento reproductivo de Bahía Magdalena, y posible adaptación a diferentes condiciones ambientales, que han propiciado su diferenciación genética con las localidades del Golfo, en las cuales las corrientes oceanográficas durante el periodo reproductivo han permitido un elevado flujo genético. Una vez que se cuente con más marcadores moleculares polimórficos, será posible robustecer las diferencias observadas, y definir con una mayor precisión la estructura de las localidades al interior del Golfo de California, así como establecer las direcciones del flujo genético. También será recomendable analizar más localidades e incrementar los tamaños de muestra.

9. CONCLUSIONES

1. El éxito en el enriquecimiento por sonda empleada resultó variable y mayor para la sondas $CTGT_6$ y la mezclada CT_{15} -GT_{15}. El éxito diferencial entre genotecas podría deberse a que en la generación de estas mismas se usaron diferentes condiciones de astringencia al momento del enriquecimiento.

2. Los motivos de repetición más abundantes fueron los dinucleótidos (52.78 %), seguidos de los tetranucleótidos (44.44 %). El motivo de repetición mas abundante fue $(CT)_{n.}$

3. De 36 pares de cebadores diseñados, 13 pudieron ser amplificados, de éstos solo 6 fueron polimórficos y solo dos mostraron lecturas confiables.

4. El nivel de diversidad genética en términos de número de alelos, riqueza alélica, número de alelos efectivos y heterocigocidad esperada, resultó moderado respecto a la especie congénere *Panopea generosa* y similar a la reportada en otros bivalvos.

5. Todas las pruebas de equilibrio H-W mostraron desviaciones debido a un déficit de heterocigotos, relacionada con la incidencia de alelos nulos.

6. Como una primera aproximación, se observó estructuración genética de *Panopea globosa* en el área muestreada; siendo la localidad ubicada en el Pacífico, Bahía Magdalena, una población diferente a la población del Alto Golfo de California (Puerto Peñasco y San Felipe). Al interior del Golfo se California se observó homogeneidad genética. La localidad de la parte central del Golfo, Guaymas, se situó intermedia sin diferenciarse de las

localidades del Alto Golfo y de Bahía Magdalena. Sin embargo, se requiere de un mayor número de loci para robustecer esta conclusión.

10. PERSPECTIVAS

En lo que respecta a la identificación de microsatélites en *P. globosa*, debido a la baja eficiencia observada en el presente estudio la cual es aún mas baja que la observada en los estudios previos con *P. generosa*, se sugiere hacerlo mediante el pirosecuenciado genómico 454 (Roche). El secuenciado 454 es un método masivo de secuenciado de nueva generación, en donde a partir de la corrida de una sola placa se obtienen 400,000 secuencias (Abdelkrim et al., 2009). Antes del pirosecuenciado se sugiere realizar un enriquecimiento (Jeanneau et al., 2010), sin que implique la generación de genotecas. Se sugiere realizar los enriquecimientos con sondas de tetranucleótidos, los cuales son microsatélites con menos problemas para su amplificación e interpretación. El análisis del elevado número de secuencias se realizaría usando programas bioinformáticos. Para el diseño de cebadores se sugiere seguir estrictamente los siguientes criterios (Kuakinen et al., 2004): 1) Solamente para tetranucleótidos perfectos de 10 a 35 repeticiones, y si se opta por dinucleótidos, que estos sean perfectos y con 15 a 25 repeticiones; 2) no diseñar en regiones con microsatélites compuestos di/tri, tri/tetra o cualquier secuencia que tenga 5 nucleótidos y que pueda dar alelos con diferencias de una sola base; 3) descartar los tetranucleótidos con tres mononucleótidos (ej. AAAN); 4) si existe suficiente secuencia flanqueante diseñar varios pares de cebadores y seleccionar los mas adecuados para evitar alelos nulos.

Con el fin de robustecer el análisis y corroborar la probable diferenciación de Bahía Magdalena con respecto a las localidades del Golfo de California se recomienda utilizar entre 4 y 6 microsatélites adicionales. Lo anterior permitirá la evaluación de otros estimadores genéticos como tamaño efectivo poblacional, número de migrantes, dirección del flujo genético y estructura con métodos bayesianos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelkrim, J., Roberston, B.C., Stanton, J.L, Gemmell, N.J. 2009. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *BioTechniques* 46, 185-192.

Andersen, A. 1971. Spawning, growth and spatial distribution of the geoduck clam, *Panope generosa* (Gould) in Hood Canal, Washington. PhD Diss., U. of Washington, 133 p.

Arambula-Pujol, E.M., García-Juárez, A. R. Alcántara-Razo, E., Aragón-Noriega, E. A. 2008. Aspectos de biología reproductiva de la almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall 1898) en el Golfo de California. *Hidrobiológica*. 18: 89-98.

Aragón-Noriega, A., Chávez-Villalba, J., Gribben, P., Alcántara-Razo, E., Maeda-Martínez, A., Arámbula-Pujol, E., García-Juárez, A. R. Maldonado-Amparo, R. 2007. Morphometric Relationships, Gametogenic Development and Spawning of the geoduck clam *Panopea globosa* (BIVALVIA: HIATELLIDAE) in the Central Gulf of Califonia. *J. Shellfish Res.* 26, 423-431.

Avise, J.C. 1980. Diferenciación genética durante la especiación. En: Ayala, F.J. (Ed.) *Evolución molecular*, Omega, Barcelona, 110-127.

Astanei, J., Gosling, E., Wilson, J., Powell, E. 2005. Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Mol. Ecol.* 14, 1655-1666.

Bakun, A. , Nelson, C. 1977. Climatology of upwelling related processes off Baja California. CalCOFI 19: 107–127. In: Bizzarro, J., 2008, A review of the physical and biological characteristics of the Bahía Magdalena lagoon complex (Baja California Sur, Mexico). *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* 107, 1–24.

Baulloux, F., Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 11, 155-165.

Benzie, J. A. H., Smith-Keune, C. 2006. Microsatellite variation in Australian and Indonesian pearl oyster Pincatada maxima populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 214, 197-211.

Bizzarro, J., 2008. A review of the physical and biological characteristics of the Bahía Magdalena lagoon complex (Baja California Sur, Mexico). *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences* 107, 1-24.

Brown, B.L., Franklin, D.E., Gaffney, P.M., Hong, M., Dendantos, D., Kornfield, I. 2000. Characterization of microsatellites loci in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Mol. Ecol.* 9, 2217-2219.

Bureau, D., Hajas, W., Surry, N. W., Hand, C. M., Dovey, G., Campbell, A. 2002. Age, size structure, and growth parameters of geoducks (*Panopea abrupta* Conrad, 1849) from 34 locations in British Columbia sampled between 1993 and 2000. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci*. No. 2413.

Calderón-Aguilera, L. E., Aragón-Noriega, E. A., Reyes-Bonilla, H., Paniagua-Chávez, C. G., Romo-Curiel, A. E., Moreno-Rivera, V. M. 2010. Reproduction of the Cortez geoduck *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae)

and its relationship with temperature and ocean productivity. *J. Shellfish Res.* 29,135–141.

Carlsson, J., Reece, K. S. 2007. Eight PCR primers to amplify EST-linked microsatellites oyster, *Crassotrea virginica* genome. *Mol. Ecol. Notes* 7, 257-259.

Cruz, P., Ramirez, J. L., Garcia G. A., Ibarra, A.M. 1998. Genetic differences between two populations of catarina scallop (*Argopecten ventricuosus*) for adaptations for growth and survival in a stressful environment. *Aquaculture* 166, 321-335.

Cruz, F., Pérez, M., Presa, P. 2005. Distribution of microsatellites in the genome of bivalves. *Gene* 346, 214-247.

Cruz, P., Yañez-Jacome, B., Ibarra, M., Rangel-Becerril, J. 2007. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific pleasure oyster, *Crassostrea corteziensis*, and their cross-species amplification in four other oyster species. *Mol. Ecol. Notes*. 7, 448-450.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.

Feldman, K., Vadopalas., B., Armstrong, D., Friedman, C., Hilborn, R., Naish, K., Orensanz, J., Valero, J., Ruesink, J., Suhrbier, A., Christy, A., Cheney, D., Davis, J. 2004. Comprehensive Literature Review and Synopsis of Issues Relating to Geoduck (*Panopea abrupta*). *Ecology and Aquaculture Production.* 140 p.

Glenn, T. C., Schable, N. A. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Method Enzymol*. 395, 202–222.

Gaffney P. M., Pierce, J. C., MacKinley, A. G., Titchen, D. A., Glenn, W. K. 2003. *Pearl*, a novel family of putative transposable elements in bivalve mollusks. *J. Mol. Evol.* 56, 308-316.

Galindo-Sánchez, C. E., Gaffney, P. M., Pérez-Rostro, C. I., De la Rosa-Vélez, J., Candela, J., Cruz, P. 2008. Assessment of genetic diversity of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in Veracruz, Mexico using microsatellite markers. *J. Shellfish Res.* 27, 721-727.

González-Peláez, S. S., Leyva-Valencia, I., Pérez-Valencia, S. A., Lluch-Cota, D. B. 2010. Distribution and morphological differentiation of geoduck clams *Panopea abrupta* and *P. globosa* in Pacific coast of Mexico. World Aquaculture Society, March 1-5. San Diego California U.S.A. Book of abstract 392 p.

Goodwin, C. 1976. Observations on spawning and growth of subtidal geoduck (*Panope generosa* Gould). *Proc. Natl. Shellfisheries Assoc*. 65, 49-58.

Goodwin, C. L., Shaul, W., Budd, C. 1979. Larval development of the geoduck clam (*Panope generosa*, Gould). *Proc. of the Nat. Shellf. Assoc*. 69, 73-76.

Goodwin, C., Pease, B. 1989. Species profiles: life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (Pacific Northwest) Pacific geoduck clam. U.S. Fish. Wildl. Serv. Biol. Rep. 82(11.120). U.S. Army Corps of Engineers, TR EL82-4. 14 p.

Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at: http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm

Hartl, D.L., Clark, A.G. 1997. Principles of Population Genetics, Sinauer Associates, Sunderland, MA. pp 542.

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. 122-134 pp

Hedgecock D., Li G., Hubert, S., Bucklin, K., Ribes, V. 2004. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Shellfish* Res 23,379–385.

Hendrickx, M. E., Brusca, R. C., Findley, L.T. 2005. A distributional checklist of the macrofaunal of the Gulf of California, Mexico. Part I. Invertebrates. Arizona-Sonora Desert Museum. 429pp.

Hernández-Trujillo, S., Palomares-García, R., López-Ibarra, G., Esqueda-Escarcega, G., Pacheco-Chávez, R. 2004. Riqueza específica de copépodos en Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. *Anales del Instituto de Biología, UNAM, serie zoología.* 75, 253-270.

Higgins, K., Lynch, M. 2001. Metapopulation extinction caused by mutation accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**, 2928-2933.

Hohenlohe, P. 2004. Limits to gene flow in marine animals with planktonic larvae: models of *Littorina* species around Point Conception, California. *Biological Journal of the Linnean Society* 82, 169-187.

Huvet, A., Boudry, P., Ohresser, M., Delsert, C., Bonhomme, F. 2000. Variable microsatellite in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Animal Genetics* 31, 71-72.

Jarne, P., Lagoda, P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11, 424-429.

Jeanneau, M., Bon, M., Martin, J. 2010. Meaningful application of the new 454 large scale pyrosequencing technology (Roche GS-FLX 454) to the identification of microsatellites for small-scale research projects. 15th European Weed Research Society Symposium Proceedings, Kaspovar, Hungary 12-15 July 2010.

Kaukinen, K. H., Supernault, K. J., Miller, K. M. 2004. Enrichment of tetranucleotide microsatellite loci from invertebrate species. J. *Shellfish Res.* 23,621 1-626.Kenchington, E. L., Patwary, M. U., Zouros, E., Bird, C.J. 2006. Genetic differentiation in relation to marine landscape in a broadcastspawning bivalve mollusk (*Placopecten magellanicus*). Mo*l. Ecol*. 15,1781–1796

Launey, S., Ledu, C., Boudry, P., Bonhomme, F. Naciri-Graven, Y. 2002. Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis*) as revealed by microsatellite polymorphism. *J. Heredity* 93, 331-337.

Leyva-Valencia, I., Álvarez-Castañeda, S., Cruz-Hernández, P., Vadopalas, B., González-Peláez, S., Pérez-Valencia, S., Lluch-Cota, D. B. 2010 Morphometrics and Phylogenetic Analysis in geoduck clam *Panopea* sp.

from Mexican Northwest. World Aquaculture Society, March 1-5. San Diego California U.S.A. Book of abstract 602 p.

Lift, M., Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* 44, 397-401.

Lluch-Belda, D., Hernández, M., Saldierna, R., Guerrero, R. 2000. Variabilidad de la temperatura superficial del mar en Bahía Magdalena, B.C.S. *Oceánides* 15, 1–23.

Lluch-Cota, S. E., Aragón-Noriega, E. A., Arreguín-Sánchez, F., Aurioles-Gamboa, D., Bautista-Romero J. J., Brusca, R. C., Cervantes-Duarte, R., Cortes-Altamirano, R., Del-Monte-Luna, P., Esquivel-Herrera, A., Fernández, G., Hendrickx. M. E., Hernández-Vázquez, Sergio., Herrera-Cervantes, H., Kahru, M., Lavın, M., Lluch-Belda, D., Lluch-Cota, D. B., López-Martínez J., Marinone, S. G., Nevárez-Martínez, M. O., Ortega-García, S., Palacios-Castro, E., Pares-Sierra, A., Ponce-Díaz, G., Ramírez-Rodríguez, M., Salinas-Zavala, C. A., Schwartzlose, R. A., Sierra-Beltrán, A. P. 2007. The Gulf of California: Review of ecosystem status and sustainability challenges. *Progress in Oceanography* 73, 1-26.

Madsen, T., Stille, B., Shine, R. 1996. Inbreeding depression in an isolated population of adders *Vipera berus*. *Biological Conservation* 75, 113-118.

Marinone, S.G. 2003. A three-dimensional model of the mean and seasonal circulation of the Gulf of California. *J. Geophys. Res*. 108 (C10), 3325.

Magoulas, A., Gjetvaj, B., Terzoglou, V., Zouros, E. 1998. Three polymorphic microsatellites in the Japanese osyter, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Genetics* 29, 63-72.

McGoldrick, D. J., Hedgecock, D., English, L. J., Baoprasertkul, P., 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. *J. Shellfish Res.* 19, 779-788

McInerney, C. E., Allcock, A. L., Johnson, M. P., Bailie, D. A., Prodohl, P. A. 2010. Comparative genomic analysis reveals species-dependent complexities that explain difficulties with microsatellite marker development in mollusks. *Heredity* 1-10.

Miller, K. M., Supernault, K. J., Li, S., Withler, R. E. 2006. Population structure in two marine invertebrate species *(Panopea abrupta* and *Strongylocentrotus franczscanus)* targeted for aquaculture and enhancement in British Columbia. *J. Shellfish Res.* 1, 33-42.

Naciri, Y., Vogouroux, Y., Dallas, J., Desmarais, E., Delsert, C., Bonhomme. F. 1995. Identification and inheritance of (GA/TC)n and (AC/GT)n repeats in the European flat oyster *Ostrea edulis* (L.). *Mol. Biol. Biotechnol.* 41, 83-87.

Park, S. D. E. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. Ph.D. thesis. University of Dublin. MsTools available at: http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/

Petersen, J., Ibarra, A. M., May, B. 2010. Nuclear and mtDNA lineage diversity in wild and cultured Pacific lion-paw scallops, *Nodipecten subnodosus* (Baja California Peninsula, Mexico). *Mar. Biol*. 157, 2751-2767.

Raymond, M., Rousset, F. 1995. GENEPOP: population genetic for exact test ecumenism. *J. Heredity* 86, 248-249.

Reece, K. S., Ribeiro, W. L., Gaffney, P. M., Carnegie, R. B., Allen, S.K. 2004. Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): Confirmation of Null Alleles and Non-Mendelian Segregation Ratios. *J. Heredity* 95, 346-352.

Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 41, 223-235.

Rocha-Olivares, A., Calderón-Aguilera, L., Aragón-Noriega, E., Saavedra-Sotelo, N., Moreno-Rivera, V. 2010. Genetic and morphological variation of northeast Pacific *Panopea* clams: evolutionary implications. *J. Shellfish Res.* 29, 1–9.

Rodzen, J. R., Agresti, J. J., Tranah, G. J., May, B. P. 1989. Agarose overlays allow simplified staining of Polyacrylamide gels. *BioTechniques* 25, 584.

Rose, C. G., Paynter, K. T., Hare, M. P. 2006. Isolation by distance in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, in Chesapeake Bay. *J Heredity* 97, 158-170.

Rozen, S., Skaletsky, H. J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. y S. Misener (ed). Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, 365−386 pp.

Ryman, N., Palm, S., André, C., Carvalho, G. R., Dahlgren, T. G., Jorde, P. E., Laikre, L., Larsson, L. C., Palmé, A., Ruzzante, D. E. 2006. Power for

detecting genetic divergence: differences between statistical methods and marker loci. *Mol. Ecol.* 15, 2031-2045.

Schlötterer, C., Tautz, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* 20, 211–215.

Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365-371.

Shaklee, J., Bentzen, P. 1998. Genetic Identification of Stocks of Marine Fish and Shellfish. *Bull. of Mar. Sci.* 62, 589-621.

Secretaría de Ganadería, Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) 2007. Plan de Manejo para la Pesquería de Almeja Generosa (*Panopea* spp.) en las Costas de Baja California México. 57 pp.

Sekino, M., Hamaguchi, M., Aranishi, F., Okoshi, K. 2003. Development of novel microsatellite DNA markers from the Pacific Oyster *Crassostrea gigas. Mar. Biotechnol.* 5, 227-233.

Sweijd, N. A., Bowie, R. C. K., Lopata, A. L., Marinaki, A. M., Harley, E. H., Cook, P. 1998. A PCR technique for forensic, species-level identification of abalone tissue. *J. Shellfish Res.* 17, 889-895.

Tremblay, M. J., Loder, J. W., Werner, F. E., Naimie, C. E., Page, F. H., Sinclair, M. M. 1994. Drift of sea scallop larvae *Placopecten magellanicus* on Georges Bank: a model study of the roles of mean advection, larval behavior and larval origin. *Deep Sea Res II* 41, 7-49.

Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 10, 967-981.

Vadopalas, B., Bentzen, P. 2000. Isolation and characterization of di- and tetra-nucleotide microsatellite loci in geoduck clams, *Panopea abrupta*. *Mol. Ecol*. 9, 1433-1449.

Vadopalas, B., LeClair, L. L., Bentzen, P. 2004. Microsatellite and allozyme analyses reveal few genetic differences among spatially distinct aggregations of geoduck clams (*Panopea abrupta*, Conrad 1849). *J Shellfish Res.* 23, 693-706.

Vadopalas, B., Pietsch, T., Friedman, C. 2010. The proper name for the geoduck: Resurrection of *Panopea generosa* Gould, 1850, from the synonymy of *Panopea abrupta* (Conrad, 1849) (BIVALVIA: MYOIDA: HIATELLIDAE). *Malacologia* 52,169–173.

Villalejo-Fuerte, M., Ceballos-Vázquez, B. P., García-Domínguez, F. 1996. Reproductive cycle of *Laevicardium elatum* (Sowerby, 1833) (Bivalvia: Cardiidae) in Bahía Concepción, Baja California Sur, México. *J. Shellfish Res*. 15, 741-745.

Yamtich, J., Voigt, L., Li, G., Hedgecock, D. 2005. Eight microsatellite loci for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Animal Genetics* 36, 524-526.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535-538.

Weber, J. L., May P. E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Midland Naturalist* 80, 1-27.

Whitlock, M. C., McCauley, D. E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: FST ≠ 1 (4Nm+1). *Heredity* 82, 117-125.

Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15, 323-354.

Wright, S. 1977. Evolution and the genetics of population, experimental results and evolutionary deductions. The University of Chicago Press, Chicago. 613 pp.

Yoshida, K., Nakagawa, M., Wada, S. 2005. Multiplex PCR system applied for analyzing microsatellite loci of Schlegel´s black rockfish, *Sebastes schlegeli*. *Mol. Ecol. Notes* 5, 416-418.

Zane L., Bargelloni, L., Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.* 11, 1-16.

Zhan, A., Hu, J., Hu, X., Zhou, Z., Hui, M., Wang, S., Peng, W., Wang, M., Bao, Z. 2009. Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): do local marine currents drive geographical differentiation? *Mar. Biotechnol.* 11, 223-235.

Zhivotovsky, L., Feldman, M. 1995. Microsatellite variability and genetic distances. *Evolution* 92, 11549-11552.

12. ANEXOS

ANEXO 1.

Pares de cebadores diseñados para amplificar por *PCR* regiones microsatélite en *Panopea globosa,* a partir del análisis de secuencias de cinco genotecas enriquecidas con diferentes sondas microsatélite.

Genoteca	Motivo de repetición	Locus		Secuencia de cebador 5' - 3'
CT_{15}	**$(AG)_{25}$**	***Pglo1***	F:	GAAGCACTGATGTATAAGTTTG
			R:	GATAGGAAACTGTAATCTCAACTAC
	$(AG)_{32}$	***Pglo2***	F:	ACATATCAAATATACATCTGGTC
			R:	GTTTAAGGGTCTCGTGG
	$(CCGA)_3$	***Pglo3***	F:	GTGACCATCTTAGCGTAAGC
			R:	CACCGCAAATCATGTGATA
	$(AG)_{21}$…$(AG)_{19}$	***Pglo4***	F:	TCATTGTGCTGTATGGTG
			R:	GAATTGTGAGGTGAATTTG
	CT_{23}	***Pglo5***	F:	CGAAGTGGAGAAGAACTAAC
			R:	ATAGATAGAGCGGATGAGAG
	$(CT)_2CG(CT)_2$	***Pglo6***	F:	GTTCTCCGTGATCGAGTGGT
			R:	TTGGTGGAGGAAAACCTCAG
	$(CAA)_4CATA(CAA)$	***Pglo7***	F:	GCTTAGACTACTGCCTCAAG
			R:	CAAACGGTAACCATGTTC
	$(AG)_{73}$	***Pglo8***	F:	CAGCCTACCGACCCTATT
			R:	GAGCAGGTTGGCAAGTC
GT_{15}	**$(GT)_{56}$**	***Pglo9***	F:	GTATGTGTTTCCAGCATAGTG
			R:	AAGGTGACATCAATAACGAG
	$(AC)_{24}$	***Pglo10***	F:	CATAATAATGGCATTTGCTT
			R:	GCTGTTGTAGTCTTGTGAGTC
$GATA_{10}$	**$(ATCT)_{12}$**	***Pglo11***	F:	CGACATACAACTTTTCGC
			R:	GAAGCCCAATATAGCAGAC
$CTGT_6$	**$(CTGT)_7(CTGC)_3$**	***Pgo12***	F:	CATCCACCTATCCGGTAAG
			R:	CACGTAAACGATATATCTGCAC
	$(CTGT)_{65}$	***Pglo13***	F:	GTTCAGTATTTACAAATGTTTTACG
			R:	GTAGTTGGATATAGTAGTGTTATCTGC
	$(CTGT)_{64}$	***Pglo14***	F:	TGTCAAGCATGGCAGAC
			R:	CAGGCAGACTGATGTAAGATC
	$(CTGT)_6$	***Pglo15***	F:	GGAAGCCAGAAAGTGCCATA
			R:	GCTGGGACCAACAAATTAGC

	$(GA)_3(GT)_9$	***Pglo16***	F:	GTTACCGCCTTGGAACG
			R:	ACGCCTACCTAAAGCCCA
	$(CTGT)_{16}$	***Pglo17***	F:	GTAATTCTGGCGATATAGAAGAC
			R:	CAAAAGTGACGACCCCT
	(CAGA)22	***Pglo18***	F:	AAGTAAGTGAAAGTGTGACG
			R:	CACAGGAACAATAGAACTTG
	$(ACAG)_7$	***Pglo19***	F:	GAAACGGATACTAACATCAC
			R:	ACTATCTCAAACACTTCCTG
	$(CAGA)_6$ $(GT)_{12}$ ..$(GA)_{10}$	***Pglo20***	F:	GCACCAAGTTTGAAGTCAATC
			R:	CTTACTCCAGGTGACGCTCTAG
	$CTGT_{15}CTAT_{22}$	***Pglo21***	F:	GTATCTTCTTACATCTTGACTCAC
			R:	AGTAGTATCATCCTTCCATGAT
	$(ACAG)_{13}$	***Pglo22***	F:	CATAGAGGCAGAAAGAAGGT
			R:	AGGACCACCCACTAGCA
	$(AG)_{21}\ldots(AG)_{19}$	***Pglo23***	F:	AAGTTAAGGACTATAACGGCAGA
			R:	CGTGAACATTACTGACAAAAGA
	(ACAG)n	***Pglo24***	F:	ATCCTCTAAATGCTGACCT
			R:	ATGACACTCCTAAACATAAAGG
	$(CTGT)_{10}$	***Pglo25***	F:	CAGACTATCACATTACTTATAGGGAGAC
			R:	CAACTGCCACGGCTATG
	$(CTGT)_8$	***Pglo26***	F:	ACCAGCCGAGAGAGTGAGAA
			R:	GCAGGCATCCTAAAGCAAAG
	$(ACAG)_8$	***Pglo27***	F:	GTTAGCGGACCACTGATTC
			R:	GCATTTCTTAATACTTCTTGACTAGAC
$(CT)_{15}$ **$(GT)_{15}$**	**$(GT)_{21}$**	***Pglo28***	F:	GAGTTAATCGAAAGAGCACTG
			R:	AACGCAACCTCTCCTAGTT
	$(AG)_{73}$	***Pglo29***	F:	AGAATAGAACGGGAAAGTG
			R:	CGTTACTGTCTGTATGAAGATG
	$(AG)_{25}A(AG)_{19}$	***Pglo30***	F:	ATGGGGGAAAGTGGAAAGAA
			R:	GATGTTAAAGGTGGCGGATG
	$(GT)_{21}$	***Pglo31***	F:	ACGGAATGTCATTTCATCAG
			R:	GCAACCTCTCCTAGTTTCG
	$(GA)_n$	***Pglo32***	F:	ACAAGTAGAATAAGAGAATGATG
			R:	CAGTGAGACAAATATACACGT
	$(CTGC)_8(CTGT)_6(CT)_{34}$	***Pglo33***	F:	CATGAACCTGAATTTTCAAC
			R:	TACATAATGCGATAGTTATACATG
	$(CT)_{39}$	***Pglo34***	F:	CAGAATCCGCTAGAGATCA
			R:	ATGCAGATAATACACAAACGA
	$(AG)_{45}$	***Pglo35***	F:	GTTTCAACGCATTTAATCAT
			R:	CAACGGAAATACAAAACTCA
	$(CT)_4GT(CT)_{23}$	***Pglo36***	F:	CATGAGGTTAGGAACGAA
			R:	AGCTGTAATGTTAGACCGA

En negritas los motivos de repetición que fueron efectivamente identificados por la sonda utilizada en el enriquecimiento.