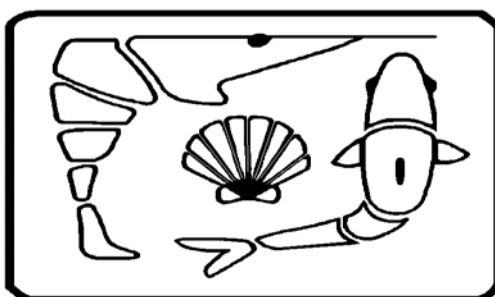


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ACUACULTURA



VARIABILIDAD GENÉTICA E ÍNDICE DE ENDOGAMIA MEDIANTE EL
ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES EN DOS GENERACIONES CULTIVADAS DE
UN LINAJE DE OSTIÓN, *Crassostrea gigas*, DIPLOIDE

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

OVIDIO IZAGUIRRE CASTRO

Hermosillo, Sonora.

Agosto del 2009

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designados para revisar la tesis de Ovidio Izaguirre Castro, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

Dr. José Manuel Grijalva Chon
Presidente del Jurado
Director de tesis

Dr. Marco Antonio López Torres
Sinodal Secretario

Dra. Reina Castro Longoria
Sinodal

M.C. Francisco Hoyos Chairez
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora y al Laboratorio de Genética que me permitió realizar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo económico a través de su programa de becas de posgrado.

Mis agradecimientos a mi director de tesis el Dr. José Manuel Grijalva Chon por su asesoría, por la confianza puesta en mí para la realización de este trabajo y por ser el pilar de mi tesis.

A mi comité de tesis la Dra. Reina Castro Longoria, el Dr. Marco Antonio López Torres y al M. C. Francisco Hoyos Chairez.

Al Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora por proporcionar los organismos utilizados en este estudio.

A mis maestros de la Maestría en Ciencias en Acuicultura, por haberme brindado sus conocimientos.

A mis amigos y compañeros por su apoyo y amistad.

DEDICATORIA.

A mis padres y hermanos

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
I.1.- Anatomía y biología del ostión	2
I.2.- Aspectos genéticos	4
I.3.- Marcadores genéticos	5
I.4.- Antecedentes de estudios genéticos en <i>Crassostrea</i>	10
I.5.- La problemática de la región	11
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO	13
III.- OBJETIVOS	14
II.1 Objetivo General	14
II.2 Objetivos Particulares	14
IV.- MATERIALES Y METODOS	15
IV.1. Obtención de las muestras	15
IV.2. Extracción del ADN	15
IV.3. Análisis de microsatélites y PCR	15
IV.4. Electroforesis	16
IV.5. Análisis estadísticos	18
V.- RESULTADOS	20
VI. DISCUSIONES	38
VII. CONCLUSIONES	42
VIII. RECOMENDACIONES	43
IX. LITERATURA CITADA	44

RESUMEN

A partir de ostiones diploides, *Crassostrea gigas*, con los que se pretende implementar un nuevo linaje en un laboratorio de producción, se evaluó la variabilidad genética en muestras aleatorias de un lote de reproductores (N = 73) y de la progenie F1 (N = 80) por medio del análisis de seis loci de microsatélites. Se detectaron un total de 66 alelos y 146 genotipos diferentes en la muestra de la población de progenitores y 68 alelos y 168 genotipos en la muestra de F1. La heterocigosis promedio observada fue de 0.65 ± 0.04 en progenitores y de 0.67 ± 0.05 en la F1, sin diferencias significativas entre ellas. La diferenciación genética medida por *Fst* y *Rst* fue de 0.023 y de 0.049, respectivamente. Todos los loci mostraron un déficit de heterocigotos, a excepción de *ucdCg10* de la progenie, pero no se encontró evidencia de una endogamia crítica acumulada. De los seis loci analizados, cinco presentaron diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas, lo que indicó que las muestras analizadas tienen una estructura genética diferente pero con el mismo nivel de variabilidad genética. Por lo anterior, es posible continuar con la obtención de una F2 sin esperar un deterioro en la variabilidad, siempre y cuando se maneje un número adecuado de progenitores.

ABSTRACT

The genetic variability was evaluated in random samples of two consecutive generations of Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, intended to establish a new strain. Samples represented the broodstock (N = 73) and its progeny (N = 80). The genetic analysis was done with six microstallite loci. A total of 66 alleles and 146 genotypes in the broodstock sample, and 68 alleles and 168 genotypes in the progeny sample were detected. The mean observed heterozygosity was 0.65 ± 0.04 for broodstock, and 0.65 ± 0.05 for progeny, with no significant differences between them. The mean genetic differentiation index was 0.023 for *Fst* and 0.049 for *Rst*. All loci showed a deficit of heterozygotes with the exception of *ucdCg10* in progeny, but no evidence of cumulate inbreeding was found. Five loci demonstrated differences in allelic and genotypic frequencies which indicates that both samples have a different population genetic structure but with an equal genetic variability. It is possible to obtain a F2 generation without expecting a deteriorated genetic variability as long as the number of breeders should be large.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Ejemplo de un organismo heterocigoto para un locus microsatelital dinucleótido AC _n .	7
2	Ejemplos de algunos fenotipos para el locus microsatelital <i>Cg49</i> en nueve individuos de ostión japonés, <i>Crassostrea gigas</i> . M = marcador molecular de 100 pares de bases.	21

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I	Secuencia de iniciadores para la amplificación de 6 microsatélites en ostión japonés, <i>C. gigas</i> (Launey y Hedgecock, 2001).	17
II	Variabilidad genética de dos generaciones de ostión japonés, <i>C. gigas</i> , producidos en Sonora. Entre paréntesis error estándar.	22
III	Número de alelos por locus (N), heterocigosis observada (<i>Ho</i>), heterocigosis esperada (<i>He</i>) y número de organismos analizados por locus (n) en un lote de reproductores de ostión japonés, <i>C. gigas</i> .	23
IV	Número de alelos por locus (N), heterocigosis observada (<i>Ho</i>), heterocigosis esperada (<i>He</i>) y número de organismos analizados por locus (n) en la generación F1 de ostión japonés, <i>C. gigas</i> .	25
V	Frecuencia de alelos nulos de dos generaciones de ostión japonés, <i>C. gigas</i> , producidos en Sonora.	26
VI	Frecuencias genotípicas de dos generaciones de ostión japonés, <i>C. gigas</i> , producido en Sonora. Entre paréntesis significancia de la prueba de heterogeneidad (prueba <i>G</i>).	27
VII	Frecuencias alélicas de dos generaciones de ostión japonés, <i>C. gigas</i> , producido en Sonora. Entre paréntesis significancia de la prueba de heterogeneidad (prueba <i>G</i>).	30
VIII	Coefficiente <i>D</i> , coeficiente de endogamia (<i>Fis</i>) y coeficiente de diferencia genética (<i>Fst</i>) para dos generaciones de ostión japonés, <i>C. gigas</i> , producidos en Sonora.	32
IX	Significancias para el exceso y déficit de heterocigotos en dos generaciones de ostión japonés, <i>C. gigas</i> , producidos en Sonora.	33

X	Número de individuos observados y esperados, número de genotipos totales y en desequilibrio para homocigotos y heterocigotos de un lote de reproductores de ostión japonés, <i>C. gigas</i> . P = significancia para el equilibrio de Hardy-Weinberg.	34
XI	Número de individuos observados y esperados, número de genotipos totales y en desequilibrio para homocigotos y heterocigotos de una muestra de la generación F1 de ostión japonés, <i>C. gigas</i> . P = significancia para el equilibrio de Hardy-Weinberg.	35
XII	Análisis de varianza molecular (AMOVA) y <i>Rst</i> entre dos generaciones de ostión japonés, <i>C. gigas</i> , producidos en Sonora.	37

I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

La ostricultura representa dentro de la acuicultura marina uno de los grupos más importantes desde el punto de vista productivo y económico (Fundación Alfonso Martín Escudero, 2002). La ostricultura en el mundo esta dominada básicamente por el ostión japonés (*Crassostrea gigas*) debido a la magnitud de la producción que en el 2005 alcanzó 4.5 millones de toneladas métricas (FAO, 2006a).

El ostión *C. gigas* es originario de las costas de Japón, Corea y China. Su historia de cultivo supera los 350 años en Japón y fue introducida en todos los continentes debido a su gran capacidad de adaptación a las diferentes condiciones del medio. Los principales países que realizan su cultivo son Canadá, China, Corea, Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda, Francia, Inglaterra, México, Chile, entre otros (Uriarte, 2008).

En México fue introducido por primera vez en 1973 en Bahía de San Quintín B.C. con semilla proveniente de laboratorios de Washington (De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991); Actualmente los cultivos se localizan en las lagunas costeras del noroeste de México, en el Mar de Cortés y alrededor de la Península de Baja California. En el 2004 México obtuvo una producción de 46,601 toneladas por acuicultura (CONAPESCA, 2007).

El cultivo de moluscos bivalvos en Sonora es una actividad que inició a finales de 1980 con la importación de los primeros lotes de semilla de ostión cultivado a nivel comercial. Para 1984 se construyó el laboratorio de producción de semilla de ostión y otros moluscos bivalvos, hoy denominado Centro Reprodutor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES).

Los ostiones son moluscos del grupo de los bivalvos, al que pertenecen gran número de especies comestibles que el hombre aprovecha como alimento por su alto valor nutritivo y por las grandes posibilidades que tiene el cultivarlos (Cifuentes-Lemus *et al.*, 1990), donde los

más utilizados son los cultivos en suspensión en línea madre y balsas, así como los cultivos de fondo en costales y racas y las camas flotantes (Mazón, 1996).

I.1.- Anatomía y biología del ostión.

Los ostiones están comprimidos lateralmente y las partes blandas del cuerpo están completa o parcialmente recubiertas por la concha, que está formada por dos valvas. Las branquias de los animales de esta clase son órganos bien desarrollados y especializados para la alimentación, así como para la respiración. Presentan una concha de forma irregular y asimétrica, las valvas están formadas principalmente de carbonato cálcico y tienen tres capas; la capa interna o nacarada, la capa intermedia o brillante que forma la totalidad de la concha y la capa externa o periostraco, pardusca y áspera (FAO, 2006b).

El ciclo completo del ostión japonés cultivado en México tiene una duración promedio de 12 meses. La talla final comercial promedio es de 100 mm, pero es frecuente su comercialización con 80 mm, algo menor a un año de cultivo, y llega a venderse ostiones gigantes de más de 150 mm, de dos o más años de edad. El crecimiento promedio por mes en el ostión hasta el primer año de vida es de 8.33 mm. Se pueden utilizar distintos métodos para medir el crecimiento de bivalvos, entre ellos, los incrementos de longitud o altura de la concha, los incrementos del peso total o de la parte blanda o una combinación de todos ellos.

En la mayoría de los bivalvos, la madurez sexual depende del tamaño del animal más que de su edad y el tamaño que alcanzan en la madurez sexual varía de una especie a otra y según la localización geográfica. En cuanto a su reproducción, la producción de óvulos y esperma es un proceso cuyo inicio depende de varios factores, como el tamaño del bivalvo, la temperatura y la cantidad y calidad de alimento que recibe. Existen varios factores ambientales

que pueden inducir el desove, de los cuales cabe mencionar la temperatura, los estímulos químicos y físicos, las corrientes de agua o una combinación de estos y otros factores. La presencia de esperma en el agua a menudo estimula el desove de animales de la misma especie. En ambientes tropicales, algunas especies de bivalvos mantienen sus gametos maduros durante todo el año y desovan cantidades limitadas durante los doce meses (FAO, 2006b). El alimento óptimo de los bivalvos sigue siendo una incógnita, pero indudablemente el fitoplancton constituye la parte principal de la dieta. Otras fuentes de alimentación pueden ser importantes, como las finas partículas de materia orgánica muerta (detritus) con bacterias asociadas y materia orgánica disuelta (FAO, 2006b).

El éxito de las poblaciones en diversos ambientes se atribuye a una capacidad ecológica superior, otorgada muy probablemente por los altos valores de variabilidad genética que presenta esta especie (Ozaki y Fujio, 1985). De esta forma, en la producción de organismos es muy importante el conocimiento y seguimiento de la estructura genética de las poblaciones (Benzie y Williams, 1996). La diversidad genética es una característica que les permite a las especies responder y adaptarse a los cambios en su ambiente. Por ende, la pérdida de diversidad se asocia con una disminución de este potencial, haciendo a las especies más susceptibles a las enfermedades y a los cambios ambientales. La disminución de la diversidad genética puede deberse a diversos factores como endogamia, deriva genética y cuello de botella, cuyos efectos se incrementan cuando el tamaño poblacional disminuye (Frankham, 1996).

I.2.- Aspectos genéticos.

La evaluación de recursos genéticos se ha venido realizando principalmente mediante el análisis de la variación genética de tipo cualitativo esencialmente neutral. A partir de las frecuencias de variantes alélicas de diferentes marcadores (isoenzimas, AFLP, RAPD, microsatélites, entre otros) o mediante el análisis de secuencias mayoritariamente mitocondriales, se han evaluado niveles de diversidad genética y establecido patrones de diferenciación así como analizado las relaciones filogenéticas (Frankham, 1995).

La importancia del estudio de la variabilidad genética radica en que constituye el material de partida sobre el que actúan los agentes que producen los cambios de la estructura genética de las poblaciones. Dichos agentes son básicamente la mutación, la migración, la deriva genética y la selección natural. Además, el conocimiento de la cantidad y de la distribución de la variabilidad genética dentro de las especies es de gran importancia para llevar a cabo un aprovechamiento racional de los recursos biológicos (Álvarez, 1987).

La acuicultura ha ido incorporando, aunque lentamente, las nuevas herramientas de la genómica en los últimos años, siguiendo las líneas aplicadas en agricultura y ganadería. Los estudios de variabilidad genética en acuicultura son importantes ya que identifican las modificaciones genéticas sufridas al llevar a cabo la reducción del tamaño de la población mediante la siembra en granja; determinan el impacto de la selección artificial en términos de variabilidad; ayudan a mejorar los programas de selección de reproductores y pueden evitar, en un momento dado, el fracaso de una inversión económica (De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991). Además, la información generada puede ser vital para el diseño e implementación de un manejo apropiado de las especies de interés acuícola (Rivera-García y Grijalva-Chon, 2006).

Este tipo de estudios son de gran importancia para realizar estimaciones de la diversidad genética y de la consanguinidad existente en poblaciones (Takezaki y Nei, 1996), ya que una de las principales consecuencias de la consanguinidad es el incremento de los homocigotos (los dos alelos iguales en un locus) con disminuciones en fecundidad y variabilidad. Todo organismo puede ser portador de alelos recesivos deletéreos, enmascarados por alelos dominantes normales. Si estos alelos deletéreos se expresan, producen fenotipos subviables, anormales o letales. Cuando se cruzan individuos emparentados que llevan alelos iguales por descendencia, los alelos recesivos se pueden unir, lo que permite que el fenotipo se exprese y produzca una progenie con fenotipos letales o anormales. El cruce de individuos no relacionados también puede producir una descendencia con fenotipos letales o no deseables, pero con porcentajes menores (Pérez, 1996).

I.3.- Marcadores genéticos.

Para elegir el tipo de marcador genético a utilizar, éste debe presentar: herencia estable (baja tasa de mutación), que sea reproducible, preciso, no presencia de alelos “nulos”, información del genotipo transferiblemente rápida, no limitado únicamente a muestras sanguíneas frescas, que no requiera grandes cantidades de ADN y que presenten una segregación independiente con los otros marcadores (utilizados en pruebas combinadas) (Aranguren-Méndez *et al.* 2005).

En la actualidad, muchos de estos estudios se basan en los análisis genéticos a través del uso de marcadores moleculares de ADN. Entre estos marcadores se cita el uso de los microsatélites. Los microsatélites, son marcadores moleculares que rápidamente se han convertido en una de las herramientas más confiables y fáciles de automatizar para efectuar

estudios de diversidad y estructura genética de poblaciones. Consisten en secuencias cortas de ADN, de uno a seis nucleótidos, repetidas cierto número de veces (Figura 1) y se encuentran esparcidos por todo el genoma de los organismos eucariontes (Tautz, 1989) y procariontes (Zane *et al.*, 2002).

Desde el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en Inglés) por Mullis *et al.* (1986), se han ido desarrollando una serie de técnicas para realizar estudios de variabilidad genética en las especies animales (Aranguren-Méndez y Jordana, 2001). La técnica de PCR consiste en la amplificación o reproducción “*in vitro*” de grandes cantidades de una región particular del ADN, a partir de una pequeña cantidad original de ADN (molde) y con el uso de dos secuencias cortas e informativas de oligos, denominados iniciadores o “*primers*” (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). Los oligos resultan ser específicos de la región de interés y garantizan que sólo esa parte, y ninguna otra, se va a amplificar.

La forma más sencilla de analizar la variación de las regiones microsatelitales es recurrir a la PCR. Sintetizando oligos complementarios a las regiones flanqueantes del microsatélite, las diferencias en el número de repeticiones del microsatélite se amplificarán y visualizarán como fragmentos de ADN de diferente longitud. Cada una de las regiones microsatélites constituye un locus genético y los diferentes tamaños de bandas que se pueden amplificar constituyen los diversos alelos de ese locus (Cenic, 2000).

Los microsatélites fueron inicialmente descritos en humanos y en poco tiempo fueron hallados en otros mamíferos (Rossetto *et al.*, 1999). Su potencial como marcadores útiles para los estudios en invertebrados fue rápidamente reconocido, resultando en su aislamiento y aplicación en muchas especies. Una de las principales utilidades de este tipo de marcador, es

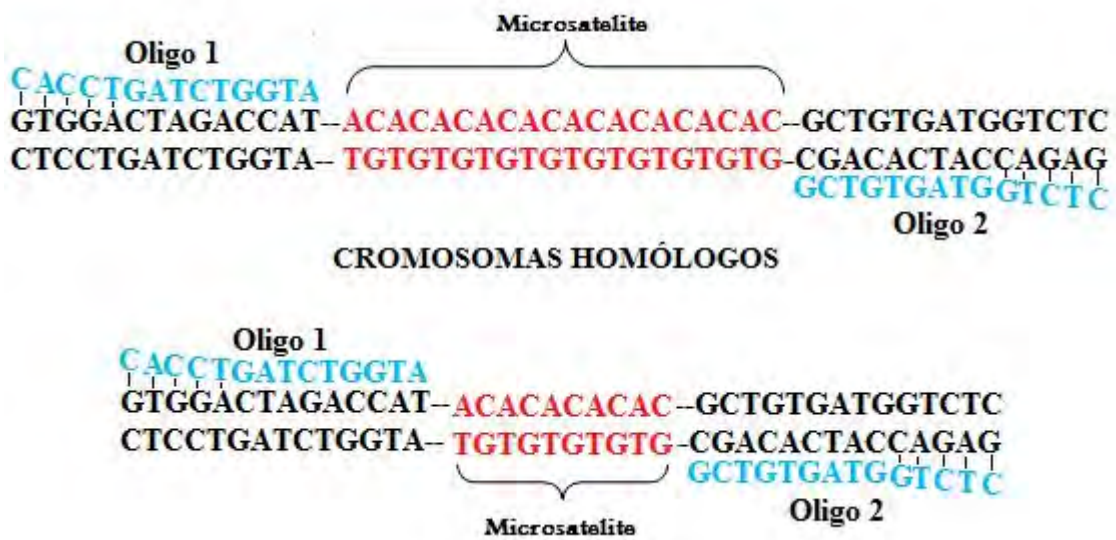


Figura 1.- Ejemplo de un organismo heterocigoto para un locus microsatelital di-nucleótido AC_n.

la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas, además la información que éstos marcadores suministran es esencial para elucidar patrones de flujo génico, variables y parámetros demográficos y estructura familiar (Milligan *et al.*, 1994).

Una de las ventajas de estos marcadores sobre otros (minisatélites, RFLP, RAPDs entre otros) radica en que están considerados por la mayoría de los autores como una de la más poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones (Cheng y Crittenden, 1994) ya que son muy polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos). Son fáciles de medir y analizar, y son totalmente fiables y automatizables (Aranguren-Méndez y Jordana, 2001). Además tienen un fácil manejo en el laboratorio, por lo que es posible hacer múltiples amplificaciones en una sola reacción de PCR y se requiere de pequeñas cantidades de DNA para llevar a cabo su análisis (Goldstein y Schlötterer, 1999).

El elevado polimorfismo que presentan los microsátélites y la posibilidad de identificar ambos alelos, los hace muy útiles para identificaciones individuales, porque es muy poco probable que dos individuos elegidos al azar, si son analizados para una serie de éstos marcadores, compartan todos sus alelos (Aranguren-Méndez y Jordana, 2001). Otra característica muy interesante de los microsátélites es su gran reproducibilidad, dado que es posible obtener los mismos resultados en cualquier laboratorio del mundo, a diferencia de los RAPD. La única limitación significativa de los microsátélites puede ser la inversión inicial de recursos económicos y la experiencia técnica requerida para la clonación y secuenciación de los loci microsateles. Esta limitación puede solventarse si en la literatura se reportan microsátélites identificados para las especies de interés.

Por otro lado, limitaciones con menor frecuencia o efecto se darían en el caso de que ocurriesen mutaciones en el sitio de apareamiento de los iniciadores, lo cual tendría como resultado alelos nulos. Otra limitación es la presencia de "bandas tartamudas". Estas últimas se encuentran frecuentemente asociadas con la amplificación de ADN repetitivo como es el caso los microsatélites. Las "bandas tartamudas" son productos de la amplificación por PCR que difieren en una unidad de repetición con respecto a la longitud del alelo original. La ocurrencia de estos artefactos dificulta la lectura de los geles, e inclusive, repetidamente son confundidos como alelos, complicando el análisis genotípico. Sin embargo, estas consideraciones no han desalentado a muchos investigadores quienes han convertido a los microsatélites en una herramienta muy popular (Chambers y MacAvoy, 2000).

La diversidad o variabilidad genética se puede definir como "la habilidad genética para variar", y por ende, la capacidad a responder tanto a variaciones de índole ambiental como a cambios en los objetivos de selección. Es así que la variabilidad genética constituye la base del progreso genético (Rochambeau *et al.*, 2000) y puede ser medida a través de una gran diversidad de estadísticos que cuantifican la variabilidad genética y resumen la información a términos más manejables. Cada uno de ellos aprecia diferentes aspectos de la variabilidad y su utilidad práctica estará en función del propósito del estudio. Los mas empleados son: porcentaje de loci polimórficos, el número medio de alelos por locus, la heterocigosidad (esperada y observada), el coeficiente de endogamia, las diferencias en las frecuencias genéticas, entre otros (Aranguren-Méndez *et al.*, 2002).

Si lo que se pretende es analizar las diferencias existentes dentro de las poblaciones, la variabilidad detectada por medio de microsatélites se convierte en un instrumento eficaz de estudio e información. Esto puede hacerse de diversas formas, entre las principales, la tasa o

índice de contenido polimórfico (PIC), número medio de alelos por locus, la heterocigosidad, la probabilidad de exclusión (PE), y la divergencia evolutiva entre ellas sobre la base de sus frecuencias génicas. Para ello, resulta más indicado el uso de los índices de distancia genética que permiten establecer comparaciones y determinar sus relaciones filogenéticas y los análisis de la estructura de la población, mediante el uso de los estadísticos F (Weir y Cockerham, 1984). Este último análisis permite determinar el déficit o exceso de heterocigotos en la población.

I.4.- Antecedentes de estudios genéticos en *Crassostrea*.

Algunos de los primeros estudios de variabilidad genética que se realizaron en *Crassostrea* se llevaron a cabo mediante el análisis con alozimas (Buroker *et al.*, 1979; Ozaki y Fujio 1985; McGoldrick y Hedgecock, 1997; English *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000 y Enríquez-Espinosa, 2008) Aun cuando estos estudios han ofrecido buenos resultados, en la actualidad los microsatélites son una de las herramientas moleculares más utilizados. Yu *et al.* (2008) realizaron estudios con poblaciones de *C. plicatula* y *C. gigas* para determinar diferencias genéticas entre ellas mediante siete loci microsatelitales y observaron que todos los loci mostraron polimorfismo en todas las poblaciones y la variabilidad genética de los siete loci microsatelitales demostraron ser amplios, como el índice de variabilidad genética y heterocigosis más elevada que los encontrados en estudios con alozimas (Yang *et al.*, 2000), de lo cual se concluyó que las dos especies están estrechamente relacionadas. Además, los datos obtenidos en éste estudio demostraron que los marcadores de microsatélites son útiles para evaluar la divergencia genética entre poblaciones de *C. plicatula* y *C. gigas*, incluso en poblaciones simpátricas. Li *et al.* (2006) estudiaron cinco poblaciones cultivadas de *C. gigas*

con siete microsatélites polimórficos para evaluar la diversidad alélica y heterocigosidad entre las poblaciones y encontraron que la variabilidad genética fue alta para todas las poblaciones y también observaron una importante diferencia genética entre ellas.

Sekino *et al.* (2003), evaluaron la variabilidad genética en poblaciones de *C. gigas* mediante nueve pares de oligos y observaron que ocho de los nueve loci mostraron variación alélica. También observaron una discrepancia de proporciones genotípicas en el equilibrio de Hardy-Weinberg, así como un locus con una aparente deficiencia de heterocigotos. Li *et al.* (2003), realizaron estudios con 79 microsatélites en *C. gigas* y encontraron que 41 de los 79 microsatélites mostraron alelos nulos.

Yu y Guo (2005), llevaron a cabo estudios en cinco poblaciones de *C. virginica*, empleando microsatélites y AFLPs y ambos métodos revelaron diferencias significativas entre las poblaciones. Los AFLPs también pueden ser utilizados en análisis de poblaciones cuando no se dispone de microsatélites. Sin embargo, los microsatélites son más variables que los AFLPs, ya que muestran niveles significativamente mayores de heterocigosis debido a su naturaleza hipervariable y multialélica.

1.5.- La problemática en la región.

En el estado de Sonora el CREMES es proveedor de semilla de ostión en la región y su producción alcanza los 50 millones de semillas al año de ostión japonés (*C. gigas*) así como el nativo (*C. corteziensis*), misma que es demandada por más de 50 grupos del sector social¹.

¹ Centro Reprodutor de Especies Marinas del Estado de Sonora. http://www.iaes.gob.mx/index.php?option=com%20_content&task=view&id=29

Pero uno de los problemas ha sido una producción tendiente a la baja, principalmente por las mortalidades periódicas en los ciclos de cultivo.

Como una posible solución al problema, el CREMES busca establecer nuevos linajes de ostión. Uno de los métodos mas ampliamente usado en la formación de nuevos lotes es la selección de individuos con características visuales favorables (de mayor tamaño y con mejores condiciones reproductivas) y que generalmente no son muy numerosos, generando esa forma un cuello de botella poblacional. Debido a esa selección pueden presentarse problemas de endogamia por la alta relación genética entre los individuos, lo cual ocasiona pérdida de la variabilidad genética en los reproductores y en sus progenies. Tomando eso en cuenta, en este estudio se analizará la variabilidad genética de dos primeras generaciones de un nuevo lote de ostión japonés diploide adquirido por el CREMES.

III.- HIPÓTESIS DE TRABAJO.

El nivel de variabilidad genética disminuirá de una generación a la siguiente en un linaje de cultivo de *C. gigas*.

II.- OBJETIVOS.

II.1.- Objetivo general.

Evaluar la variabilidad genética y el índice de endogamia en las dos primeras generaciones de un linaje de ostión japonés, *Crassostrea gigas*, de un laboratorio de producción, mediante el análisis de microsatélites.

II.2.- Objetivos particulares.

- a) Mediante seis marcadores microsatelitales determinar el polimorfismo, número de alelos y heterocigosis en dos generaciones de ostión.
- b) Comparar la variabilidad genética entre las dos generaciones.
- c) Determinar el nivel de endogamia.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.

IV.1.- Obtención de las muestras.

El origen de estos organismos se sitúa en Francia, de un lote que adquirió el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR - La Paz, B.C.S.). El CIBNOR llevó a la madurez sexual a esos organismos y obtuvo progenie de la cual una parte adquirió el CREMES como semilla y estableció un pie de cría del cual se tomaron 73 organismos adultos con un peso promedio de 166.05 gr. A su vez, el CREMES indujo al desove a estos organismos y de los cuales se tomaron 80 organismos de la generación F1 producida en Sonora con un peso promedio de 40.16 gr.

IV.2.- Extracción de ADN.

La extracción de ADN se realizó mediante el paquete comercial de reactivos QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la extracción se tomó aproximadamente 25 mg de tejido del músculo aductor de cada uno de los organismos. La cuantificación de ADN y una estimación de su pureza se determinaron por medio de espectrofotometría UV con un espectrofotómetro Ultraspec 3300 *pro*.

IV.3.- Análisis de microsatélites y PCR.

Se analizaron seis loci microsatelitales desarrollados para *C. gigas* y reportados por Launey y Hedgecock (2001). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en tubos eppendorf de 0.2 ml. Se utilizaron perlas Ready-to-go PCR beads (Amersham Biosciences Limited) las cuales contienen liofilizado de Taq ADN polimerasa ~2.5 U, Tris HCl (pH 9.0) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM y dNTP's (dATP 200 μM, dCTP 200 μM,

dGTP 200 μ M, dTTP 200 μ M) para reacciones de 25 μ l. Las reacciones se realizaron en 12.5 μ l con la mitad de los componentes a lo cual se le agregó 0.150 ng de ADN, 10 pM de cada set de oligos y agua libre de nucleasas.

La amplificación de ADN se realizó en un termociclador Techne TC-412. Las condiciones de amplificación constaron de un periodo de desnaturalización inicial de 3 minutos a 94 °C seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a la temperatura óptima de cada oligo utilizado (Tabla I) y 1 minuto a 72 °C, con una extensión final de 5 minutos a 72 °C.

IV.4.- Electroforesis.

El producto de la amplificación se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 3% con 2.5 μ l de bromuro de etidio y con amortiguador TAE 1X (Tris HCl 10mM, ácido acético glacial, EDTA 1mM, pH 8.0). Para determinar el peso de las bandas se agregó 2 μ l de marcador de peso molecular Trackit 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) en el primer carril y 10 μ l del producto de la amplificación en los carriles subsiguientes. Los geles se corrieron a 90 voltios por un periodo de 120 a 140 minutos aproximadamente, en una cámara para electroforesis Minicell EC370M. Posteriormente, los geles se enjuagaron con agua deionizada para eliminar el exceso de bromuro de etidio y finalmente se visualizó en un fotodocumentador MiniBis (Bio-imaging System) con transluminador de luz UV.

Tabla I.- Secuencia de iniciadores para la amplificación de 6 microsatélites en ostión japonés, *C. gigas* (Launey y Hedgecock, 2001).

Locus	Secuencia del oligo (5'-3')	Temp. de alineamiento
<i>L10</i>	GGTCAATTCAAAGTCAATTTCCC CATGTTTTCCCTTGACTGATCC	55 °C
<i>L48</i>	TCAAACCATCTGCTCGTCTACG TCCGAAAATCCAGGAATACCGG	60 °C
<i>Cg49</i>	CATCAGGGGTAAATTAAGTAAGC CCACAGACGATTTTCATATATCCTG	55 °C
<i>Cg108</i>	ATATGTAATGATTACGAAACTC GTATGAGATTTGGTTCCACC	55 °C
<i>ucdCg10</i>	TGCACCAATTTGAGATGTGA ACTGAGTTTGAAAATGTCACCG	50 °C
<i>ucdCg14</i>	ACTCGGCGAAACTTCTAATAC TTAGCTGCCGCTCAAGTTTT	50 °C

V.5.- Análisis estadísticos.

Los pesos moleculares de las bandas obtenidas fueron determinados por comparación con los marcadores de peso molecular con el programa *Gelquant*. Los alelos encontrados dentro de las dos poblaciones fueron codificados en una matriz. Esta matriz fue utilizada para realizar los análisis posteriores. El número de alelos por locus (N), la heterocigosis observada (H_o) y la heterocigosis esperada (H_e) se analizaron con el programa *HW-Quickcheck* (Kalinowski, 2006). La frecuencia de alelos nulos, las frecuencias genotípicas y fenotípicas, el exceso y déficit de heterocigosis, el coeficiente de endogamia (F_{is}) y porcentaje de loci polimórficos, se evaluaron con el programa *GENEPOP* versión 4.0 (Raymond y Rousset, 1995). El coeficiente $D = (H_o - H_e)/H_e$ y la distancia genética insesgada de Nei (1978) se determinaron con el programa *BIOSYS-1* (Swofford y Selander, 1981).

Se obtuvieron dos índices de diferenciación genética. Por medio de *BIOSYS-1* se calculó el F_{st} con base en las frecuencias alélicas y con *GenAlEx6* (Peakall y Smouse, 2006) se obtuvo el R_{st} , el cual es un análogo al F_{st} pero diseñado para microsatélites y no se basa en las frecuencias sino en el tamaño de los alelos. Este índice se obtiene a través de un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) con la opción “Codom-Microsat” para la distancia genética a partir del tamaño en pares de bases de los alelos. Se probó las hipótesis $F_{is} = 0$ y $F_{st} = 0$ mediante las formulas $\chi^2 = F_{is}^2 N (k-1)$ con g.l. = $k(k-1)/2$ y $\chi^2 = 2NF_{st}(k-1)$ con g.l. = $(k-1)(s-1)$, donde k es el número de alelos diferentes, N el número de organismos y s el número de muestras (Li y Horvitz, 1953; Workman y Niswander, 1970).

Para detectar si las muestras analizadas habían sufrido un cuello de botella se utilizó el programa *Bottleneck* (Piry *et al.*, 1999; Cornuet y Luikart, 1996). En poblaciones con fuertes reducciones poblacionales la diversidad alélica se reduce más rápidamente que la

heterocigosis y la heterocigosis esperada (He) será mayor que la heterocigosis esperada en el equilibrio mutación-deriva (Heq), a diferencia de las poblaciones en equilibrio en donde existe la misma probabilidad de que un locus presente un exceso o un déficit de He . El programa *Bottleneck* calcula para cada locus de cada muestra, la distribución de He a partir del número de alelos observados bajo la suposición de un equilibrio mutación-deriva. Para esto se utilizó la opción “*Two Phases Model*” (TPM), que es lo mas recomendado para microsatélites y se obtiene así un Heq promedio que se compara con He para determinar si hay un exceso o déficit de diversidad en cada locus, con significancias obtenidas a través de una prueba de Wilcoxon.

V.- RESULTADOS.

La metodología de extracción de ADN permitió obtener productos de PCR de buena calidad. En la figura 2 se puede observar un ejemplo de los bandeos presentados en algunos de los organismos con el oligo Cg49. Las bandas obtenidas representan alelos a partir de los cuales se alimentaron los programas estadísticos. Todos los loci mostraron polimorfismo en las dos poblaciones de *C. gigas*. En la tabla II se resume la variación genética de ambas poblaciones, donde se observa que el tamaño promedio de la muestra por locus para la muestra del lote de progenitores y progenie fue de 64.0 ± 2.4 y 78.3 ± 1.3 , respectivamente. La diversidad genética fue evaluada como número de alelos promedio por locus, la heterocigosis observada y la heterocigosis esperada según las expectativas de Hardy-Weinberg.

El número promedio de alelos por locus para la muestra del lote de progenitores fue de 11 ± 1.24 y de 11.33 ± 1.7 para la progenie. La heterocigosis promedio observada y esperada para progenitores fue de 0.65 ± 0.04 y 0.81 ± 0.02 , respectivamente, las cuales fueron estadísticamente diferentes entre sí ($P < 0.01$). Así mismo, la progenie presentó diferencias significativas ($P < 0.01$) en los promedios de heterocigosis esperada y observada con valores de 0.84 ± 0.03 y 0.67 ± 0.05 , respectivamente. Además, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las heterocigosis esperadas y observadas de ambas poblaciones. El porcentaje de loci polimórficos fue de 100% para ambas poblaciones utilizando el criterio de 0.95.

Con el análisis de seis loci de microsatélites, se detectaron un total de 66 alelos y 146 genotipos diferentes en la muestra del lote de progenitores. El número de alelos por locus (N) presentó un valor mínimo de 7 (*Cg108*) y un máximo de 15 (*ucdCg14*), la heterocigosis esperada y observada por locus varió entre 0.73-0.89 y 0.51-0.74, respectivamente (Tabla III).

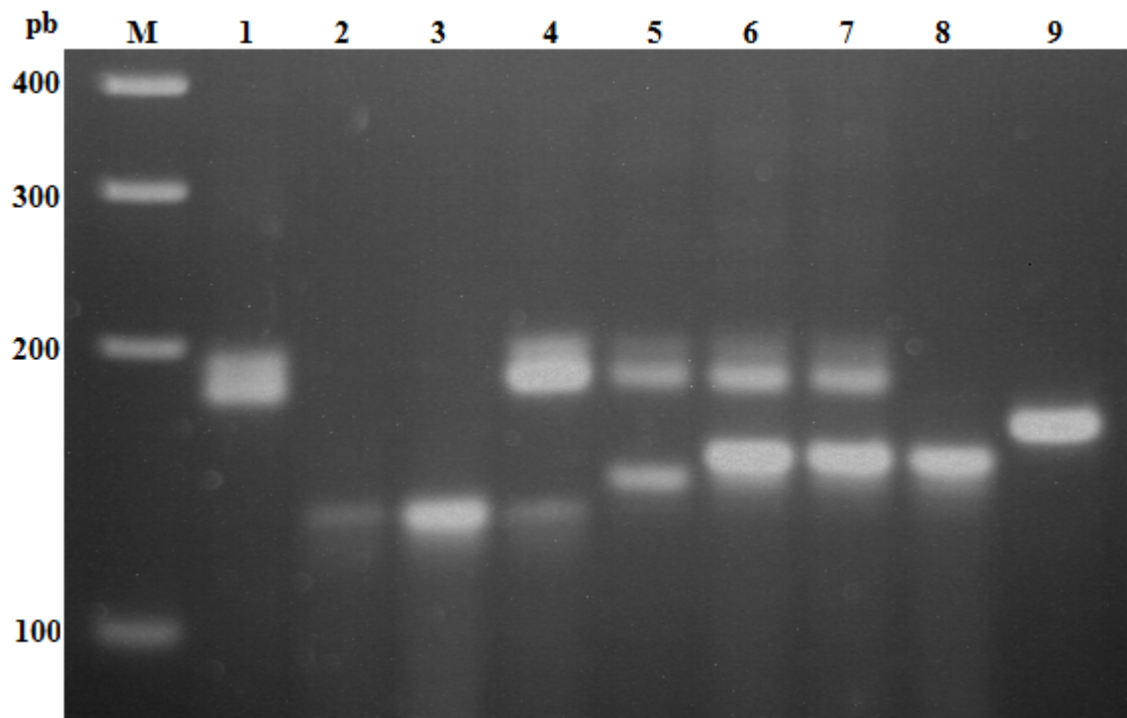


Figura 2.- Ejemplos de algunos fenotipos para el locus microsatelital *Cg49* en nueve individuos de ostión japonés, *Crassostrea gigas*. M = marcador molecular de 100 pares de bases.

Tabla II. Variabilidad genética de dos generaciones de ostión japonés, *C. gigas*, producidos en Sonora. Entre paréntesis error estándar.

	Progenitores	Progenie
Número de organismos analizados	73	80
Número de loci analizados	6	6
Tamaño promedio de la muestra por locus	64.0 (2.4)	78.3 (1.3)
Número promedio de alelos por locus	11.0 (1.24)	11.33 (1.7)
Porcentaje de loci polimórficos	100	100
Heterocigosis promedio (H)		
H Observada	0.65 (0.04)	0.67 (0.05)
H Esperada	0.81 (0.02)	0.84 (0.03)

Tabla III. Número de alelos por locus (N), heterocigosis observada (*Ho*), heterocigosis esperada (*He*) y número de organismos analizados por locus (n) en un lote de reproductores de ostión japonés, *C. gigas*.

Locus	N	He	Ho	n
<i>L10</i>	13	0.85	0.69	54
<i>L48</i>	12	0.83	0.74	69
<i>Cg49</i>	11	0.76	0.51	69
<i>Cg108</i>	7	0.81	0.56	66
<i>ucdCg10</i>	8	0.73	0.69	62
<i>ucdCg14</i>	15	0.89	0.70	63

En la progenie con el análisis de seis loci de microsatélites se observaron un total de 68 alelos y 168 genotipos diferentes. El número de alelos por locus fluctuó entre un valor mínimo de seis (Cg49) y un máximo de 17 (ucdCg14), la heterocigosis esperada y heterocigosis observada por locus mostró valores que fueron de 0.73-0.91 y 0.48-0.81, respectivamente (Tabla IV).

La frecuencia de alelos nulos para cada locus osciló entre 0.0519-0.1445 para progenitores y 0.0123-0.2178 para la progenie (Tabla V). En la Tabla VI y VII se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas para cada uno de los loci. El análisis estadístico mostró que hubo diferencias en la distribución de los genotipos y alelos en cinco de los seis loci en ambas muestras (la excepción fue *L10*). Los valores del coeficiente D fueron negativos para todos los loci en las dos poblaciones, lo que confirma la deficiencia de heterocigotos. El coeficiente de endogamia (F_{is}) en progenitores presentó valores de 0.0549 - 0.3287 y 0.0500 - 0.4012 en progenie, con un promedio de 0.2060 y 0.2128, respectivamente cuyos valores no son estadísticamente diferentes de cero ($P>0.05$). El grado de diferenciación genética obtenido a través de F_{st} se considera pequeño ya que se obtuvieron valores entre 0.0086 y 0.0217, con un promedio de 0.023 siendo este valor significativamente diferente de cero ($P<0.001$) (Tabla IX).

Todos los loci mostraron un déficit de heterocigotos ($P<0.05$), a excepción de *ucdCg10* ($P = 0.2292$) en progenie (Tabla X). Así mismo, todos los genotipos excepto *ucdCg10* se encuentran fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual se puede apreciar con los valores de significancia ($P<0.05$) (Tabla XI y XII). Los valores de identidad y distancia genética entre las dos poblaciones fueron de 0.884 y 0.123, respectivamente. El análisis de varianza

Tabla IV. Número de alelos por locus (N), heterocigosis observada (*Ho*), heterocigosis esperada (*He*) y número de organismos analizados por locus (n) en la generación F1 de ostión japonés, *C. gigas*.

Locus	N	<i>He</i>	<i>Ho</i>	n
<i>L10</i>	15	0.90	0.79	72
<i>L48</i>	12	0.82	0.72	79
<i>Cg49</i>	6	0.73	0.48	80
<i>Cg108</i>	9	0.84	0.66	80
<i>ucdCg10</i>	9	0.86	0.81	80
<i>ucdCg14</i>	17	0.91	0.54	79

Tabla V. Frecuencia de alelos nulos de dos generaciones de ostión japonés, *C. gigas*, producidos en Sonora.

Locus	Progenitores	Progenie
<i>L10</i>	0.0862	0.0736
<i>L48</i>	0.0787	0.0640
<i>Cg49</i>	0.1455	0.1724
<i>Cg108</i>	0.1381	0.1062
<i>ucdCg10</i>	0.0519	0.0123
<i>ucdCg14</i>	0.0931	0.2178

Tabla VI. Frecuencias genotípicas de dos generaciones de ostión japonés, *C. gigas*, producido en Sonora. Entre paréntesis significancia de la prueba de heterogeneidad (prueba G).

Locus	Genotipos	Frecuencias genotípicas		Locus	Genotipos	Frecuencias genotípicas		
		Progenitores	Progenie			Progenitores	Progenie	
<i>L10</i> (0.219)	132/132	0.018	0.013		175/204		0.013	
	132/138	0.018			175/209	0.018	0.013	
	132/175		0.013		175/214		0.027	
	132/192		0.027		184/209	0.018	0.013	
	132/198		0.013		184/214	0.037		
	138/138	0.148	0.055		184/234		0.013	
	138/154	0.055	0.013		192/192	0.018		
	138/162	0.055	0.027		198/198	0.037		
	138/168	0.018			204/234		0.013	
	138/175	0.055	0.097		219/219		0.014	
	138/184	0.018						
	138/192	0.074	0.013		<i>L48</i>	109/109	0.028	0.063
	138/198	0.018			(0.000)	109/116	0.014	
	138/104	0.018	0.027			109/124	0.202	0.075
	138/214		0.013			109/132	0.130	0.189
	147/147	0.055	0.027			109/137	0.057	0.075
	147/154		0.013			109/142	0.014	
	147/162		0.013			109/157	0.014	
	147/175	0.037	0.055			109/163	0.028	
	147/182		0.027			116/116		0.050
	147/192	0.018				116/124		0.012
	147/204	0.018	0.013			116/132	0.014	0.025
	147/214	0.018				116/137		0.012
	154/154	0.037	0.069			116/147		0.025
	154/162		0.027			116/169	0.028	0.025
	154/175		0.027			124/124/	0.057	0.063
	154/184	0.055	0.027			124/132	0.014	0.025
	154/192	0.037	0.055			124/137	0.028	0.012
	154/198	0.018	0.041			124/157	0.014	
	154/204	0.018	0.027			125/163	0.043	
154/209	0.018				124/169	0.043		
154/234		0.013			132/132	0.072	0.075	
162/162		0.027			132/142		0.126	
162/184	0.018	0.013			134/147		0.037	
162/192		0.013			132/157		0.025	
162/214		0.013			132/163	0.057	0.012	
168/192		0.027			132/178		0.012	
175/192		0.013			137/137	0.057		
175/198	0.018	0.013			137/147		0.012	

Continua...

Tabla VI. Continuación.

Locus	Genotipos	Frecuencias genotípicas		Locus	Genotipos	Frecuencias genotípicas	
		Progenitores	Progenie			Progenitores	Progenie
	137/152		0.012		139/145	0.015	
	137/178	0.014			139/152	0.030	0.100
	142/142		0.012		139/156	0.015	0.012
	147/147		0.012		139/165	0.075	0.050
	147/163	0.014			145/145	0.060	0.025
	163/163	0.014			145/156	0.030	0.025
	169/169	0.014			145/165	0.030	0.012
	185/185	0.014			145/171		0.037
					152/152	0.181	0.075
<i>Cg49</i> (0.000)	127/127		0.037		152/156	0.015	
	127/188	0.028	0.050		152/165	0.075	0.075
	133/188	0.014			156/156	0.015	0.050
	144/144	0.042	0.100		156/171		0.037
	144/152	0.014	0.025		165/165	0.015	0.125
	144/177	0.014			171/171		0.012
	144/188	0.071	0.112				
	152/152	0.228	0.150	<i>ucdCg10</i> (0.000)	157/157	0.177	0.075
	152/159	0.028			157/164		0.012
	152/164	0.028			157/169	0.032	0.025
	152/188	0.171	0.225		157/175	0.145	0.012
	152/214	0.014			157/183	0.161	0.075
	159/159	0.114	0.012		157/191		0.050
	159/171	0.014			157/198	0.032	0.012
	159/188	0.057	0.050		157/207	0.129	0.087
	159/201	0.014			157/216	0.048	
	164/201	0.014			164/164		0.050
	171/171	0.014	0.050		164/175		0.012
	177/188	0.014			164/183		0.025
	188/188	0.085	0.187		164/191		0.025
188/201	0.014		164/198			0.012	
			164/207			0.025	
<i>Cg108</i> (0.034)	125/125	0.015			169/207		0.012
	125/152		0.012		169/216		0.012
	134/134	0.106	0.012		175/175	0.016	
	134/139		0.025		175/183	0.016	0.012
	134/145	0.030	0.037		175/191		0.025
	134/152	0.060	0.050	175/198	0.016		
	134/156	0.075	0.050	175/207		0.075	
	134/165	0.015	0.112	175/216		0.012	
	139/139	0.045	0.050	175/225	0.032		

Continua...

Tabla VI. Continuación.

Locus	Genotipos	Frecuencias genotípicas		Locus	Genotipos	Frecuencias genotípicas	
		Progenitores	Progenie			Progenitores	Progenie
	183/183	0.064	0.012		212/243		0.012
	183/191		0.025		212/248	0.015	0.012
	183/198		0.012		212/255	0.015	0.012
	183/207	0.016	0.037		212/274	0.015	
	183/216	0.048	0.037		212/289	0.015	
	191/207		0.075		219/219		0.012
	191/216		0.012		219/231		0.012
	198/207		0.025		219/248		0.012
	198/216	0.016	0.037		219/282		0.012
	207/207	0.048	0.050		225/225	0.079	0.088
	207/219		0.025		225/243		0.012
					225/248	0.031	0.012
					225/255		0.025
<i>ucdCg14</i>	193/193	0.015			225/269		0.012
(0.000)	193/201	0.015			225/274	0.015	
	193/208		0.012		225/282	0.031	
	193/212		0.012		225/289	0.047	0.037
	193/225	0.015			225/296	0.015	
	193/231	0.015			225/307		0.025
	193/248	0.015	0.025		231/231	0.047	0.113
	193/274	0.047			231/243	0.015	
	193/282	0.015			231/274	0.031	
	201/201	0.079	0.037		231/289		0.012
	201/212		0.012		238/238	0.015	
	201/225	0.015	0.025		238/243	0.015	
	201/231	0.015	0.012		238/269		0.012
	201/238	0.031			238/307		0.012
	201/243	0.031			243/243	0.015	0.012
	201/284	0.031			243/274		0.012
	201/255	0.015	0.012		243/307		0.025
	201/262	0.015	0.012		248/248	0.015	0.012
	201/269	0.031	0.012		255/255		0.012
	201/274	0.031			262/262		
	201/289	0.047			274/274	0.031	0.050
	208/208		0.037		289/289		0.012
	208/231		0.025				
	208/255		0.025				
	208/262		0.012				
	212/212		0.050				
	212/225	0.015					
	212/131	0.015	0.063				

Tabla VII. Frecuencias alélicas de dos generaciones de ostión japonés, *C. gigas*, producido en Sonora. Entre paréntesis significancia de la prueba de heterogeneidad (prueba G).

Locus	Alelos (pares de bases)	Frecuencias alélicas	
		Progenitores	Progenie
<i>L10</i> (0.103)	132	0.028	0.042
	138	0.315	0.153
	147	0.102	0.090
	154	0.139	0.194
	162	0.037	0.083
	168	0.065	0.014
	175	0.009	0.139
	184	0.074	0.049
	192	0.083	0.076
	198	0.065	0.035
	204	0.028	0.049
	209	0.028	0.014
	214	0.028	0.028
	219		0.014
234		0.021	
<i>L48</i> (0.000)	109	0.261	0.234
	116	0.029	0.101
	124	0.232	0.127
	132	0.181	0.304
	137	0.109	0.063
	142	0.007	0.076
	147	0.007	0.051
	152		0.006
	157	0.014	0.013
	163	0.087	0.006
	169	0.051	0.013
178	0.007	0.006	
185	0.014		
<i>Cg49</i> (0.000)	127	0.014	0.063
	133	0.007	
	144	0.093	0.169
	152	0.357	0.275
	159	0.171	0.038
	164	0.021	
	171	0.021	0.050
	177	0.014	
188	0.271	0.406	
201	0.021		

Tabla VII. Continuación.

Locus	Alelos (pares de bases)	Frecuencias alélicas	
		Progenitores	Progenie
	214	0.007	
<i>Cg108</i> (0.009)	125	0.015	0.006
	134	0.242	0.150
	139	0.114	0.144
	145	0.114	0.081
	152	0.273	0.194
	156	0.083	0.119
	165	0.159	0.250
	171		0.050
<i>ucdCg10</i> (0.000)	180		0.006
	157	0.452	0.213
	164	0.000	0.106
	169	0.016	0.025
	175	0.121	0.075
	183	0.185	0.125
	191		0.106
	198	0.032	0.050
	207	0.121	0.231
	216	0.056	0.069
	225	0.016	
<i>ucdCg14</i> (0.000)	193	0.079	0.025
	201	0.222	0.082
	208		0.076
	212	0.048	0.114
	219		0.032
	225	0.175	0.165
	231	0.095	0.177
	238	0.040	0.013
	243	0.048	0.044
	248	0.063	0.044
	255	0.016	0.051
	262	0.008	0.025
	269	0.016	0.019
	274	0.103	0.057
	282	0.024	0.006
289	0.056	0.038	
296	0.008		
307		0.032	

Tabla VIII. Coeficiente D , coeficiente de endogamia (F_{is}) y coeficiente de diferencia genética (F_{st}) para dos generaciones de ostión japonés, *C. gigas*, producidos en Sonora.

Locus	Progenitores			Progenie			F_{st}	χ^2
	D	F_{is}	χ^2	D	F_{is}	χ^2		
<i>L10</i>	-0.197	0.1984	25.51	-0.116	0.1166	13.70	0.0134	21.95
<i>L48</i>	-0.107	0.1080	8.85	-0.119	0.1197	12.45	0.0217	35.33***
<i>Cg49</i>	-0.327	0.3287	74.55*	-0.364	0.3658	53.52*	0.0258	28.83***
<i>Cg108</i>	-0.312	0.3135	38.92*	-0.225	0.2261	32.72	0.0086	8.79
<i>UcdCg10</i>	-0.055	0.0549	1.31	-0.050	0.0500	1.6	0.0511	54.42***
<i>UcdCg14</i>	-0.212	0.2137	40.28	-0.400	0.4012	203.45*	0.0164	34.93**
Promedio		0.2029	189.42		0.2132	317.44	0.0227	184.25***

*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Tabla IX. Significancias para el exceso y déficit de heterocigotos en dos generaciones de ostión japonés, *C. gigas*, producidos en Sonora.

Locus	Exceso de Heterocigotos		Déficit de Heterocigotos	
	Progenitores	Progenie	Progenitores	Progenie
<i>L10</i>	1.0000	0.9996	0.0004	0.0000
<i>L48</i>	1.0000	0.9975	0.0000	0.0038
<i>Cg49</i>	1.0000	1.0000	0.0007	0.0000
<i>Cg108</i>	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
<i>UcdCg10</i>	0.8693	0.7423	0.0127	0.2292
<i>UcdCg14</i>	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000

Tabla X. Número de individuos observados y esperados, número de genotipos totales y en desequilibrio para homocigotos y heterocigotos de un lote de reproductores de ostión japonés, *C. gigas*. P = significancia para el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Locus	Genotipos	Núm. de individuos		P	Núm. de genotipos	
		Observados	Esperados		Totales	En desequilibrio
<i>L10</i>	Homocigotos	17	8	0.0005	13	4
	Heterocigotos	37	46		78	4
<i>L48</i>	Homocigotos	18	12	0.0365	12	4
	Heterocigotos	51	57		66	5
<i>Cg49</i>	Homocigotos	34	16	0.0000	11	4
	Heterocigotos	36	54		55	5
<i>Cg108</i>	Homocigotos	29	12	0.0000	7	5
	Heterocigotos	37	54		21	5
<i>ucdCg10</i>	Homocigotos	19	17	0.24	8	1
	Heterocigotos	43	45		28	1
<i>ucdCg14</i>	Homocigotos	19	7	0.0001	15	3
	Heterocigotos	44	56		115	6

Tabla XI. Número de individuos observados y esperados, número de genotipos totales y en desequilibrio para homocigotos y heterocigotos de una muestra de la generación F1 de ostión japonés, *C. gigas*. *P* = significancia para el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Locus	Genotipos	Núm. de individuos		<i>P</i>	Núm. de genotipos	
		Observados	Esperados		Totales	En desequilibrio
<i>L10</i>	Homocigotos	17	8	0.0049	15	5
	Heterocigotos	37	46		105	8
<i>L48</i>	Homocigotos	18	12	0.0138	12	2
	Heterocigotos	51	57		66	10
<i>Cg49</i>	Homocigotos	34	16	0.0000	6	5
	Heterocigotos	36	54		15	4
<i>Cg108</i>	Homocigotos	29	12	0.0001	9	4
	Heterocigotos	37	54		36	8
<i>ucdCg10</i>	Homocigotos	19	17	0.17	9	2
	Heterocigotos	43	45		36	4
<i>ucdCg14</i>	Homocigotos	19	7	0.0000	17	9
	Heterocigotos	44	56		136	8

molecular señaló que existe muy poca variabilidad entre las poblaciones (5%), la mayor variabilidad se presentó dentro de los individuos (75%). Además, la diferenciación genética representada por R_{st} también se considera pequeña ya que el valor obtenido fue de 0.049 (Tabla XIII).

Los valores de significancia para la reducción poblacional obtenidos mediante el programa *Bottleneck* indican que la población de progenitores se encuentra en equilibrio ($P = 0.0781$), mas no la progenie ($P = 0.0156$).

Tabla XII. Análisis de varianza molecular (AMOVA) y R_{st} entre dos generaciones de ostión japonés, *C. gigas*, producidos en Sonora.

Fuente de variación	Grados de libertad	% Variación	R_{st}	P
Entre poblaciones	1	5		
Entre individuos	151	20	0.049	0.001
Dentro de los individuos	153	75		

VI.- DISCUSIONES.

Para tener una estimación del cambio de la variabilidad genética en el ostión japonés (*C. gigas*) debido al manejo, se midió el valor estimado de la variación genética en dos generaciones de un linaje mediante 6 locus microsatelitales. Esta variabilidad se puede medir como diversidad alélica y heterocigosis. El índice de variabilidad genética en cuanto al número de alelos por locus y la heterocigosis, evidentemente es más elevada en estudios con microsátélites que con alozimas, tal como se observa en estudios realizados por Ozaki y Fujio (1985), Yang *et al.* (2000) y Enríquez-Espinoza (2008). El análisis de alozimas es una técnica de baja resolución que solo funciona para genes que se expresan, y las mutaciones silenciosas que pudieran ocurrir en esos genes no generan una variabilidad observable. Esta puede ser la razón de la diferencia en la resolución de ambas técnicas.

El número promedio de alelos por locus fue muy similar para ambas poblaciones estudiadas y no muy alejadas del valor reportado por Sekino *et al.* (2003), para la misma especie, quienes reportaron un promedio de 10.6 alelos por locus. Sin embargo, están por debajo de otros valores para *C. gigas* como los reportados por Li *et al.* (2006) y Sauvage *et al.* (2009), donde observaron una mayor diversidad alélica con un promedio de 23.2 y 28.9 alelos por locus respectivamente y ligeramente mayores a los reportados por Li *et al.* (2003), quienes encontraron 5.7 alelos por locus en muestras provenientes de poblaciones naturalizadas de *C. gigas*.

El bajo número de alelos encontrados se puede explicar si se considera que los linajes son generalmente derivados a partir de pocos individuos, lo que genera un efecto sobre la población, y disminuyen los valores de variabilidad. Este efecto es conocido como efecto fundador, el cual genera de manera inmediata la reducción de la diversidad genética

(Frankham, 1996). De igual manera, estudios realizados en otras especies representantes del mismo género también presentaron una mayor diversidad alélica con un promedio de 37 alelos en *C. virginica* (Carlsson y Reece, 2007), 16.7 en *C. ariakensis* (Xiao *et al.*, 2008) y 25 en *C. plicatula* (Yu *et al.*, 2008). Otros estudios realizados en otras especies de moluscos marinos reportaron menor número de alelos por locus que van de 6.8 en mejillones (Geist *et al.*, 2003) y 3.9 en caracoles (Liu y Hershler, 2009).

Con respecto a la heterocigosis, en este estudio se encontraron valores promedio de heterocigosis observada de 0.65 en el lote de progenitores y 0.67 en progenie, similares a los reportados por Sekino *et al.* (2003) en organismos silvestres de la misma especie y por Huvet *et al.* (2000) en organismos cultivados, quienes reportaron valores de 0.60 y 0.70 respectivamente, así como otros estudios en organismos silvestres pertenecientes al mismo género donde se reporta una heterocigosis observada promedio de 0.63 en *C. virginica* (Carlsson y Reece, 2007) y 0.58 en *C. corteziensis* (Cruz *et al.*, 2007).

Se detectó un déficit de heterocigotos en cinco de los seis loci analizados. La deficiencia de heterocigotos parece ser muy común en poblaciones de *C. gigas* (Ozaki y Fujio, 1985). El déficit de heterocigotos también ha sido documentado en poblaciones naturales del ostión del Pacífico (Sekino *et al.*, 2003) y en otros bivalvos (Geist *et al.*, 2003; Carlsson y Reece, 2007), aún cuando son analizados con alozimas (Gaffney, 1990). Este déficit podría deberse a diversos factores, como la presencia de alelos nulos que llevan a la observación de un mayor número de homocigotos o por un efecto Wahlund (deficiencia de heterocigotos debido a una muestra que está integrada por organismos de diferentes poblaciones). No se puede descartar también el efecto de prácticas reproductivas endogámicas favorecidas por los criaderos al utilizar un bajo número de reproductores que posiblemente están relacionados por

consanguinidad. En el caso de estas dos generaciones analizadas, no se encontró evidencia de una endogamia acumulada.

En este estudio el promedio de la frecuencia de alelos nulos fue de 0.098 en los progenitores y de 0.107 en progenie, estos valores son significativamente más bajos que el 0.200 reportado por Yu *et al.* (2008) para *C. gigas*. Estos alelos nulos se presentan cuando no pueden ser amplificados por PCR, debido principalmente a una mutación en el punto de hibridación del iniciador.

Al comparar las dos muestras se puede observar que la progenie presenta un mayor número de alelos en cuatro de los seis loci analizados (*L10*, *Cg108*, *ucdCg10* y *ucdCg14*), y un mayor número de genotipos. Estas diferencias se pueden deber a que el grupo analizado del pie de cría sólo son representantes aleatorios de la generación parental, es decir, no son necesariamente los padres directos de la generación F1 analizada. En otras palabras, el que la progenie tenga más alelos indica que éstos se encuentran en el lote de reproductores.

La diferencia de estructura genética poblacional en las dos muestras de ostión evidenciada por los valores de R_{st} y de F_{st} , así como por la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas, es un indicativo del proceso aleatorio del muestreo del lote de reproductores. Sin embargo, es importante mencionar que la variabilidad genética se mantiene en la progenie con respecto al lote de reproductores debido a que las heterocigosis y el número de alelos por locus no son significativamente diferentes. En especies de interés acuícola es común la pérdida de variabilidad genética después de algunas generaciones en cautiverio (Sbordoni *et al.*, 1986, 1987; Agnese *et al.*, 1995) y no siempre los laboratorios de producción de crías son garantía para el mantenimiento de la variabilidad (Soto-Hernández *et al.* en prensa). Por tal motivo, el seguimiento de la variabilidad genética en cada generación de los

linajes seleccionados debe de formar parte del control de calidad de los laboratorios de producción.

VII.- CONCLUSIONES.

Con la utilización de seis microsatélites se determinó la variabilidad genética en una muestra del lote de reproductores y la generación F1 del ostión japonés *C. gigas* mantenidos y producidos en el Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora. Se encontró que ambas muestras mostraron una variabilidad genética similar, en términos de heterocigosis observada, con otras poblaciones de *C. gigas* en el mundo.

No se encontró evidencia de una endogamia crítica acumulada, aunque hay indicio de un incipiente cuello de botella que debe de ser vigilado en generaciones sucesivas. Esto implica que la generación F1 se puede utilizar con toda confianza para generar una F2 siempre y cuando se involucren el mayor número posible de reproductores.

Cuando se maneja un gran número de reproductores en los eventos de inducción al desove, siempre existirá la incertidumbre de la identificación de los individuos que participaron efectivamente en la fecundación, suponiendo que no se sacrifiquen a los organismos. Si el lote de reproductores es grande, los reproductores efectivos representan sólo una fracción del acervo genético disponible potencialmente. Es por eso que la estructura genética poblacional, sobre todo la que se refiere a las frecuencias alélicas y genotípicas, puede variar de generación en generación. Tomando esto en cuenta, los laboratorios de producción pueden confiar plenamente en los microsatélites como una herramienta efectiva para vigilar los niveles de variabilidad en sus linajes de cultivo.

Con los datos obtenidos se rechaza la hipótesis de trabajo donde se plantea que el nivel de variabilidad genética disminuirá de una generación a la siguiente en un linaje de cultivo de ostión japonés *C. gigas*.

VIII. RECOMENDACIONES.

Para mantener la variabilidad genética de los lotes, se recomienda la introducción de nuevo material genético (reproductores) cada dos o tres generaciones, los cuales pueden ser intercambiados con otros laboratorios. Sin embargo, como una medida de precaución siempre habrá que verificar o solicitar que la heterocigosis y el número de alelos por locus del linaje o población “donante” sea similar a la de la población “receptora”.

Es recomendable realizar el intercambio de reproductores siempre basado en análisis genéticos, ya que si bien lo que se busca es evitar la depresión endogámica, se puede provocar una depresión exogámica cuando la estructura genética poblacional es muy diferente.

De esta forma, la correcta selección de los reproductores y el monitoreo genético de éstos pueden ofrecer bases importantes para formular estrategias de manejo reproductivo.

IX.- LITERATURA CITADA.

- Agnese, J.F., J.O. Ziriga y S. Gilles. 1995. Effects of domestication on genetic variability, fertility, survival and growth rate in a tropical Siluriform *Heterobranchus longifilis*, Valenciennes 1840. *Aquaculture*, 131: 197-204.
- Álvarez-Jurado, .A. 1987. Genética y acuicultura. pp: 1-31. En: Espinosa de los Monteros, J. y U. Labarta (Eds.). *Genética en Acuicultura*. Industrias Gráficas Españolas. S. L. Madrid.
- Aranguren-Méndez, J.A. y J. Jordana. 2001. Utilización de marcadores de ADN (Microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Aranguren-Méndez, J.A., M. Gómez y J. Jordana. 2002. Potencial de los Microsatélites para la asignación de individuos dentro de raza en poblaciones a ser conservadas. V Congreso de la Sociedad Española para los Recursos Genéticos Animales y III Congreso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animales. (SERGA & SPREGA). *El Arca*, 5: 37.
- Aranguren-Méndez, J.A., R. Román-Bravo, W. Isea, Y. Villasmil y J. Jordana. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 13(1): 1-6.
- Benzie, J.A.H. y S.T. Williams. 1996. Limitations in the genetic variation of hatchery produced batches of the giant clam, *Tridacna gigas*. *Aquaculture*, 139: 225-241.
- Buroker, N.E., W.K. Hershberger y K.K., Chew. 1979. Population genetics of the family Ostreidae, I: intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Marine Biology*, 54: 157-169.

- Carlsson, J. y K.S. Reece. 2007. Eight PCR primers to amplify EST-linked microsatellites in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* genome. *Molecular Ecology Notes*, 7: 257–259.
- Cenic, J.L. 2000. Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas. *Revista Terralia*, 12: 40-43.
- Chambers, G. y E. MacAvoy. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Parte B*, 126: 455-476.
- Cheng, H.H. y L.B. Crittenden. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Science*, 73: 539-546.
- Cifuentes-Lemus, J.L., P. Torres-García y M. Frías. 1990. El océano y sus recursos X. Pesquerías. Fondo de Cultura Económica, S. A. de C. V. México D.F.
- CONAPESCA. 2007. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2004. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA/SAGARPA).
- Cornuet, J.M. y G. Luikart. 1996. Description and evaluation of two tests for detecting recent bottlenecks. *Genetics*, 144: 2001-2014.
- Cruz, P., B. Yañez-Jacome, A.M. Ibarra y J. Rangel-Becerril. 2007. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific pleasure oyster, *Crassostrea corteziensis*, and their cross-species amplification in four other oyster species. *Molecular Ecology Notes*, 7: 448–450.
- De la Rosa-Vélez, J., M.T. Gutiérrez-Wing y R. Radilla-Camacho. 1991. El ostricultivo de Bahía de San Quintín, B.C. México; Aspectos genéticos. *Ciencias Marinas*, 17: 133-147.

- English, L.J., G.B. Maguire y R.B. Ward. 2000. Genetic variation of wild and hatchery populations of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia. *Aquaculture*, 187: 283–298.
- Enríquez-Esponiza, T.L. 2008. Determinación de la variabilidad genética y del índice de endogamia en el ostión Japonés, *Crassostrea gigas*, y en el ostión de placer, *Crassostrea corteziensis*, cultivados en Sonora. Tesis de Maestría. Universidad de Sonora. México.
- Excoffier, L., P.E. Smouse y J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.
- FAO 2006a. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics. FAO, Roma. 57 p.
- FAO 2006b. Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Documento Técnico de Pesca 471. FAO, Roma. 182 pp.
- Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics*, 29: 305-327.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, 10: 1500-1508.
- Fundación Alfonso Martín Escudero. 2002. Impulso, Desarrollo y Potenciación de la Ostricultura en España. Editorial Mundi-Prensa. Madrid. 294 pp.
- Gaffney, P.M. 1990. Enzyme heterozygosity, growth rate and viability in *Mytilus edulis*: another look. *Evolution*, 44: 204–210.

- Geist, J., O. Rottmann, W. Schröder y R. Kühn. 2003. Development of microsatellite markers for the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia: Unionoidea) *Molecular Ecology Notes*, 3: 444–446.
- Goldstein, D.B. y C. Schlotterer. 1999. *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press. New York. 352 p.
- Huvet, A., P. Boudry, M. Ohresser, C. Delsert y F. Bonhomme. 2000. Variable microsatellites in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Animal Genetics*, 31: 71-72.
- Kalinowski, S.T. 2006. HW-QUICKCHECK: an easy-to-use computer program for checking genotypes for agreement with Hardy-Weinberg expectation. *Molecular Ecology Notes*, 6: 974-979.
- Launey, S. y D. Hedgecock. 2001. High genetic load in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 159: 255–265.
- Li, C.C. y D.G. Horvitz. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics*, 5: 107–117.
- Li, G., S. Hubert, K. Bucklin, V. Ribes y D. Hedgecock. 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes*, 3: 228–232.
- Li, Q., H. Yu y R. Yu. 2006. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture*, 259: 95–102.

- Liu, H.P. y R. Hershler. 2009. Genetic diversity and population structure of the threatened Bliss Rapids snail (*Taylorconcha serpenticola*). *Freshwater Biology*, 54: 1285-1299.
- Mazón, S.J.M. 1996. Cultivo del ostión japonés *Crassostrea gigas*. pp: 625-650. En: Casas, V. y D.G. Ponce (Eds.). *Estudio del Potencial Pesquero y Acuícola de Baja California Sur*. La Paz, México.
- McGoldrick, D.J. y D. Hedgecock. 1997. Fixation, segregation and linkage of allozyme loci in inbred families of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg): implication for the causes of inbreeding depression. *Genetics*, 146: 321-334.
- Milligan, B.G., J. Leebens-Mack y A.E. Strand. 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology*, 3: 423-435.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn y H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, 51: 263-273.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Ozaki, H. y Y. Fujio. 1985. Genetic differentiation in geographical populations of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) around Japan. *Tohoku Journal of Agriculture Research*, 36: 49-61.
- Peakall, R. y P.E. Smouse. 2006. GenAlEx6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pérez, J.E. 1996. La acuicultura y la conservación de la biodiversidad. *Interciencia*, 21(3): 154-157.

- Piry, S., G. Luikart y J.M. Cornuet. 1999. Bottleneck: a computer for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90: 502-503.
- Raymond, M. y F. Rousset. 1995. GENEPOP (version 4): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248–249.
- Rivera-García, M. y J.M. Grijalva-Chon. 2006. Variabilidad y diferenciación genética en camarón blanco *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* de bajo y alto crecimiento. *Ciencias Marinas*, 32(1A): 1-11.
- Rochambeau, H., F. Fournet-Hanocq y J. Vu Tien Khang. 2000. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Annales of Zootechnie*, 49: 77-93.
- Rosseto, M., A. McLauchlan, F. Harris, R. Henry, P. Baverstock, L. Lee, T. Maguire y K. Edwards. 1999. Abundance and polymorphism of microsatellite markers in the tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Myrtaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 1091-1098.
- Sauvage, C., P. Boudry y S. Lapégue. 2009. Identification and characterization of 18 novel polymorphic microsatellite makers derived from expressed sequence tags in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Resources*, 9: 853-855.
- Sbordoni, V., E. de Matthaeis, M. Cobolli-Sbordoni, G. de la Rosa y M. Mattoccia. 1986. Bottleneck effects and the depression of genetic variability in hatchery stocks of *Penaeus japonicus* (Crustace, Decapoda). *Aquaculture*, 57: 239–251.
- Sbordoni, V., G. de la Rosa, M. Mattoccia, M. Cobolli-Sbordoni y E. de Mateáis. 1987. Genetic changes in seven generations of hatchery stock of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* (Crustacea, decapoda). *Proceedings of the word symposium on selection, hybridization, and genetic engineering in acuaculture, Bordeaux 23-30 Mayo, 1986, Vol. I. Berlin, Germany.*

- Sekino, M., M. Hamaguchi, F. Aranishi y K. Okoshi. 2003. Development of novel microsatellite DNA markers from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*, 5: 227-233.
- Soto-Hernández, J., A. Velasco-Murillo y J.M. Grijalva-Chon. En prensa. When low genetic variability in feral and hatchery-reared tilapia becomes a vicious circle: *Oreochromis niloticus* from Oaxaca, Mexico. *Aquaculture International*. DOI 10.1007/s10499-008-9217-3.
- Swofford, D. y R. Selander. 1981. BIOSYS-1: A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetic and systematics. *Journal of Heredity*, 72: 281-283.
- Takezaki, N. y M. Nei. 1996. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, 144: 389-399.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.
- Uriarte, I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. pp: 61-75. En: Lovatelli, A., A. Farías e I. Uriarte (Eds.). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO.
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 395-420.

- Workman, P.L. y J.D. Niswander. 1970. Population studies on southwestern Indian Tribes. II
Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics*, 22:
24–29.
- Xiao, J., J.F. Cordes, K.C. Jones y K.S. Reece. 2008. Eleven novel microsatellite markers for
the Asian oyster *Crassostrea ariakensis*. *Molecular Ecology Resources*, 8: 843-845.
- Yang, R., Z. Yu, Z. Chen, X. Kong y J. Dai. 2000. Allozyme variation within *Crassostrea*
plicatula and *Crassostrea gigas* from Shandong coastal waters. *Fisheries China*, 24: 130-
133.
- Yu, H., Q. Li y R. Yu. 2008. Genetic differentiation between the oyster *Crassostrea plicatula*
and Pacific oyster *Crassostrea gigas* populations in China assessed by microsatellite
analysis. *Fisheries Science*, 74: 88–97.
- Yu, Z. y X. Guo. 2005. Genetic analysis of selected strains of eastern oyster (*Crassostrea*
virginica Gmelin) using AFLP and microsatellite markers. *Marine Biotechnology*, 6:
575-586.
- Zane, L., L. Bargelloni y T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review.
Molecular Ecology, 11: 1-16.