



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE GENÉTICA

Evaluación de la diversidad genética y estructura poblacional del berberecho *Cerastoderma edule* mediante marcadores microsatélite y de ADN mitocondrial

Memoria que para optar al Título de Doctora presenta

María Luisa Martínez Martínez

2014

Dirección: Ana Insua Pombo, Ruth Freire Álvarez y Josefina Méndez Felpeto



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

ANA INSUA POMBO, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Biología Celular y Molecular, RUTH FREIRE ÁLVAREZ, Doctora en Biología por la Universidade da Coruña y JOSEFINA MÉNDEZ FELPETO, Catedrática de Universidad del Departamento de Biología Celular y Molecular,

INFORMAN:

Que el trabajo titulado: “Evaluación de la diversidad genética y estructura poblacional del berberecho *Cerastoderma edule* mediante marcadores microsatélite y de ADN mitocondrial”, presentado por Dña. María Luisa Martínez Martínez para optar al Título de Doctora en Biología, ha sido realizado bajo nuestra dirección y, considerándolo finalizado, autorizamos su presentación y defensa.

A Coruña, de mayo de 2014

Fdo. Ana Insua Pombo

Fdo. Ruth Freire Álvarez

Fdo. Josefina Mendez Felpeto

Financiación de la investigación

Esta tesis se desarrolló en el marco del proyecto de investigación “Evaluación de la variabilidad genética y estructura de población en *Cerastoderma* sp. de Galicia”, dirigido por la Dra. Josefina Méndez Felpeto y financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)-Ministerio de Educación y Ciencia (referencia RZ2006-00005-00-00).

La autora de la tesis ha disfrutado de las siguientes ayudas:

Beca de Posgrado para la Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Ciencia e Innovación (2008-2012).

Beca de la Xunta de Galicia para la realización de estudios de tercer ciclo en el Programa de Doctorado con mención de calidad “Genética, Bioquímica y Biotecnología” (2006-2008).

Publicaciones

Parte del trabajo realizado en esta tesis se refleja en las siguientes publicaciones:

Martínez L, Arias A, Méndez J, Insua A, Freire R (2009) Development of twelve polymorphic microsatellite markers in the edible cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia: Cardiidae). *Conservation Genetics Resources* **1**, 107-109.

Martínez L, Méndez J, Insua A, Arias-Pérez A, Freire R (2013) Genetic diversity and population differentiation in the cockle *Cerastoderma edule* estimated by microsatellite markers. *Helgoland Marine Research* **67**, 179-189.

A mis abuelas,
la genética de la conservación bien entendida

Agradecimientos

Me gustaría dar las gracias en primer lugar a las tres directoras de esta tesis, las Dras. Ana Insua, Ruth Freire y Josefina Méndez, por haberme permitido realizar este trabajo y haberme apoyado y ayudado durante su realización.

A la Dra. Manuela Krakau por haberme permitido tan generosamente utilizar sus muestras en la realización de esta tesis y a los Drs. H. Hummel y Dr. O. van Hoesel por proporcionarme las muestras de Oosterschelde.

También quiero agradecer al personal del Alfred Wegener Institute for Polar and Marine Research por acogerme durante mi estancia, especialmente a los Drs. Ragnhild Asmus y Mathias Wegner.

A mis compañeros de laboratorio: los que me enseñaron cuando empezaba, los que han compartido conmigo el tiempo de elaboración de esta tesis y los que han tenido que aguantarme en la etapa de agobio final. Gracias por todo, sois geniales. Y a mi compañera de docencia, por hacer más llevaderas las clases y las correcciones y por estar siempre dispuesta a echarme una mano.

A mi familia y a mis amigos, por estar siempre ahí, en las buenas y en las malas. Algo debo estar haciendo bien para merecerme a la gente que tengo.

Muchas gracias

Resumen

La conservación, gestión y comprensión de la biología evolutiva de una especie requiere conocer la variación genética existente y cómo se distribuye en las poblaciones. En esta tesis se analizó la variación genética del berberecho *Cerastoderma edule*, un componente importante del ecosistema costero y un recurso explotado en el litoral europeo, para progresar en la caracterización genética de las poblaciones naturales, tratando de reconocer factores históricos y contemporáneos que pudiesen influir en la distribución de su variación genética. Mediante la construcción de una genoteca enriquecida en secuencias microsatélite se desarrolló el primer panel de marcadores microsatélite en esta especie, optimizándose dos PCRs *multiplex* para facilitar su análisis. Ello ha permitido aportar las primeras estimas de diversidad genética para la región noroeste de la Península Ibérica, sometida a una intensa explotación, evaluar la estructura de población y proponer las causas de la diferenciación poblacional detectada. Por otra parte, se evaluó la diversidad genética y estructura poblacional a lo largo del ámbito de distribución de la especie y se examinó su historia evolutiva, contrastando los datos genéticos proporcionados por marcadores microsatélite y el gen mitocondrial citocromo b, lo cual ha llevado a identificar tres grupos de poblaciones con signos de patrones evolutivos diferentes.

Resumo

A conservación, xestión e comprensión da bioloxía evolutiva dunha especie require coñecer a variación xenética existente e cómo se distribúe nas poboacións. Nesta tese analizouse a variación xenética do berberecho *Cerastoderma edule*, un compoñente importante do ecosistema costeiro e un recurso explotado no litoral europeo, para progresar na caracterización xenética das poboacións naturais, tratando de recoñecer factores históricos e contemporáneos que puidesen influír na distribución da súa variación xenética. Mediante a construción dunha xenoteca enriquecida en secuencias microsatélite desenvolveuse o primeiro panel de marcadores microsatélite nesta especie, optimizándose dúas PCRs *multiplex* para facilitar a súa análise. Isto permitiu aportar as

primeiras estimas de diversidade xenética para a rexión noroeste da Península Ibérica, sometida a unha intensa explotación, avaliar a estrutura de poboación e propoñer as causas da diferenciación poboacional detectada. Por outra parte, avalíase a diversidade xenética e estrutura poboacional ó longo do ámbito de distribución da especie e examinouse a súa historia evolutiva, contrastando os datos xenéticos proporcionados por marcadores microsátelite e o xene mitocondrial citocromo b, o que levou a identificar tres grupos de poboacións con signos de patróns evolutivos diferentes.

Abstract

The conservation, management and understanding of the evolutionary biology of a species require knowing genetic variation and how it is distributed in populations. This work analyzes the genetic variation in the cockle *Cerastoderma edule*, an important member of the coastal ecosystem and an exploited resource in the European littoral, in order to improve the genetic characterization of natural populations, trying to recognize historical and contemporary factors that might have influenced the distribution of its genetic variation. A microsatellite enriched library was constructed to develop the first set of microsatellite markers and two *multiplex* PCRs were optimized for ease of analysis. This allowed us to provide the first estimates of genetic diversity in the northwestern Iberian Peninsula, an area under intense exploitation, to evaluate the population structure and to propose the causes of the genetic differentiation detected. Moreover, genetic diversity and population structure throughout the distribution range of the species were assessed and the evolutionary history examined, contrasting genetic data provided by microsatellite markers and the cytochrome b gene. This led to the identification of three groups of populations with signs of different evolutionary patterns.

ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos	XV
Capítulo 1. Introducción general y objetivos	1
1.1. Introducción general	3
1.1.1. Variación genética en las poblaciones naturales	3
1.1.2. Marcadores moleculares	5
1.1.3. Biología e importancia de <i>Cerastoderma edule</i>	12
1.1.4. Estudios genéticos en <i>C. edule</i>	17
1.2. Objetivos	19
Capítulo 2. Desarrollo de marcadores microsatélite y PCRs <i>multiplex</i>	21
2.1. Introducción	23
2.2. Material y métodos	25
2.2.1. Material de estudio y extracción de ADN	25
2.2.2. Detección de secuencias microsatélite mediante <i>dot-blot</i>	27
2.2.3. Construcción de una genoteca enriquecida en secuencias microsatélite ...	28
2.2.4. Rastreo de la genoteca mediante transferencia e hibridación	31
2.2.5. Secuenciación de clones e identificación de secuencias microsatélite	31
2.2.6. Amplificación de <i>loci</i> microsatélite mediante PCR	32
2.2.7. Análisis de datos	33
2.2.8. Diseño y optimización de PCRs <i>multiplex</i>	33
2.3. Resultados	34
2.4. Discusión	39
Capítulo 3. Diversidad genética y estructura poblacional en la región noroeste de la Península Ibérica	45
3.1. Introducción	47
3.2. Material y métodos	51
3.2.1. Material de estudio y extracción de ADN	51
3.2.2. Análisis de marcadores microsatélite	51

3.3. Resultados	54
3.3.1. Diversidad genética	54
3.3.2. Estructura poblacional	56
3.4. Discusión	59
Capítulo 4. Diversidad genética, estructura poblacional e historia evolutiva a escala macrogeográfica: microsatélites vs. gen citocromo b	67
4.1. Introducción	69
4.2. Material y métodos	71
4.2.1. Material de estudio y extracción de ADN	71
4.2.2. Análisis de marcadores microsatélite	72
4.2.3. Análisis del gen mitocondrial citocromo b	74
4.3. Resultados	75
4.3.1. Marcadores microsatélite	75
4.3.1.1. Diversidad genética	75
4.3.1.2. Estructura poblacional	76
4.3.1.3. Inferencia demográfica	81
4.3.2. Gen mitocondrial citocromo b	84
4.3.2.1. Diversidad genética	84
4.3.2.2. Estructura poblacional	84
4.3.2.3. Inferencia demográfica	87
4.4. Discusión	91
Conclusiones	99
Bibliografía	103
Anexos	129
Publicaciones	145

Abreviaturas y símbolos

~: aproximadamente

π : diversidad nucleotídica

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNmt: ADN mitocondrial

AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*): polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados

AMOVA: análisis molecular de la varianza

ARN: ácido ribonucleico

BSA: seroalbúmina bovina

COI: subunidad I de la citocromo c oxidasa

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

DUI (*Doubly Uniparental Inheritance*): herencia doblemente uniparental

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EST (*Expressed Sequence Tags*): etiquetas de secuencias expresadas

FAO (*Food and Agriculture Organization*): Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

Fis: coeficiente de endogamia

Fst: índice de fijación

GB: Gran Bretaña

Hd: diversidad haplotípica

He: heterocigosidad esperada

Ho: heterocigosidad observada

hp: número de haplotipos privados

H-W: Hardy-Weinberg

LGM (*Last Glacial Maximum*): Último Máximo Glacial

LSS: N-lauril sarcosine sal sódica

Ma: millones de años

Mb: megabase

Na: número de alelos

NGS (*Next Generation Sequencing*): secuenciación de nueva generación

Nm: número de migrantes por generación

nMDS: escalamiento multidimensional no métrico

Odh: octopina deshidrogenasa

pb: pares de bases

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): reacción en cadena de la polimerasa

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*): amplificación aleatoria de ADN polimórfico

RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*): polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción

Rs: riqueza alélica

SDS: dodecilsulfato sódico

SNP (*Single Nucleotid Polymorphism*): polimorfismos de un solo nucleótido

SSC: citrato sódico salino

TAE: Tris-acetato-EDTA

TBE: Tris-borato-EDTA

TE: Tris-EDTA

TPM (*Two Phase Model*): modelo de mutación en dos fases

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

UK (*United Kingdom*): Reino Unido

UV: ultravioleta

Capítulo 1. Introducción general y objetivos

1.1. Introducción general

1.1.1. *Variación genética en las poblaciones naturales*

La diversidad biológica engloba genes, especies y ecosistemas y está disminuyendo rápidamente en los tres niveles como consecuencia, directa o indirecta, de la actividad humana. La fragmentación y destrucción del hábitat, sobreexplotación, contaminación e introducción de especies exóticas constituyen las principales amenazas. El efecto más extremo de la pérdida de diversidad biológica es la extinción de las especies, ya que una vez que una especie desaparece, la información genética y la combinación de caracteres contenidos en su ADN es poco probable que vuelvan a repetirse en el futuro. Incluso en el caso de que las especies persistan, el aumento del aislamiento entre sus poblaciones y la reducción en el número de individuos que las componen, conllevan una disminución de su variación genética (Primack, 1993).

La variación genética permite la adaptación a los cambios ambientales y evita la disminución de la eficacia biológica por depresión consanguínea (Frankham *et al.*, 2002; Allendorf *et al.*, 2013), asegurando el éxito evolutivo de las especies a largo plazo (King *et al.*, 2007; Saura y Faria, 2011). Los niveles de variación genética son el resultado de los efectos combinados de la mutación y la migración, que actúan aumentando la variación, la selección equilibradora, que la mantiene, y la deriva genética y la selección direccional que la eliminan. El equilibrio entre todos estos factores depende en gran medida del tamaño poblacional. Así, la selección juega un papel fundamental en las poblaciones grandes, mientras que en el caso de poblaciones pequeñas crece el efecto de la deriva (Frankham *et al.*, 2002). En los casos en que existe una marcada estructura genética poblacional, ésta responde a la existencia de grupos de poblaciones que han evolucionado de manera independiente durante un período de tiempo amplio, y las diferencias entre estas poblaciones constituyen un componente importante de la variación genética de la especie.

En el medio marino, la ausencia de barreras geográficas, los altos tamaños poblacionales de las especies y el hecho de que generalmente presenten una fase

larvaria planctónica con un alto potencial dispersivo, hacen que por lo general se presuponga una baja diferenciación genética (Palumbi, 1996; Ward, 2000). Sin embargo, cada vez son más numerosos los casos en que se detecta la existencia de diferenciación genética significativa a mayor o menor escala (Saavedra, 2007). Factores físicos como las corrientes marinas pueden influir en el grado de diferenciación entre poblaciones, impidiendo la dispersión y favoreciendo su aislamiento, o bien aumentando la conectividad al favorecer el flujo génico entre ellas (Allendorf *et al.*, 2013). También la temperatura y la salinidad pueden afectar a la diferenciación poblacional al influir en el desarrollo y dispersión larvarios (O'Connor *et al.*, 2007; Narváez *et al.*, 2012).

Factores históricos pueden haber contribuido igualmente a la diferenciación genética entre poblaciones. Un ejemplo de ello son los cambios climáticos ocurridos en el Período Cuaternario, considerados uno de los principales responsables de la presente distribución de la flora y la fauna en Europa. Las glaciaciones de Pleistoceno, especialmente el Último Máximo Glacial (LGM: *Last Glacial Maximum*) hace 18000-23000 años, jugaron un papel fundamental en los patrones actuales de distribución tanto de los animales terrestres como de los animales marinos de aguas poco profundas (Hewitt, 1999, 2000; Maggs *et al.*, 2008). Los largos periodos glaciales provocaron una contracción y un desplazamiento de los rangos de distribución de las especies hacia regiones con climas más templados lo que, en el hemisferio norte, implicó un movimiento hacia regiones situadas más al sur que actuaron como zonas de refugio y permitieron la supervivencia de las especies. En los periodos interglaciales, con la retirada de los hielos, estas poblaciones recolonizaron las áreas situadas más al norte, previamente cubiertas de hielo (Hewitt, 1999, 2000). A este cambio en el patrón de distribución geográfica hay que añadir la posibilidad de que pequeños focos de diversidad subsistiesen en refugios situados en áreas del norte, lo que resultaría en un patrón genético característico, con grandes niveles de diferenciación genética entre las poblaciones de los distintos refugios (Hewitt, 1996; Comes y Kedereit, 1998).

La conservación de la variación genética es una de las prioridades globales reconocidas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), una autoridad líder en temas de medio ambiente y desarrollo sostenible.

1.1.2. *Marcadores moleculares*

Cualquier carácter heredable con variación, ya sea en la forma de un carácter fenotípico identificable o de una mutación genética distinguible mediante técnicas moleculares, constituye un marcador genético (Liu y Cordes, 2004). Los marcadores basados en el análisis de ADN o proteínas se denominan marcadores moleculares y son las herramientas utilizadas para desvelar y cuantificar la variación genética. El avance de la bioquímica y la biología molecular ha permitido el desarrollo de diferentes tipos de marcadores moleculares. Los más utilizados en organismos marinos se describen a continuación.

Entre los marcadores moleculares proteicos destacan las alozimas, variantes de proteínas codificadas por distintos alelos de un *locus*. Tienen propiedades enzimáticas idénticas o similares, pero presentan cambios aminoacídicos por variaciones en la secuencia del ADN que codifica el polipéptido. Las alozimas que difieren en tamaño, forma o carga neta, son separadas mediante electroforesis y detectadas habitualmente con tinciones basadas en una reacción enzimática (May, 1998) y las diferencias en presencia/ausencia y frecuencia relativa de los alelos reflejan la variación genética (Liu y Cordes, 2004). Son marcadores codominantes y de función conocida, cuyas técnicas de análisis son sencillas, pudiendo analizarse muestras amplias de forma rápida y a bajo coste. Las alozimas han proporcionado datos para estudios poblacionales en una gran diversidad de especies, pero a medida que se ha ido desarrollando la tecnología del ADN recombinante, se han ido reemplazando por marcadores moleculares de ADN. Los inconvenientes de las alozimas se deben a que el número de *loci* que se puede analizar es limitado y el polimorfismo suele ser bajo; no permiten distinguir toda la variabilidad de un *locus* debido a la redundancia del código genético, sólo alrededor del 30% de las sustituciones aminoacídicas provocan cambios de carga y no reflejan la variación en las regiones no codificantes de los genes (May, 1998; Allendorf *et al.*, 2013).

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs: *Restriction Fragment Length Polymorphisms*; Botstein *et al.*, 1980) se deben a cambios en la secuencia del ADN producidos por inserciones, sustituciones o reordenaciones que afectan a sitios de reconocimiento de enzimas de restricción. La digestión del ADN con

enzimas de restricción da lugar a fragmentos cuyo número y tamaño puede variar entre individuos, poblaciones y especies. Los fragmentos obtenidos se analizaban tradicionalmente mediante la técnica de *Southern blot*, pero esta metodología ha sido sustituida por técnicas basadas en la amplificación mediante PCR, en las que se realiza la digestión de un fragmento de ADN previamente amplificado y el producto de la digestión se resuelve mediante electroforesis (PCR-RFLPs). La principal ventaja de los RFLPs es que son marcadores codominantes y de alta reproducibilidad, sin embargo su nivel de polimorfismo es relativamente bajo y requieren conocimiento de secuencia para el diseño de cebadores o de sondas de hibridación (Liu y Cordes, 2004).

La técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*; Williams *et al.*, 1990) se basa en la amplificación de segmentos de ADN mediante PCR usando un único cebador de 8-10 pb y secuencia aleatoria. Al utilizar cebadores cortos y, en consecuencia, una temperatura de hibridación baja, la amplificación suele dar lugar a múltiples productos, correspondiendo presumiblemente cada uno de ellos a un único *locus*. La variación entre individuos se debe a sustituciones nucleotídicas en los sitios de hibridación del cebador o a inserciones/deleciones entre dos sitios de hibridación y se analiza por la presencia/ausencia de producto. Dado que en la mayoría de los genomas la fracción no codificante es mayor que la codificante, se asume que los *loci* amplificados son selectivamente neutros. Los RAPDs no requieren información previa sobre las secuencias amplificadas y constituyen un método relativamente sencillo y de bajo coste para analizar múltiples *loci* en un número elevado de individuos. Sin embargo, la reproducibilidad puede ser baja debido a la baja astringencia de la PCR, la asignación de bandas a un determinado *locus* es ambigua y, al ser marcadores dominantes, no es posible distinguir los individuos homocigotos de los heterocigotos.

Los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLPs: *Amplified Fragment Length Polymorphisms*; Vos *et al.*, 1995) combinan características de los RFLPs y los RAPDs. Se obtienen por digestión del ADN genómico con dos enzimas de restricción, ligación de adaptadores de secuencia conocida a los fragmentos de restricción y amplificación por PCR utilizando cebadores de secuencia complementaria a los adaptadores con 1-3 bases selectivas en el extremo 3'. La separación de los

fragmentos se realiza en geles de poliacrilamida o en un secuenciador automático. Como los RAPDs, son marcadores *multilocus* y no requieren un conocimiento previo del genoma, pero el número de *loci* amplificados, su especificidad y su reproducibilidad son mayores. Su principal desventaja es que son marcadores dominantes.

Los microsatélites, también conocidos como repeticiones cortas en tándem (STRs: *Short Tandem Repeats*) o repeticiones de secuencia simple (SSRs: *Simple Sequence Repeats*), son secuencias de ADN de ~100 pb constituidas por unidades de 2 a 6 pb repetidas consecutivamente (Chambers y MacAvoy, 2000). Están presentes en todos los organismos investigados, localizándose en cualquier lugar del genoma, pero son menos abundantes en los exones que en las regiones no codificantes. Aunque suelen considerarse marcadores de ADN neutros, se ha demostrado que pueden intervenir en varios procesos biológicos, incluyendo la regulación de la expresión génica, la organización de la cromatina, la regulación de la replicación, la recombinación y el ciclo celular (Li *et al.*, 2002). Los microsatélites son inherentemente inestables, con una tasa de mutación estimada en eucariotas muy superior a la del ADN de copia única (10^{-2} – 10^{-6} y 10^{-9} por *locus* y generación, respectivamente; Ellegren, 2000), mostrando polimorfismo de longitud debido a variaciones en el número de repeticiones.

Los mecanismos mutacionales involucrados en la inestabilidad de los microsatélites son el deslizamiento de cadena durante la replicación y la recombinación (Schlötterer, 2000; Li *et al.*, 2002; Chistiakov *et al.*, 2006; Balaesque, 2007). El deslizamiento de cadena durante la replicación se considera el mecanismo principal y conlleva un apareamiento incorrecto entre la cadena molde y la de nueva síntesis. El apareamiento incorrecto puede ocurrir de dos maneras: (i) si el extremo 3' de la cadena en formación se aparea con una repetición complementaria situada aguas abajo de la cadena molde, se formará un bucle en la cadena en formación y, al terminar la replicación, ésta resultará más larga que la cadena molde; y (ii) si el apareamiento se produce aguas arriba de la cadena molde, será esta cadena la que forme un bucle y la cadena en formación será más corta que la molde tras la replicación. Por otro lado, la recombinación entre cromosomas homólogos o cromátidas hermanas podría dar lugar a variaciones de tamaño en los microsatélites por intercambio desigual de fragmentos de ADN debido a un alineamiento erróneo, provocando la pérdida de unidades de repetición en una molécula

de ADN y la ganancia en la otra, o bien por deslizamientos de la nueva cadena durante la síntesis de ADN asociada a la conversión génica.

Para explicar el modo de evolución de los microsatélites se han propuesto diferentes modelos mutacionales sin que exista consenso sobre cuál es el más adecuado. Los modelos más extremos son el modelo de infinitos alelos (IAM: *Infinite Alleles Model*), que considera que cada mutación crea un alelo nuevo por pérdida o ganancia de un número variable de repeticiones (Kimura y Crow, 1964) y el modelo de mutación paso a paso (SMM: *Stepwise Mutational Model*), según el cual cada mutación crea un alelo nuevo por pérdida o ganancia de una única unidad de repetición del microsatélite (Kimura y Otha, 1978). Modelos intermedios de evolución son el modelo de k alelos (KAM: *K-Allele Model*), que considera que existe un número k de posibles alelos y cada alelo tiene una probabilidad idéntica de mutar a cualquiera de los otros k-1 estados alélicos (Crow y Kimura, 1970) y el modelo de mutación en dos fases (TPM: *Two Phase Model*), que asume que un porcentaje del total de mutaciones implican pérdidas o ganancias de más de una unidad de repetición (Di Rienzo *et al.*, 1994). En todos los modelos, excepto el IAM, los alelos pueden mutar a otros estados alélicos ya presentes en la población, generando con ello homoplasia, es decir, alelos que son idénticos en estado pero no idénticos por descendencia. Aunque la existencia de homoplasia conlleva una reducción del número de alelos observados y de la heterocigosidad, para la mayoría de los análisis de genética de poblaciones no representa un problema y su efecto es generalmente compensado por la alta variabilidad asociada a los *loci* microsatélite (Estoup *et al.*, 2002).

El desarrollo de marcadores microsatélite requiere el diseño de cebadores que hibriden en secuencias únicas flanqueantes. Las variantes alélicas se amplifican mediante PCR y se separan en función de su tamaño generalmente en un secuenciador automático, aunque los alelos también pueden identificarse por PCR en tiempo real mediante el análisis de curvas de fusión de alta resolución (Mader *et al.*, 2008; Distefano *et al.*, 2012).

El alto grado de polimorfismo, unido al patrón de herencia mendeliano, expresión codominante y abundancia en los genomas, convierten a los microsatélites en potentes

marcadores genéticos. El principal inconveniente de estos marcadores es su desarrollo, que requiere conocimiento de secuencia para la identificación de las repeticiones y el diseño de cebadores. Los microsatélites desarrollados en una especie pueden ser útiles en especies próximas, pero con frecuencia tienen que ser aislados *de novo* para cada especie. Por otra parte, el genotipado de múltiples *loci* en un número elevado de individuos es costoso, sin embargo este inconveniente puede minimizarse con el uso de PCRs *multiplex* que permiten amplificar simultáneamente varios *loci* en una única reacción.

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*) son polimorfismos causados por cambios de una única base en una posición concreta del genoma. Son marcadores codominantes caracterizados por su abundancia en los genomas; en humanos hay, como media, un SNP por cada 100-300 pb (Thorisson *et al.*, 2005). Aunque en cada posición puede estar presente cualquiera de las cuatro bases nitrogenadas, por la baja frecuencia de las mutaciones puntuales y el sesgo en favor de las mutaciones entre bases nitrogenadas del mismo tipo, los SNPs suelen considerarse bialélicos (Vignal *et al.*, 2002). Existen diferentes estrategias para la identificación de marcadores SNP, como la secuenciación directa de fragmentos del genoma de diferentes individuos obtenidos mediante PCR, el minado de secuencias *in silico*, el análisis de heteroduplex formados por la rehibridación de diferentes alelos amplificados por PCR, la secuenciación *shotgun* de genotecas con una representación reducida del genoma de individuos genéticamente distantes o la secuenciación de nueva generación (NGS: *Next Generation Sequencing*) de ADN o transcriptomas de un *pool* de individuos (Vignal *et al.*, 2002; Garvin *et al.*, 2010). El genotipado de SNPs también puede realizarse mediante distintas metodologías que difieren en la reacción de discriminación alélica y en la detección de los productos alelo-específicos (Sobrino *et al.*, 2005; Garvin *et al.*, 2010). La elección viene determinada fundamentalmente por el número de SNPs e individuos a analizar. En estudios con un número reducido de SNPs suelen utilizarse técnicas basadas en la PCR con detección de alelos mediante fluorescencia (sondas *Taqman* o análisis de curvas de fusión), o reacciones de minisequenciación, identificando los alelos en un secuenciador automático o por espectrometría de masas MALDI-TOF. En el caso de estudios con alta densidad de SNPs, se utilizan micromatrices de ADN que pueden llegar a incluir hasta un millón de estos marcadores.

También pueden emplearse técnicas que combinan la identificación y el genotipado en el mismo ensayo (Davey *et al.*, 2011; Etter *et al.*, 2011). Los SNPs son mucho más abundantes que todos los demás marcadores moleculares y poseen un gran potencial para la automatización de genotipado pero individualmente, al ser bialélicos, son poco informativos y su identificación es costosa y laboriosa, especialmente en organismos donde no existe un genoma de referencia.

Los polimorfismos del ADN mitocondrial (ADNmt) también son marcadores útiles. En la mayoría de los animales el ADNmt es una molécula circular de 15-20 kb con 37 genes que codifican 22 tipos de ARN transferente, los ARN ribosómicos 12S y 16S y 13 subunidades proteicas de complejos enzimáticos implicados en la fosforilación oxidativa, como las subunidades I, II y III de la citocromo c oxidasa o el citocromo b. También contiene una región variable no codificante con elementos de control de la replicación y la transcripción (Moritz *et al.*, 1987; Boore, 1999). La tasa de mutación del ADNmt es mayor que la del ADN nuclear de copia única; en primates superiores por ejemplo muta 10 veces más rápido (Brown *et al.*, 1979). No obstante, existen diferencias intra e interespecíficas y entre regiones mitocondriales (Mueller, 2006; Galtier *et al.*, 2009; Ballard, 2000). La rápida evolución de la secuencia se atribuye, al menos en parte, a la baja eficiencia de reparación de la ADN polimerasa mitocondrial y a la alta concentración de mutágenos resultantes de los procesos metabólicos de la mitocondria (Li, 1997; Hartl y Clark, 2007). Aunque las inserciones/deleciones no son infrecuentes, la mayoría de las diferencias entre secuencias se deben a mutaciones puntuales, con un sesgo hacia las transiciones respecto a las transversiones (Awise, 2004). La variación del ADNmt se analizaba inicialmente en base a patrones de fragmentos generados por enzimas de restricción, pero actualmente se recurre a la secuenciación directa de alguno de sus genes o de la región control. Las variantes del ADNmt se conocen como haplotipos. Aunque las células somáticas típicas pueden tener cientos de mitocondrias, cada una con varias copias de ADNmt, en general existe un haplotipo mitocondrial preponderante en cada individuo, lo que constituye una característica esencial para su uso en estudios poblacionales.

El genoma mitocondrial es haploide y generalmente muestra herencia clonal materna, sin recombinación genética, por lo que todo el genoma se comporta como un único

locus con múltiples alelos. Su tamaño efectivo es cuatro veces menor que el de los marcadores nucleares, haciéndolo más sensible al efecto de la deriva genética (Ferguson *et al.*, 1995; Ballard y Whitlock, 2004; Zink y Barrowclough, 2008). Si bien el ADNmt de animales se transmite predominantemente a través de la línea materna, existen algunas excepciones. La más destacable ocurre en algunos bivalvos de las familias Donacidae, Hyriidae, Solenidae, Mytilidae, Unionidae, Veneridae, Margaritiferidae (Theologidis *et al.*, 2008) y probablemente Nuculanidae (Boyle y Etter, 2013), que muestran un patrón de herencia particular denominado herencia doblemente uniparental (DUI: *Doubly Uniparental Inheritance*). Este tipo de herencia se debe a la existencia de dos tipos de ADNmt; un genoma tipo F que se transmite a través de los óvulos tanto a los descendientes machos como hembras, y un genoma tipo M que se transmite a través de los espermatozoides sólo a los descendientes machos. En los machos adultos, el tipo F predomina en los tejidos somáticos, mientras que el tipo M lo hace en las gónadas. La detección de DUI en bivalvos puede ser difícil y crea incertidumbre sobre la ausencia real de DUI cuando no se consigue demostrar su existencia en las especies investigadas (Theologidis *et al.*, 2008). Otra característica de las especies con DUI es la existencia de recombinación en el ADNmt.

Entre las propiedades atribuidas al ADNmt se incluyen un modo de evolución prácticamente neutral y una tasa de mutación constante. Las mutaciones adaptativas, que tenderían a fijarse por selección positiva, se consideran poco frecuentes en el genoma mitocondrial. Por ello, se asume que sufre fundamentalmente mutaciones deletéreas, que serán eliminadas por selección purificadora con un efecto prácticamente nulo en la diversidad, y mutaciones neutras, de forma que los niveles de divergencia observados reflejarían el tiempo de divergencia. Sin embargo, estas propiedades parece que no siempre se cumplen, al encontrarse evidencias de selección positiva y tasas de mutación heterogéneas (Ballard y Whitlock, 2004; Galtier *et al.*, 2009).

Los marcadores mitocondriales son importantes herramientas utilizadas en diferentes campos de la biología evolutiva, incluyendo la filogenética, genética de poblaciones y filogeografía, que mantienen su popularidad a pesar de que se empiezan a cuestionar sus atributos más importantes (ausencia de recombinación, neutralidad y tasa constante de evolución) y, en consecuencia, su relevancia como testigo de la historia reciente de

especies y poblaciones (Galtier *et al.*, 2009). La elección del ADNmt como marcador molecular responde a que es la herramienta más conveniente y más barata cuando se explora genéticamente una nueva especie. La existencia de múltiples copias de ADNmt en la célula y de regiones variables flanqueadas por regiones conservadas hace que estas regiones puedan ser fácilmente amplificadas por PCR, incluso en organismos no modelo donde el conocimiento de la secuencia del ADNmt es nulo o insuficiente para el diseño de cebadores. El único inconveniente técnico podría estar asociado a la amplificación indeseada de genes mitocondriales insertados en el genoma nuclear (Bensasson *et al.*, 2001).

La Tabla 1.1 resume las características principales de los marcadores moleculares más utilizados en organismos marinos. La utilización de un tipo u otro de marcador depende del objetivo del estudio que se pretenda realizar. Además de tenerse en cuenta las características propias de cada marcador y la información genómica disponible, el coste, tiempo y equipamiento necesarios para su desarrollo y aplicación son factores que a menudo condicionan la elección.

1.1.3. *Biología e importancia de Cerastoderma edule*

El berberecho *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) es un molusco bivalvo filtrador de la clase Bivalvia, orden Veneroida y familia Cardiidae. Su nombre científico deriva de las palabras griegas *Cerastos*, *Dermos* y *Edule* que significan cuerno, piel y comestible, respectivamente. Morfológicamente se caracteriza por poseer una concha robusta de valvas iguales de color blanco o amarillento, con líneas concéntricas muy finas y entre 22 y 28 costillas radiales (Tebble, 1966; Stachowitsh, 1992; MarLIN, 2006). La valva derecha presenta dos dientes posteriores y la charnela es heterodonta. Los anillos de la concha son discontinuidades de la calcificación y representan fases prolongadas de detención del crecimiento, en su mayoría relacionadas con un patrón de crecimiento estacional. El interior de las valvas presenta manchas de color marrón en la zona

Tabla 1.1. Características de los principales marcadores moleculares

Marcador	Modo de herencia	Requiere información de secuencia	Dificultad de desarrollo/genotipado	Loci analizados	Número probable de alelos	Polimorfismo (abundancia)	Reproducibilidad	Principales campos de aplicación
Alozimas	MC	No	Baja/ Baja	1	2-6	Bajo	Alta	EP, T
RFLPs	MC	Sí	Alta/ Media ²	1	2	Bajo	Alta	DE, EP
RAPDs	MD	No	Muy baja/ Muy baja	Múltiples	2	Intermedio	Baja	EP, MG
AFLPs	MD	No	Baja/ Muy baja	Múltiples	2	Alto	Alta	EP, MG
Microsatélites	MC	Sí	Alta/ Baja	1	Múltiples	Alto	Alta	EP, MG, AP
SNPs	MC	Sí	Alta/ Variable ³	1	2	Muy alto	Alta	MG, EP, AP
ADNmt	Materna/DUI	No ¹	Baja/ Baja		Múltiples haplotipos		Alta	EP, DE

¹ Uso de cebadores universales o de especies próximas; ² PCR-RFLPs; ³ según la técnica de genotipado utilizada; MC: mendeliana codominante; MD: mendeliana dominante; EP: estudios poblacionales; T: taxonomía; DE: diferenciación de especies; MG: mapas genéticos; AP: análisis de parentesco

próxima al músculo aductor posterior y surcos que se prolongan hacia dentro a poca distancia del borde (Figura 1.1).



Figura 1.1. Morfología externa e interna de la concha

Su distribución abarca la costa noreste del Océano Atlántico desde Senegal, en la costa africana, hasta el mar de Barents, pero está ausente en los mares Mediterráneo y Báltico (Hayward y Ryland, 1995), donde es reemplazado por *Cerastoderma glaucum*. Ambas especies de berberecho coexisten en varias áreas de la costa atlántica, incluyendo Noruega, Suecia, Dinamarca, Países Bajos, Reino Unido (UK), Francia, España y Portugal (Brock, 1987; Rolán *et al.*, 1989; Machado y Costa, 1994), aunque sus preferencias de hábitat difieren; *C. edule* tiende a ocupar zonas más expuestas y abiertas al mar, mientras que *C. glaucum* suele localizarse en zonas más protegidas, como lagunas salobres y estuarios (Hummel *et al.*, 1994).

C. edule vive enterrado a poca profundidad en sedimentos arenosos de grano fino y blando de la zona intermareal y en las costas submareales poco profundas, llegando a alcanzar densidades superiores al millar de individuos por metro cuadrado (Gam *et al.*, 2010; Van Colen *et al.*, 2010), pero su abundancia varía considerablemente tanto temporal como espacialmente (Beukema, 1979; Reise, 1985; Jensen, 1992; Strasser *et al.*, 2001). Las condiciones medioambientales apropiadas para *C. edule* oscilan entre un mínimo de 10°C y un máximo de 20°C de temperatura en el agua de mar, y entre 10 y

35 partes por mil de salinidad (Boyden, 1972; Brock, 1980), pudiendo soportar bruscas variaciones de salinidad y temperatura de corta duración.

El crecimiento en *C. edule* es rápido, con una vida media de dos o tres años, aunque en algunas poblaciones se ha estimado en más de 6 años (Iglesias y Navarro, 1990; Jensen, 1992; Lindegarth *et al.*, 1995). Se trata de una especie gonocórica, sin diferencias morfológicas externas entre ambos sexos, que alcanza la madurez sexual en el segundo año de vida (Seed y Brown, 1977). La fecundación es externa, liberando a través del sifón exhalante los gametos. Las características reproductivas varían con el ambiente; el desove tiene lugar por lo general desde el mes de mayo hasta julio/agosto (Malham *et al.*, 2012), pudiendo abarcar desde abril (Guillou *et al.*, 1990) hasta octubre (Cardoso *et al.*, 2009). En latitudes altas (por encima de los 55°N) suele pasar por un único periodo reproductivo de corta duración coincidiendo con las condiciones más favorables en cuanto a temperatura y disponibilidad de nutrientes (Kingston, 1974; Dabouineau y Ponsero, 2009). Al disminuir la latitud, la estrategia reproductiva cambia, produciéndose varios ciclos continuos de desove (Seed y Brown, 1978; Yankson, 1986). Las hembras producen un gran número de huevos de pequeño tamaño que dejan de ser viables si no son fecundados entre las cuatro u ocho horas subsiguientes a su liberación (André y Lindegarth, 1995). Tras la fertilización, el desarrollo larvario es pelágico con una duración de entre 3,5 y 5 semanas (Lebour, 1938; Creek, 1960; Jonsson *et al.*, 1991) hasta su fijación en un sustrato. Posteriormente sufre un fenómeno de metamorfosis, desapareciendo parte de las estructuras larvarias, al mismo tiempo que aparecen otras nuevas y se reordenan las ya existentes. Por último se produce una secreción de la concha definitiva (Pérez-Camacho y Román, 1987). Cuando se fija al fondo alcanza un tamaño de entre 250 y 350 micras de longitud. El potencial de desplazamiento de los adultos es reducido (100-1000 m) y la dispersión de los individuos tiene lugar principalmente durante los estadios larvarios planctónicos.

El asentamiento y reclutamiento larvario tienen gran influencia en la dinámica poblacional de la especie y varían en función de diferentes factores, entre ellos la localización geográfica, variaciones climáticas y estacionales (Ducrottoy *et al.*, 1991) y densidad poblacional (André *et al.*, 1993). Además, el asentamiento larvario no se produce en un único momento, sino que sucede en varias etapas. En caso de que las

condiciones de un lugar no sean adecuadas para el asentamiento, los individuos juveniles pueden desarrollar un biso que les permite aumentar su superficie y con ello su flotabilidad. De esta forma son arrastrados por las corrientes en busca de nuevas zonas de asentamiento (de Montaudouin, 1997).

El crecimiento de los individuos es rápido hasta los dos primeros años de vida y después disminuye a medida que su tamaño aumenta (Seed y Brown, 1977) alcanzando un tamaño final de entre tres y 10 cm. La tasa de crecimiento varía de un año a otro y entre zonas geográficas (Hancock, 1967; Ducrotoy *et al.*, 1991). También depende de la edad, estación del año, altura de las mareas, temperatura, disponibilidad de alimento, densidad poblacional y competición interespecífica (MarLIN, 2006).

De acuerdo con Ducrotoy *et al.* (1991) la dinámica poblacional de *C. edule* comprende cuatro fases: (i) crisis, en la que la baja densidad de individuos hace que el crecimiento sea máximo; (ii) recuperación, con una alta tasa de reclutamiento; (iii) mantenimiento, en la que hay varias clases de edad, alta densidad de las clases de mayor edad, reclutamiento estacional y baja tasa de crecimiento; y (iv) declive, con una reducción del número de individuos por mortalidad de los adultos o ausencia de reclutamiento debido a factores ambientales. Cualquier población puede mostrar estas características a distinta escala espacial y temporal.

Los berberechos son un componente importante del ecosistema y constituyen la fuente principal de alimento para un alto número de especies, especialmente aves, como los ostreros *Haematopus ostralegus* o los playeros rojizos *Calidris canutus*, pero también para otras especies como el camarón gris *Crangon crangon* o el cangrejo de mar *Carcinus maenas*, entre otras. De hecho, la depredación tiene una gran influencia sobre el reclutamiento y la dinámica poblacional de la especie (Sánchez-Salazar *et al.*, 1987; Masski y Guillou, 1999).

La importancia comercial de *C. edule* se refleja en su explotación pesquera a lo largo de la práctica totalidad de su rango de distribución. Las capturas registradas en el año 2011 sumaron un global de 9300 t (FAO, 2014), un volumen probablemente infraestimado teniendo en cuenta que en Galicia la producción en el mismo año alcanzó las 3315 t

(Xunta de Galicia, 2014). En Europa, los principales países productores son UK, España, Portugal y Francia (Figura 1.2).

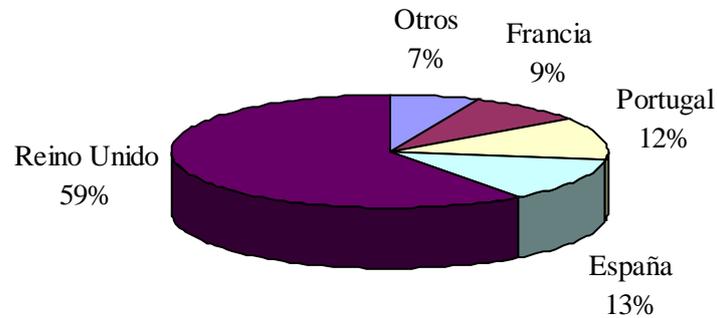


Figura 1.2. Datos relativos de producción media anual de *C. edule* en los principales países productores de Europa durante el periodo 2001-2011 según los datos registrados por la FAO

1.1.4. Estudios genéticos en *C. edule*

Aunque *C. edule* constituye un importante recurso en las costas europeas todavía son escasos los estudios dedicados a cuantificar su diversidad genética, evaluar su estructura de población y comprender los procesos históricos y contemporáneos que modulan la distribución de la variación genética y la conectividad de sus poblaciones a lo largo de su ámbito de distribución. Por otra parte, los datos disponibles acerca de las características genéticas de *C. edule* proceden sobre todo de localidades del entorno de las Islas Británicas y del Mar del Norte.

Beaumont *et al.* (1980), en un estudio incluyendo siete especies de bivalvos, proporcionó las primeras estimas de diversidad al detectar la existencia de polimorfismo en el *locus* de la enzima octopina deshidrogenasa (*Odh*), así como los primeros indicios de diferenciación poblacional a ambos lados del Canal de la Mancha. En un trabajo más exhaustivo, Beaumont y Pether (1996) examinaron en ocho localidades de la costa este y oeste del sur de UK trece *loci* alozímicos, mejorando las estimas de diversidad genética y proporcionando datos más robustos sobre la variación geográfica en las costas inglesas.

Más recientemente, Coscia *et al.* (2013) combinaron datos genéticos, obtenidos con marcadores microsatélite derivados del presente estudio, y predicciones de transporte larvario inferidas con modelos hidrodinámicos y modelos de seguimiento de partículas, para investigar el papel de las corrientes marinas en la conectividad de poblaciones de *C. edule* en el sur del Mar de Irlanda. La estructura genética inferida reveló la existencia de un patrón geográfico débil pero significativo en consonancia con las predicciones de los modelos.

Además de genes nucleares se examinó la variación en el gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI) de *C. edule* en 19 localidades distribuidas desde Marruecos hasta Rusia, con el fin de comprender cómo los pronunciados cambios climáticos y topográficos ocurridos en el Pleistoceno influenciaron la distribución de las comunidades bentónicas actuales (Krakau *et al.*, 2012). La detección de un grupo homogéneo de poblaciones al sur del Canal de la Mancha y otro grupo heterogéneo al norte, incluyendo posiblemente uno ártico, sugirió que *C. edule* sobrevivió a las glaciaciones en refugios o zonas periglaciales, experimentando posteriormente una expansión hacia el sur.

Paralelamente a los estudios realizados a nivel intraespecífico, *C. edule* junto con *C. glaucum*, dos especies morfológicamente similares y estrechamente relacionadas por compartir un ancestro común hace ~6 millones de años (Ma), han sido analizadas para comprender cómo sus diferentes hábitats y características vitales repercuten en la estructura genética de ambos berberechos. Hummel *et al.* (1994) analizaron siete *loci* alozímicos en ocho localidades de Dinamarca, Países Bajos y Francia, y Tarnowska *et al.* (2012) un fragmento del gen COI en un número sustancial de poblaciones de ambas especies. Comparativamente, *C. edule* muestra mayor (alozimas) o similar (gen COI) diversidad intrapoblacional, baja diferenciación entre poblaciones vecinas (alozimas y gen COI) y un gradiente latitudinal de diversidad genética opuesto al de *C. glaucum* (gen COI).

Por otra parte, diferentes trabajos han abordado el desarrollo de herramientas moleculares para la diferenciación de ambos berberechos, incluyendo: (i) los sistemas enzimáticos malato deshidrogenasa (*Mdh*) (Brock, 1978; Machado y Costa, 1994),

leucino amino peptidasa (*Lap*), esterasas e isocitrato deshidrogenasas 1 y 2 (*Idh-1* e *Idh-2*) (Jelnes *et al.*, 1971; Brock, 1978; Machado y Costa, 1994); (ii) ensayos inmunolectroforéticos basados en reacciones antígeno-anticuerpo específicas (Brock, 1987); (iii) digestión de la molécula completa del ADNmt con la enzima *BglIII* (Brock y Christiansen, 1989); (iv) marcadores RAPD (André *et al.*, 1999); (v) PCR-RFLPs del ADN ribosómico 5S (Freire *et al.*, 2005); y (vi) una prueba de PCR basada en la amplificación especie-específica de una región del ADN ribosómico 18S-28S (Freire *et al.*, 2011).

A nivel citogenético se ha descrito su dotación diploide de $2n=38$ (Koulman y Wolff, 1977), un cariotipo caracterizado por la presencia variable de cromosomas supernumerarios (Insua y Thiriot-Quévieux, 1992; Leitão *et al.*, 2008), la localización cromosómica de los genes que codifican para el ARN ribosómico (Insua *et al.*, 1999) y la inducción de bandas mediante digestión con enzimas de restricción (Leitão *et al.*, 2006), así como alteraciones en el contenido en ADN y número y morfología de los cromosomas asociadas a la neoplasia diseminada (Díaz *et al.*, 2013), una enfermedad caracterizada por una proliferación excesiva y anormal de células de origen desconocido y causante de altas mortalidades en las poblaciones naturales de *C. edule* (Villalba *et al.*, 2001).

1.2. Objetivos

El conocimiento de la variación genética existente y cómo se distribuye dentro y entre las poblaciones tiene importantes implicaciones en la comprensión de la biología evolutiva, en la conservación y en la gestión de una especie. A pesar de que el berberecho *C. edule* es un componente importante del ecosistema costero y un recurso explotado en gran parte del litoral europeo, los datos genéticos disponibles todavía son insuficientes para desvelar su historia evolutiva y asesorar la conservación y explotación sostenible de las poblaciones naturales de esta especie. El objetivo general de este trabajo es progresar en la caracterización genética de las poblaciones naturales de *C. edule*, tratando de reconocer factores históricos y contemporáneos que pudiesen influir en la distribución de su variación genética.

Los objetivos específicos que se persiguen son los siguientes:

1. Proporcionar herramientas moleculares tipo marcadores microsatélite y desarrollar PCRs *multiplex* que faciliten su análisis a nivel poblacional.
2. Evaluar la diversidad genética y estructura poblacional a una escala espacial reducida en la región noroeste de la Península Ibérica, sometida a una intensa explotación.
3. Evaluar la diversidad genética y estructura poblacional a lo largo del ámbito de distribución de la especie y examinar su historia evolutiva, contrastando los patrones revelados por marcadores microsatélite y el gen mitocondrial citocromo b.

Capítulo 2. Desarrollo de marcadores microsatélite y PCRs *multiplex*

2.1. Introducción

Los microsatélites son marcadores muy versátiles que han sido utilizados con éxito en diferentes campos de la biología, incluyendo el mapeo genético, la genética forense, la genética de poblaciones y la genética de la conservación (Chistiakov *et al.*, 2006). Sus características más destacables son su naturaleza multialélica, patrón de herencia codominante, amplia distribución genómica, abundancia y pequeño tamaño, que hace que puedan ser fácilmente amplificados mediante PCR. Se han descrito en especies de diferentes grupos de moluscos bivalvos como ostras (Launey *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003), mejillones (Presa *et al.*, 2002; Gardeström *et al.*, 2008), pectínidos (Arias *et al.*, 2010; Arias *et al.*, 2011a), almejas (Yasuda *et al.*, 2007; An *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Chacón *et al.*, 2013; Borrell *et al.*, 2014), e incluso en el berberecho *C. glaucum* (Pearson, 2003), pero no en *C. edule* a pesar de tratarse de una especie con gran importancia comercial y ecológica.

El desarrollo de marcadores microsatélite es un proceso laborioso que implica una inversión de tiempo y esfuerzo considerable, especialmente en el caso de organismos con escasa información sobre sus secuencias genómicas. En algunos casos se han realizado con éxito amplificaciones interespecíficas (Primmer y Ellegren, 1998; An *et al.*, 2009; Hoffman, 2009), pero el potencial de transferencia entre especies es limitado (Barbará *et al.*, 2007) debido a la acumulación de mutaciones en las regiones flanqueantes que impiden la hibridación de los cebadores.

Para el desarrollo *de novo* de microsatélites en una especie se han descrito diferentes métodos. El más tradicional conlleva la construcción de una genoteca parcial, rastreo de las colonias recombinantes mediante *Southern-blot* y secuenciación de los clones positivos. Aunque sencillo, este método es bastante tedioso y su rendimiento es bajo. Otras alternativas intentan aumentar el rendimiento construyendo una genoteca parcial de fragmentos de ADN genómico previamente seleccionados mediante hibridación con sondas microsatélite. La construcción de genotecas enriquecidas, a pesar de ser laboriosa, se ha convertido en una estrategia indispensable para organismos no modelo con escasa información genómica, lo que ha llevado al desarrollo de numerosos protocolos para su construcción (Zane *et al.*, 2002; Tehen *et al.*, 2010).

La búsqueda *in silico* de microsatélites entre las secuencias disponibles en las bases de datos de ADN, especialmente en bases de datos de etiquetas de secuencias expresadas (ESTs: *Expressed Sequence Tags*), evita la construcción de genotecas y el rastreo de fragmentos amplificados. Este procedimiento, además de reducir considerablemente el coste, permite combinar las ventajas de la variabilidad inherente a los microsatélites y el potencial informativo de las ESTs. En caso de localizarse en genes de secuencia conocida, los microsatélites permitirán investigar la correlación entre el número de repeticiones y la funcionalidad del gen. Por otra parte, los microsatélites identificados pueden presentar un mayor éxito de amplificación interespecífica, ya que es más probable que las secuencias flanqueantes estén conservadas (Gupta *et al.*, 2003; Pashley *et al.*, 2006). Sin embargo, dado que las secuencias EST se obtienen a partir de ADN complementario, los cebadores diseñados para una secuencia microsatélite, puede que no produzcan amplificación en ADN genómico, por hibridar en una región limítrofe entre un exón y un intrón (Hu *et al.*, 2004). Además, al aislarse a partir de regiones sometidas a una mayor intensidad selectiva, los microsatélites obtenidos suelen ser menos variables que los obtenidos a partir de ADN genómico (Gupta *et al.*, 2003). La limitación crítica es la disponibilidad de secuencias EST en las bases de datos, por lo que es una estrategia difícilmente aplicable en organismos poco estudiados a nivel genómico.

Las tecnologías NGS proporcionan de forma rápida gran cantidad de secuencias de cualquier especie, supliendo las limitaciones de la carencia de datos genómicos en especies no modelo. Al mismo tiempo, permiten identificar un elevado número de microsatélites y obtener gran cantidad de información genética adicional potencialmente útil en otros estudios (Boomer y Stow, 2010; Castoe *et al.*, 2010; Saarinen y Austin, 2010). La combinación de NGS y estrategias de enriquecimiento es de especial interés en especies con una baja frecuencia de motivos microsatélite (Santana *et al.*, 2009; Malausa *et al.*, 2011) al incrementar el número de *loci* microsatélite aislados y reducir la proporción de motivos no deseados por generar problemas de genotipado (Malausa *et al.*, 2011). El principal inconveniente de los métodos de aislamiento mediante NGS es la pequeña longitud de lectura de los fragmentos secuenciados, que puede conllevar la eliminación de hasta 2/3 del total de secuencias microsatélite obtenidas por la imposibilidad de diseñar cebadores para sus regiones flanqueantes, lo que afecta

especialmente a los microsatélites más largos y potencialmente más polimórficos (Abdelkrim *et al.*, 2009). Además, al tratarse de estrategias de reciente desarrollo (Abdelkrim *et al.*, 2009; Rasmussen y Noor, 2009; Santana *et al.*, 2009), pocos laboratorios disponen del equipamiento necesario y, aunque puede recurrirse a servicios externos especializados, el coste económico puede ser inasumible cuando se dispone de un presupuesto limitado.

Una vez obtenidas secuencias con motivos microsatélite, se diseñan cebadores específicos que hibriden en las regiones flanqueantes al microsatélite y se optimizan las condiciones de PCR para conseguir la amplificación de los diferentes *loci* (Zane *et al.*, 2002). El rendimiento en el proceso de genotipado de múltiples *loci* microsatélite, puede aumentarse considerablemente mediante el desarrollo de PCRs *multiplex* que permitan la amplificación de varios *loci* de forma simultánea en una única reacción. Los *loci* coamplificados pueden diferenciarse por el tamaño de sus alelos o, en caso de que exista solapamiento del rango de tamaño de los alelos, por los diferentes fluorocromos asociados a sus respectivos cebadores.

En este capítulo se describe el desarrollo de marcadores microsatélite en *C. edule* mediante la construcción de una genoteca enriquecida en el motivo (ATC)_n y la optimización de PCRs *multiplex* para facilitar su genotipado en estudios poblacionales.

2.2. Material y métodos

2.2.1. Material de estudio y extracción de ADN

Los individuos de *C. edule* analizados proceden de seis localidades del litoral atlántico: Aveiro (Ría de Aveiro, Portugal), San Simón (Ría de Vigo, Pontevedra), Boiro (Ría de Arousa, A Coruña), Corcubión (Ría de Corcubión, A Coruña), Ferrol (Ría de Ferrol, A Coruña) y Oostershede (Países Bajos) (Figura 2.1). En el laboratorio se diseccionó cada ejemplar, guardándose el músculo aductor, el pie y la masa visceral sin glándula digestiva en etanol al 96%.

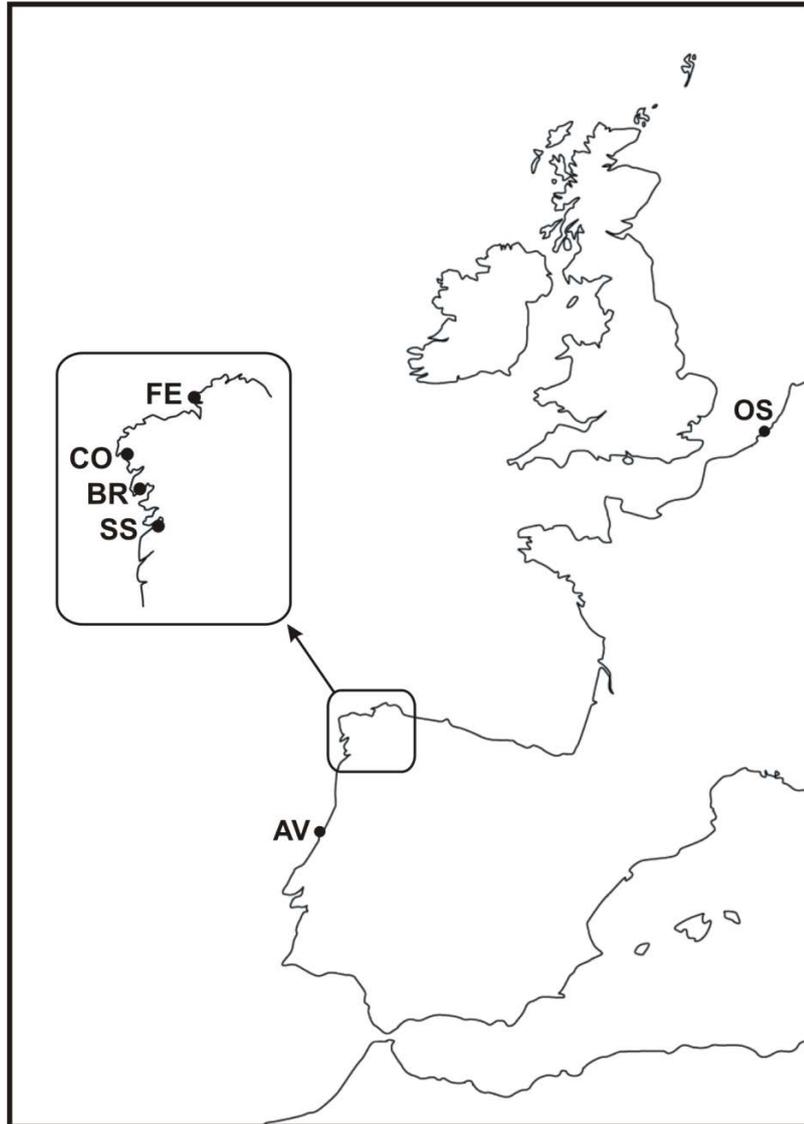


Figura 2.1. Localización de los sitios de muestreo: Aveiro (AV); San Simón (SS); Boiro (BR); Corcubión (CO); Ferrol (FE) y Oosterschelde (OS)

Se extrajo ADN genómico a partir de músculo aductor fresco/conservado en etanol según el método descrito por Fernández-Tajes y Méndez (2007) para moluscos bivalvos. Para cada individuo, se depositó un fragmento de 20 mg de músculo aductor en 400 μ l de tampón de lisis (tris(hidroximetil)aminometano [Tris] 1 M, ácido etilendiaminotetraacético [EDTA] 0,2 M, N-Laurylsarcosin 2,5%). Se añadieron 5 μ l de proteinasa K (200 mg/ml) y se incubó a 60°C durante toda la noche. Posteriormente, se incubó la mezcla con 4 μ l de RNasa libre de DNasa (20 mg/ml; Sigma) durante 1 h a 37°C. A continuación, se añadieron 150 μ l de tampón de precipitación (acetato amónico 3 M pH 6,0), se dejaron las muestras en hielo durante 10 min, y se centrifugaron a

13000 g durante 10 min, recogiendo el sobrenadante. La precipitación del ADN se realizó añadiendo 400 µl de isopropanol. Tras centrifugar a 13000 g durante 3 min, se eliminó el sobrenadante por decantación. El ADN se lavó con 1 ml de etanol al 70% y, después de centrifugar a 13000 g 6 min y eliminar el etanol, los tubos se dejaron secar al aire, resuspendiéndose el ADN en 30 µl de 1xTE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8).

Para cuantificar el ADN extraído, una alícuota de 1 µl de cada individuo se mezcló con 1 µl de tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, azul de xianol 0,25% y glicerol al 30% en 1xTAE [Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM]) y 4 µl de H₂O milliQ, y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en 1xTAE. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0,5 µg/ml en 1xTAE durante 30 min, y se visualizaron en el sistema de captación de imagen Gel DocTM XR (Bio-Rad). La cuantificación del ADN se efectuó por comparación con un marcador de concentración conocida (Marker III; Roche).

2.2.2. *Detección de secuencias microsatélite mediante dot-blot*

Con el fin de determinar la riqueza relativa de diferentes secuencias microsatélite, se realizaron hibridaciones con las sondas (AC)₁₀, (CT)₁₀, (ATC)₇, (ACC)₇, (GAA)₇, (TGA)₇, (CAGA)₆ y (CTGT)₆ marcadas con digoxigenina en el extremo 5'. Para ello, el ADN genómico de un individuo se depositó en concentraciones decrecientes en puntos discretos de una membrana de nylon cargada positivamente (GE HealthCare Life Sciences). Se prepararon diluciones a 150 ng/µl, 75 ng/µl, 37,5 ng/µl y 18,75 ng/µl, que se desnaturalizaron durante 5 min a 95°C, seguidos de otros 5 min en hielo. La membrana se lavó en 2xcitrato sódico salino (20xSSC: NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M) y, tras secarla, se depositaron en ella 2 µl de cada dilución. El ADN se fijó a la membrana irradiándola durante 5 min con 4000 µJ/cm² de luz ultravioleta (UV) y se incubó a 37°C durante 30 min en 20 ml de solución de prehibridación (5xSSC, dodecilsulfato sódico [SDS] 0,02%, N-lauril sarcosine sal sódica [LSS] 0,01%, agente bloqueante de Roche 0,3%). Posteriormente, se añadieron 10 pmol de sonda y se incubó a 37°C durante 3 h. Después, la membrana se lavó 2 veces en 2xSSC con 0,1% de SDS a temperatura ambiente durante 5 min, y otras dos veces en 0,5xSSC con 0,1% de SDS

a 30°C durante 15 min. Tras un lavado de 5 min en tampón de lavado (tween 20 al 0,3% en tampón 1 [ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,5]), la membrana se incubó durante 30 min en tampón 2 (agente bloqueante de Roche al 1% en tampón 1).

La detección de la sonda hibridada se realizó por quimioluminiscencia. Se realizó una incubación durante 30 min en 75 mU/ml de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (Roche) en tampón 2. Para eliminar el exceso de anticuerpo se realizó un lavado de 20 min en tampón de lavado. La membrana se equilibró manteniéndola 5 min en tampón 3 (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM), y se incubó durante 5 min en una solución 1:100 del sustrato quimoluminiscente CSPD (Roche) en tampón 3. Posteriormente, la membrana se introdujo en una bolsa de hibridación y se incubó a 37°C durante 15 min. La película *Medical X-Ray Film* (Fujifilm) se expuso a la membrana durante 15 min a temperatura ambiente. El revelado se realizó introduciendo la película en Revelador G 150 (Agfa) durante 5 min, en H₂O 5 min, y en Fijador G 354 (Agfa) otros 5 min.

Para rehibridar la membrana con otras sondas, se eliminó la sonda hibridada mediante dos lavados de 15 min a 37°C en NaOH 0,2 M con 0,1% de SDS, seguidos de un lavado de 5 min en 2xSSC, y se procedió a la hibridación según el protocolo descrito anteriormente.

2.2.3. Construcción de una genoteca enriquecida en secuencias microsatélite

Atendiendo a los resultados obtenidos en el *dot-blot* se construyó una genoteca enriquecida para el motivo ATC según el protocolo descrito por Billote *et al.* (1999) con algunas modificaciones. Éstas consistieron en añadir el detergente SDS a las soluciones utilizadas para la selección de los fragmentos de ADN que contenían el motivo microsatélite buscado, tanto durante la hibridación con la sonda como en los lavados post-hibridación. El SDS actúa como un agente desnaturalizante y evita las uniones inespecíficas de la sonda, así como su unión a fragmentos que contienen un número de repeticiones excesivamente bajo (una o dos repeticiones), y por tanto aumenta la astringencia de la hibridación.

El ADN genómico de un individuo se trató con diferentes enzimas de restricción, (*RsaI*, *AluI*, *HaeIII*, *EcoRV*, *SmaI* y *PvuII*), para obtener un *smear* entre 400 y 1500 pb. En todos los casos las digestiones se realizaron en un volumen de 20 µl conteniendo 300 ng de ADN, 10 U de enzima, 0,2 µl de seroalbúmina bovina 100x (BSA; New England BioLabs) y 2 µl del tampón correspondiente a cada enzima (10x). La reacción tuvo lugar a 37°C (excepto *SmaI* a 25°C) durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 10 U de enzima y 0,2 µl de BSA 100x y se dejaron actuar otras 3 h. La reacción se detuvo añadiendo 2 µl de tampón de carga. Para comprobar el tamaño de los fragmentos obtenidos, 10 µl del producto de la digestión se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en 1xTAE.

De las enzimas probadas, se seleccionó *AluI* por generar un *smear* continuo y de tamaño adecuado. Para construir la genoteca se digirieron 2 µg de ADN genómico con 20 U de enzima, 0,5 µl de BSA 100x y 5 µl del tampón correspondiente a la enzima (10x) en un volumen final de 50 µl durante una noche a 37°C, y con 0,5 µl de BSA 100x y 20 U de enzima adicionales tres horas más. El producto de esta digestión se ligó a los adaptadores RSA21 5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3' y RSA25 5'-pTAGTCCACGCGTAAGCAAGAG-3', diseñados por Edwards *et al.* (1996). El ADN digerido (1 µg) se incubó toda la noche a 4°C con 1 µl de RSA21 (2 µM), 1 µl de RSA25 (2 µM), 1,4 µl de ADN ligasa T4 (3 U/µl; Promega) y 20 µl del tampón correspondiente a la enzima (10x), en un volumen final de 200 µl. La ligación se comprobó mediante PCR, empleando una mezcla de reacción de 25 µl con 5 µl de la solución de ligación, 1x de tampón de la polimerasa (Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, pH 8,3), 0,25 mM de cada dNTP, 1 µM del adaptador RSA21 y 0,625 U de *Taq* ADN polimerasa (Roche). El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 1 min; 25 ciclos de 40 s a 94°C, 1 min a 60°C y 2 min a 72°C; seguidos de una extensión final a 72°C durante 5 min. La amplificación se comprobó en un gel de agarosa al 2% en 1xTAE.

La selección de las secuencias microsatélite se realizó mediante la hibridación con una sonda oligonucleotídica (ATC)₁₀ marcada con biotina en el extremo 5'. Un volumen de 100 µl de la PCR anterior se llevó a 500 µl con H₂O milliQ estéril y se calentó a 95°C durante 15 min. Tras la desnaturalización del producto de PCR, se añadieron 3 µl de la

sonda biotinilada (20 μ M), más 13 μ l de 20xSSC y 5 μ l de 10% SDS. La hibridación tuvo lugar durante 20 min a temperatura ambiente. La captura de las secuencias seleccionadas se realizó con las partículas magnéticas *Streptavidin MagneSphere[®] Paramagnetic Particles* (Promega). Mediante un soporte magnético se eliminó el sobrenadante comercial de un vial de partículas magnéticas (0,6 mg). A continuación, las partículas se lavaron tres veces en 0,5xSSC con 0,1% de SDS y se resuspendieron en 100 μ l de 0,5xSSC. Se añadió el producto de la hibridación y, tras 10 min a temperatura ambiente, el tubo con la mezcla se colocó en el soporte magnético para eliminar el sobrenadante. Se realizaron tres lavados en 300 μ l de 0,1xSSC con 0,1% de SDS y los fragmentos capturados se recuperaron añadiendo en dos pasos, 100 μ l y 150 μ l de H₂O milliQ, recuperando en cada uno de ellos el sobrenadante con ayuda del soporte magnético. Para obtener mayor cantidad de ADN, el producto obtenido tras la hibridación se amplificó por PCR en las condiciones descritas anteriormente, excepto el número de ciclos que se redujo a 20.

El producto resultante de la amplificación se clonó en plásmidos pCR[®]2.1-TOPO[®] utilizando el *TOPO TA cloning kit* (Invitrogen). La transformación se hizo en células competentes TOP10F['] de *Escherichia coli* suministradas en el kit de clonación. A 4 μ l del producto de amplificación se le añadieron 1 μ l de solución salina (NaCl 1,2 M, MgCl₂ 0,06 M) y 1 μ l de vector pCR[®]2.1-TOPO[®]. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 30 min y 2 μ l se transfirieron a 50 μ l de células competentes guardadas a -80°C. Después de una incubación en hielo durante 10 min, se llevó a cabo el choque térmico: las células se mantuvieron a 42°C durante 30 s e inmediatamente se pasaron a hielo. Se añadieron 250 μ l de medio SOC (bactotripton 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM) a temperatura ambiente y las células se dejaron crecer manteniendo los tubos en posición horizontal con agitación suave durante 1 h a 37°C. Posteriormente, se añadieron 650 μ l de medio SOC y se sembraron las células en placas Petri con medio 2xYT (bactotripton 1,6%, extracto de levadura 1%, NaCl 0,5%) y 100 μ g/ml de ampicilina, impregnado con 100 μ l de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 100 mM y 20 μ l de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) 50 mg/ml. Los clones recombinantes se detectaron mediante selección blanco-azul (Sambrook y Russell, 2001).

2.2.4. Rastreo de la genoteca mediante transferencia e hibridación

Las colonias recombinantes se transfirieron a membranas de nylon cargadas positivamente (GE HealthCare Life Sciences) para su hibridación con una sonda oligonucleotídica (ATC)₇ marcada con digoxigenina en el extremo 5'. Las colonias se dejaron crecer en placas con medio LB (bactotripton 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1%) y 100 µg/ml de ampicilina durante 24 h a 37°C. Se depositó la membrana de nylon, dejándola en contacto con las colonias durante 1 min y después, con la cara en contacto con la placa hacia arriba, se colocó sucesivamente sobre papel Whatman saturado previamente con solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M), solución de neutralización (Tris 1 M, NaCl 1,5 M, pH 8), y 2xSSC, manteniéndose la membrana durante 15, 15 y 10 min en cada papel. El ADN se fijó a la membrana irradiándola con luz UV (4000 µJ/cm²) durante 5 min. Posteriormente, las membranas se incubaron durante 1 h a 50°C en una solución precalentada de 2xSSC con 0,1% de SDS a la que se añadieron 100 µl de proteinasa K (10 mg/ml; Sigma) por cada 10 ml de solución, y se lavaron dos veces a esa misma temperatura durante 15 min en 2xSSC con 0,1% de SDS precalentado. Las membranas se colocaron entre papel de filtro humedecido con agua destilada estéril, presionando sobre ellas para eliminar los restos celulares. La hibridación se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.2.

2.2.5. Secuenciación de clones e identificación de secuencias microsatélite

Los clones que hibridaron con la sonda microsatélite se cultivaron en 1 ml de medio líquido LB con 100 µg/ml de ampicilina y se dejaron crecer en agitación a 37°C durante 24 h para extraer el ADN plasmídico. La extracción se realizó con el *QUIAprep® Spin Miniprep Kit* (Quiagen), siguiendo el método de lisis alcalina modificado de Birnboim y Doly (1979). Una vez cuantificado en un gel de agarosa al 1% en 1xTAE por comparación con un marcador de concentración conocida (Marker III; Roche), el ADN plasmídico extraído se envió los Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidade da Coruña para la secuenciación del inserto. La secuenciación se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems).

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit (Hall, 1999) para eliminar los adaptadores y secuencias plasmídicas flanqueantes, y se compararon todas contra todas utilizando la herramienta *local* BLAST implementada en el mismo programa para determinar la similitud entre ellas y descartar las secuencias redundantes.

Los motivos microsatélite se identificaron mediante el programa Tandem Repeats Finder (Benson, 1999). Una secuencia se consideró microsatélite cuando contenía al menos cuatro repeticiones dinucleotídicas, tres repeticiones trinucleotídicas o dos repeticiones tetranucleotídicas o superiores ininterrumpidas. La tasa de éxito de la genoteca se calculó como el número de secuencias únicas con motivos microsatélite x 100/ número total de secuencias analizadas, y la tasa de redundancia como el número de secuencias repetidas x 100/ número total de secuencias analizadas. Utilizando el programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000), se diseñaron cebadores específicos para las regiones flanqueantes a las secuencias microsatélite identificadas.

2.2.6. Amplificación de loci microsatélite mediante PCR

Cada pareja de cebadores diseñada se probó inicialmente en una muestra de 20 individuos. La reacción de amplificación tuvo lugar en un volumen de 12,5 µl con 1 ng/µl de ADN genómico, 0,3 U de *Taq* ADN polimerasa, 1x de tampón de la polimerasa, 0,2 mM de cada dNTP, 0,24 µM de cada cebador y concentraciones finales de entre 1,5 y 3,0 mM de MgCl₂ según la pareja de cebadores utilizados en la amplificación. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min; 34 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 49-62°C y 30 s a 72°C; seguidos de una extensión final a 72°C durante 10 min.

La temperatura de hibridación de los cebadores y la concentración de MgCl₂ se optimizaron realizando las amplificaciones en un termociclador de gradiente MyCyclerTM (Bio-Rad) cuando fue necesario. La existencia de polimorfismo en los microsatélites amplificados satisfactoriamente se determinó en un gel de agarosa al 3% en 0,5xTBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM) teñido con bromuro de etidio.

La caracterización de los alelos en los *loci* microsatélite se realizó, en al menos 30 individuos de las localidades muestreadas, utilizando un cebador marcado en el extremo 5' con un fluorocromo (6-FAM o HEX). Los productos de PCR se separaron en el secuenciador automático ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) de los Servicios de Apoyo á Investigación de la Universidade da Coruña, determinándose el tamaño de los alelos y el genotipo de los individuos con el programa GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems). El programa permitió visualizar los cromatogramas obtenidos en el secuenciador automático y, una vez identificados manualmente, se crearon plantillas (bins) con los alelos de cada uno de los *loci* para automatizar el proceso de genotipado. Los genotipos asignados automáticamente por el programa se comprobaron manualmente para rectificar posibles errores en la identificación de alelos y añadir los alelos nuevos a la plantilla. Los datos del genotipado se exportaron en formato Excel y se generaron los formatos de archivo necesarios para los análisis estadísticos utilizando el programa Microsatellite Toolkit (Park, 2001).

2.2.7. *Análisis de datos*

Para cada *locus* se determinó el número de alelos (N_a), la heterozigosidad observada (H_o) y la heterozigosidad esperada (H_e) insesgada de Nei (1978) con el programa Genetix v.4.03 (Belkhir *et al.*, 2004). Los tests para determinar la bondad de ajuste al equilibrio Hardy-Weinberg (H-W) y a las condiciones de equilibrio de ligamiento se llevaron a cabo utilizando el programa Genepop v.4.0. (Rousset, 2008). La significación se determinó mediante el método de cadena de Markov utilizando 10000 *dememorizations*, 5000 *batches* y 5000 iteraciones por *batch*. La presencia de alelos nulos se detectó empleando el programa Microchecker (Van Oosterhout *et al.*, 2004) y su frecuencia se estimó según el método de Brookfield I (Brookfield, 1996). Cuando se llevaron a cabo tests estadísticos múltiples, los valores de significación se ajustaron utilizando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

2.2.8. *Diseño y optimización de PCRs multiplex*

Una vez caracterizados los marcadores microsatélite polimórficos se diseñaron PCRs *multiplex* empleando el programa Multiplex Manager (Holleley y Geerts, 2009). Este

programa usa datos de heterocigosidad, número y rango de tamaño de los alelos de cada marcador y temperatura de hibridación y secuencia de los cebadores de cada *locus* para combinar todos los marcadores en el menor número de reacciones, de forma que maximiza el espacio entre marcadores con el mismo fluorocromo y minimiza la diferencia en la temperatura de hibridación de los cebadores de la misma reacción. A los *loci* con alelos de tamaño solapante el programa les asigna fluorocromos diferentes (6-FAM, VIC, NED o PET). El programa se ejecutó con ocho marcadores, señalando los *loci* que debían estar marcados con 6-FAM y una distancia mínima de 50 pb entre *loci* con el mismo fluorocromo.

Las PCRs *multiplex* diseñadas se optimizaron para conseguir una amplificación óptima y homogénea de todos los *loci* combinados. Para ello se modificó la concentración inicial de los cebadores (0,2 μ M) hasta conseguir que todos los marcadores presentasen una intensidad de señal similar. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 12,5 μ l con 0,8-8 ng/ μ l de ADN molde, cebadores (Tabla 2.1) y 1x *QUIAGEN Multiplex PCR Master Mix (HotStarTaq*[®], tampón, MgCl₂ 3 mM, y mezcla de dNTPs). El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 1,5 min a 57°C y 1 min a 72°C; seguidos de una extensión final a 60°C durante 30 min. Tras verificar la amplificación en un gel de agarosa al 2% en 1xTAE, los fragmentos se separaron en un secuenciador automático y se visualizaron con el programa GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems).

2.3. Resultados

Todas las sondas microsatélite probadas dieron lugar a hibridación positiva en los análisis *dot-blot*, pero la mayor intensidad de hibridación se obtuvo con las sondas dinucleotídicas (AC)₁₀ y (CT)₁₀ y la trinucleotídica (ATC)₇ (Figura 2.2). Dado este resultado, se optó por construir una genoteca enriquecida en la repetición ATC.

El número de colonias recombinantes de la genoteca construida fue de 800, de las cuales 398 hibridaron con la sonda (ATC)₇. Se secuenciaron 98 colonias seleccionadas al azar, descartándose 10 de ellas por tener secuencias idénticas a otras ya obtenidas

(tasa de redundancia=10%). De las 88 secuencias únicas, 72 presentaron al menos una región microsatélite (tasa de éxito=73%) y 56 fueron idóneas para el diseño de cebadores por la disponibilidad de secuencias flanqueantes. Al probar las 56 parejas de cebadores diseñadas, 16 no amplificaron en todos o la mayoría de individuos, a pesar de los intentos de optimización de la reacción de amplificación. De las 40 parejas con amplificación exitosa, 27 dieron lugar a patrones polimórficos y 13 a patrones monomórficos en geles de agarosa al 3% en 0,5xTBE. Siguiendo la clasificación de Chambers y MacAvoy (2000) estos microsatélites se clasificaron en puros (7), puros interrumpidos (17) y compuestos interrumpidos (3). Excepto uno de los *loci* (CeATC2-62), todos presentaron el motivo para el cual se realizó la genoteca (Tabla 2.1).

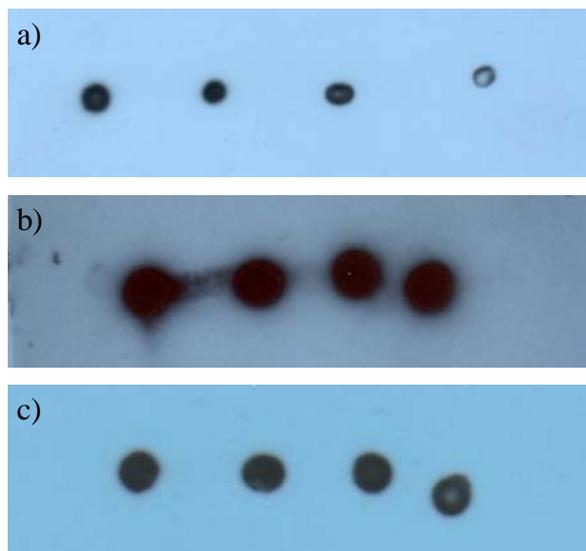


Figura 2.2. Hibridación *dot-blot* con las sondas $(AC)_{10}$ (a), $(CT)_{10}$ (b) y $(ATC)_7$ (c)

En 12 de los 27 *loci* polimórficos identificados en geles de agarosa se determinó el tamaño de los alelos en un secuenciador automático. La Tabla 2.2 muestra las características de los 12 *loci* caracterizados en una muestra de 30 individuos de OS. En esta localidad, el número de alelos por *locus* osciló entre 3 y 17, el tamaño de los alelos entre 108 y 387 pb y los valores de heterozigosidad observada y esperada entre 0,024-0,900 y 0,399-0,885, respectivamente. Siete de los 12 *loci* analizados se encontraron en equilibrio H-W tras aplicar la corrección secuencial de Bonferroni. El análisis con el

Tabla 2.1. Loci microsatélite polimórficos identificados en geles de agarosa

<i>Locus</i>	<i>Motivo</i>	<i>Cebador</i>	<i>T</i>	<i>MgCl₂*</i>	<i>Clasificación</i>
CeATC1-5	(ATC) ₂ GTC(ATC) ₆ (AGC) ₈	F: CGTTCTACCGGCATATGTCAC R: CACCTTCCACCACTAGAAGAAAA	60	1,5	CI
CeATC1-13	(ATG) ₃ ATA(ATG) ₃	F: GCCAATGTCCTTAGGCCTACTA R: CGAAAGAAGCGTCCAAGTAA	58,5	1,5	PI
CeATC1-15	(TCA) ₅ CCA(TCA) ₃	F: AAAATGGGCATAGCATCAGG R: GCAAAATCGTCAACCATGAA	60	1,5	PI
CeATC1-22	(GAT) ₇	F: CAAACCTGACCGGGTTTATT R: TGACTCCACTTTTTTCAGTTCCA	60	2,5	P
CeATC1-36	(GAT) ₅ GTT(GAT) ₂	F: GACATGACAAACAGGCCTCA R: TGGCCTGGTCTTATTCCAC	57	1,5	PI
CeATC1-48	(CAT) ₃ TAT(CAT) ₅	F: CTTTTTGGTGCAACTAGTAA R: GACTTGGAGAGAGTAATCC	52,5	2,5	PI
CeATC1-52	(ATC) ₃ (AGC) ₂ ATGGTATA(ATC) ₆ ACCATA(ATC) ₄ ATT(ATC)ATT(ATC)	F: AATCTGATTTTGCCACCTCT R: AGCTCATAGGAGTTGTATACGTAAG	56	1,5	PI
CeATC1-54	(ATC) ₅	F: TACAAGGCCGAGAACTGCT R: CAATGACTGCCAAATGAGGA	60	2,5	P
CeATC1-59	(ATG) ₂ GTG(ATG) ₅ GTG(ATG) ₂ GAG(ATG) ₅ GTG(ATG) ₂	F: CTATATGCTCAAACCTGTCC R: ACAACATTTTCTACCTTTGA	49	1,5	PI
CeATC1-64	(ATG) ₉ (ATA) ₂ CTT(ATG) ₂ ATAACACTA(ATG) ₇	F: AAGATGCCGAAACTGATGAT R: CAAGTGTTCAGGTATGGTATAGGC	58	1,5	PI
CeATC1-72	(TGA) ₂ CGA(TGA) ₃ TGG(TGA) ₂ N ₂₁ (TGA) ₄	F: ATTGGCGGGAAGATGTATGT R: CTATCCCAAAACCTTCACG	60	1,5	PI
CeATC1-99	(GAT) ₃ GGTGATAAT(GAT) ₅	F: CTTGTTTATGATAATTTAAGGGATGA R: TTGACATGAACAACTTGCAAAC	57	1,5	PI
CeATC2-4	(GAT) ₄ AATGAA(GAT) ₂ N ₁₅ (GAT) ₆	F: TGGAAATGCATTTCATTGAGC R: CCGATTGCGTCTTTTGATCT	60	1,5	PI
CeATC2-10	(ATG) ₇ ATA(ATG) ₂ TAG(ATG) ₈	F: GCTGCTCCAGAGATTTTGG R: TCCTGAACTGTTGCTGCTGT	60	1,5	PI

Tabla 2.1. (continuación)

<i>Locus</i>	Motivo	Cebador	T	MgCl₂*	Clasificación
CeATC2-11	(ATG) ₂ AC(ATG) ₂ AG(ATG) ₄	F: TGGTGTGCAATTAGATGCTTG R: TAGGCTCGCAGAAAGATGGT	60	1,5	PI
CeATC2-12	(GAT) ₈	F: GCGCTCTCGACTAGACAACC R: CATTGGACTCGTCTCTCCAAG	60	2,5	P
CeATC2-32	(ATG) ₂ GTG(ATG) ₅ ATAGTG(ATG) ₂ AAGATGAAG(ATG) ₃ GTG(ATG) ₂	F: ATGCTCAAACGTGCCATGAT R: CTGTTTGATGCTCTCCAGATG	60,5	1,5	PI
CeATC2-34	(TCA) ₂ ATAATTCTA(TCA) ₇	F: GCCATAGAGGCCACCTATT R: GGGCTGACAAGATTTGACATT	60	1,5	PI
CeATC2-41	(TGA) ₄ (TGC) ₂ AGA(TGG) ₂ (TGA) ₅ (TGC) ₂ AGATGG(TGA) ₃	F: CGTTTATCTTTATCCGAACG R: TGCGGCATATCAAGTACAAT	57	1,5	PI
CeATC2-44	(TGA) ₇	F: CCCGGAGAATCTCTTCCCTCT R: CGCAAGAAAAGTCAAGGGGTA	60	1,5	P
CeATC2-46	(TGA)TGGTAA(TGA) ₃ TGGTAA(TGA) ₃ TGGTAA(TGA)	F: ACCAAGGCAGATATCGATCC R: TCCAGTTTTAAACGCACTCTGA	60	1,5	PI
CeATC2-49	(CAT) ₅	F: TGAAGATCTCGGTGGAAATGT R: ATGCCACCATTCTCCACTC	60	1,5	P
CeATC2-51	(AAC)AAT(AAC) ₃ AAA(AAC) ₉ (ATC) ₅ CTC(AAC) ₂	F: GGGATCTCGTTTTATCCCAA R: CTCATCATTATGTGATCTTACCTG	60	2,5	CI
CeATC2-62	(TG) ₇	F: AGGCAGCAACCCAATTAGTG R: CAAAGGTTTCCACAGGTCGT	60	1,5	P
CeATC2-65	(CAT) ₅	F: GGGGAGAGGCCTGATAAAAT R: TTCCTGAGGATGATGGGAAG	60	1,5	P
CeATC2-71	(GAT) ₃ GACGATACG(GCT) ₂ (GAT) ₃ AAT(GAT) ₅	F: TCGTTGTCGTCGTCATCATT R: GTCTGTATGCGGTGATGGTG	60	1,5	PI
CeATC2-96	(GTT) ₄ GCT(GTT) ₄ (GAT) ₅ GGT(GTT) ₃ (GAT) ₅ (GTT) ₂₃	F: TCTCCCGAGAGCAGTTTTGT R: CGAAATGAAACGAAATGAAACA	60	1,5	CI

T: temperatura de hibridación (°C); (*): concentración de MgCl₂ (mM); P: puro; PI: puro interrumpido; CI: compuesto interrumpido

programa MicroChecker reveló la existencia de alelos nulos en cinco de los 12 *loci* caracterizados (CeATC1-5, CeATC2-4, CeATC2-12, CeATC2-46 y CeATC2-51), variando su frecuencia entre 0,127 y 0,345. Ninguno de los *loci* presentó evidencias de desequilibrio de ligamiento tras la corrección secuencial de Bonferroni.

Tabla 2.2. Características de los 12 marcadores microsatélite analizados en la localidad de Oostershelde

<i>Locus</i>	<i>Na</i>	<i>R</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>AN</i>
CeATC1-5	15	195-252	0.400**	0.843	0.235
CeATC1-22	8	135-187	0.900	0.786	-
CeATC1-36	6	135-151	0.367	0.404	-
CeATC1-52	10	130-178	0.633*	0.788	-
CeATC1-54	13	108-282	0.733	0.807	-
CeATC2-4	14	155-263	0.633**	0.885	0.127
CeATC2-11	17	122-366	0.767	0.877	-
CeATC2-12	6	114-141	0.133**	0.743	0.345
CeATC2-34	7	156-191	0.667	0.729	-
CeATC2-44	6	125-141	0.667	0.704	-
CeATC2-46	3	179-387	0.024**	0.399	0.266
CeATC2-51	7	130-160	0.433**	0.749	0.175

Na: número de alelos; *R*: rango de tamaño de los alelos en pares de bases; *Ho*: heterozigosis observada; *He*: heterozigosis esperada insesgada de Nei; *AN*: frecuencia de alelos nulos; (*): significativo para un $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

El diseño de PCRs *multiplex* se realizó en base a los valores de heterozigosis observada y número y rango de tamaño de los alelos obtenidos en una muestra constituida por 368 individuos de las localidades de AV, SS, BR, CO, FE y OS (Anexos A y B), descartándose los *loci* con alelos nulos a frecuencias próximas o mayores a 0,2 (CeATC1-5, CeATC2-12 y CeATC2-51) y amplificación dificultosa (CeATC2-46). La combinación de *loci* más adecuada ofrecida por el programa Multiplex Manager agrupó los ocho *loci* microsatélite considerados en dos reacciones de amplificación: una incluyó los *loci* CeATC1-22, CeATC1-54, CeATC2-4 y CeATC2-11 y la otra los *loci* CeATC1-36, CeATC1-52, CeATC2-34 y CeATC2-44 (Figura 2.3). Tras optimizar la concentración de los cebadores, todos los alelos de los *loci* combinados en cada PCR *multiplex* amplificaron satisfactoriamente y pudieron ser diferenciados sin ambigüedad

por el color del fluorocromo (Figura 2.4). La Tabla 2.3 indica la concentración óptima de cebadores para cada *locus* y los fluorocromos empleados.

Tabla 2.3. Características de las PCRs *multiplex* optimizadas

PCR <i>multiplex</i> 1/Locus	Cebadores (μM)	Fluorocromo
CeATC1-22	0,3	PET
CeATC1-54	0,15	NED
CeATC2-4	0,15	VIC
CeATC2-11	0,15	6-FAM
PCR <i>multiplex</i> 2/Locus		
CeATC1-36	0,15	6-FAM
CeATC1-52	0,075	VIC
CeATC2-34	0,25	PET
CeATC2-44	0,10	NED

2.4. Discusión

En este trabajo se desarrollaron los primeros marcadores microsatélite para el berberecho *C. edule*. Se caracterizó un panel de 12 *loci* polimórficos no ligados que podrán ser utilizados en futuros estudios genéticos en esta especie, pero también se aporta un panel adicional de 15 *loci* presumiblemente también polimórficos que, tras la caracterización de los alelos, podrá incrementar el número de marcadores microsatélite disponibles en este berberecho. Además se optimizaron dos PCRs *multiplex* que permiten la amplificación simultánea de cuatro *loci*, reduciendo el coste y el tiempo de análisis.

Los marcadores microsatélite se obtuvieron a partir de una genoteca enriquecida utilizando como sonda (ATC)₇, seleccionada tras análisis *dot-blot* con diferentes sondas di-, tri- y tetranucleotídicas. En estos análisis, las sondas (AC)₁₀, (CT)₁₀ y (ATC)₇ mostraron la mayor intensidad de hibridación lo que significa que, de los motivos examinados, las repeticiones (AC)_n, (CT)_n y (ATC)_n deben ser las más abundantes en el genoma de la especie. Esta observación está en consonancia con los resultados

derivados del análisis de 3 Mb del genoma del mejillón *Mytilus galloprovincialis*, donde la repetición (AC)_n es la más abundante y (CT)_n también está presente (Cruz *et al.*, 2005), pero destaca la abundancia de la repetición trinucleotídica (ATC)_n cuando en la mayoría de eucariotas las repeticiones de dinucleótidos son las más frecuentes (Toth *et al.*, 2000). En términos generales, tanto los motivos microsatélite como su abundancia relativa difieren incluso entre especies estrechamente relacionadas (Ross *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2007), por lo que antes de abordar el aislamiento de microsatélites es aconsejable examinar la riqueza relativa de diferentes motivos en el genoma.

De los tres motivos que resultaron más abundantes en el análisis *dot blot*, se optó por construir la genoteca enriquecida para el trinucleotídico ATC. Los motivos dinucleotídicos son más abundantes (Chistiakov *et al.*, 2006), más polimórficos (Chakraborty *et al.*, 1997) y en principio más fáciles de aislar que los tri- y tetranucleotídicos, sin embargo, tienen una elevada propensión a generar bandas tartamudas (Schlötterer, 1998). Estas bandas se originan por deslizamientos de cadena durante la amplificación por PCR y difieren de la secuencia molde original en múltiplos de longitud de la unidad de repetición (Shinde *et al.*, 2003), dificultando la asignación de alelos. Por otra parte, las repeticiones de trinucleótidos se encuentran tanto en regiones codificantes como no codificantes a altas frecuencias, a diferencia de los microsatélites di- y tetranucleotídicos que son menos frecuentes en las regiones codificantes debido probablemente a la selección contra mutaciones de cambio de pauta de lectura (Metzgar *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2002).

La tasa de éxito en el aislamiento de secuencias microsatélite obtenida en este trabajo fue del 73%, lo que equivale o supera a valores descritos en otros estudios. El método tradicional de aislamiento de microsatélites proporciona un rendimiento en clones positivos de entre el 0,04% y el 12% (Zane *et al.*, 2002), mientras que la construcción de genotecas enriquecidas en otros bivalvos incluye tasas de éxito del 70% en la almeja *Coelomactra antiquata* (Li *et al.*, 2008), 66% en la especie *Atrina pectinata* (Liu *et al.*, 2009) o 63% en el mejillón de agua dulce *Cristaria plicata* (Jia *et al.*, 2010). Al utilizar métodos de enriquecimiento combinados con NGS, la tasa de éxito (medida como número total de microsatélites identificados x 100/ número total de lecturas) fue del 16% en la abeja *Apis mellifera* (Malausa *et al.*, 2011) o del 7% en el nematodo

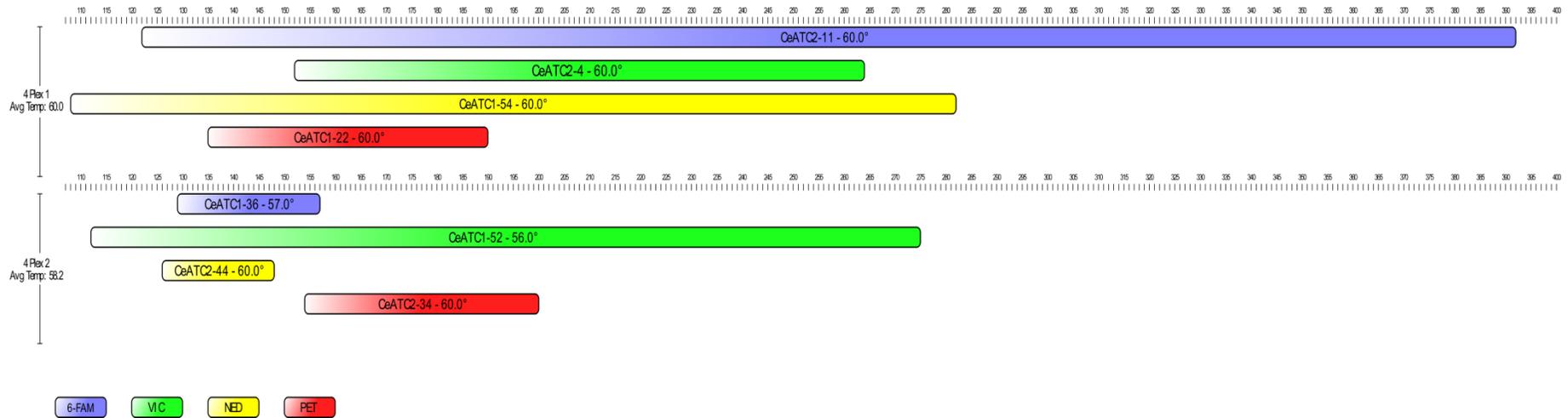


Figura 2.3. Distribución de ocho *loci* microsatélite en dos PCRs *multiplex*. La longitud de las bandas es proporcional al rango de tamaño de los alelos

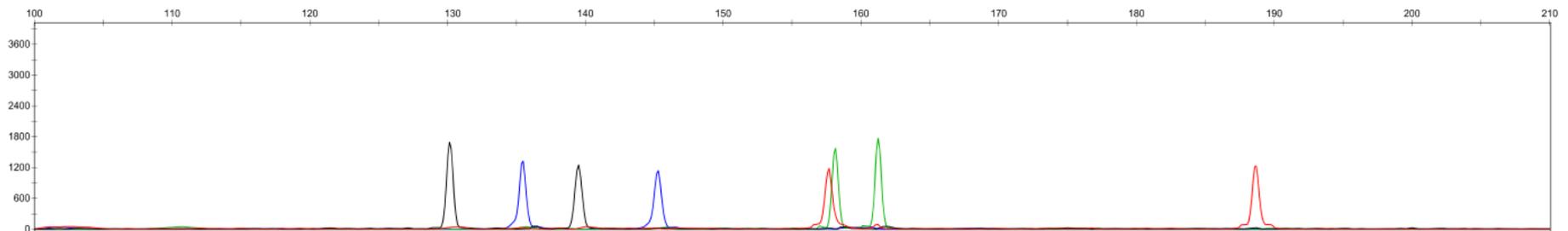


Figura 2.4. Cromatograma de cuatro *loci* microsatélite coamplificados mediante PCR *multiplex*

Deladenus siricidicola (Santana *et al.*, 2009). Las diferencias son todavía más marcadas cuando se compara con métodos basados en la construcción de genotecas de ESTs de bivalvos combinada con secuenciación Sanger o NGS, para los que se han descrito valores inferiores al 2% (Tanguy *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2011) debido a la menor frecuencia de microsatélites en la fracción codificante de los genomas (Metzgar *et al.*, 2000). No obstante, hay que tener en cuenta que la tasa de éxito alcanzada depende del criterio utilizado para considerar una secuencia repetitiva como microsatélite, que es más estricto cuando se utiliza NGS.

Uno de los principales problemas asociados a la construcción de genotecas enriquecidas es la presencia de un alto número de secuencias redundantes debido a la amplificación preferencial de determinadas repeticiones durante las reacciones de PCR necesarias para el enriquecimiento (Scotti *et al.*, 2002). En este estudio, la tasa de redundancia obtenida fue del 10%, lo que resulta del orden o inferior a los valores obtenidos en otros estudios de bivalvos en los que se utilizaron métodos enriquecidos: 13% en la zamburiña *Mimachlamys varia* (Arias *et al.*, 2011a) o 12 y 30% en la almeja *Venerupis rhomboides* (Chacón *et al.*, 2013).

Todos los microsatélites que resultaron polimórficos en geles de agarosa (27) presentaron el motivo para el cual se enriqueció la genoteca excepto uno (CeATC2-62), constituido por la unidad de repetición GT. La mayoría se caracterizaron por estar interrumpidos y tres *loci* se clasificaron como compuestos. Se espera que los microsatélites puros presenten mayor polimorfismo que los interrumpidos, ya que la presencia de bases que interrumpen la repetición reduce la posibilidad de apareamientos incorrectos, estabilizando las repeticiones y dando como resultado un menor polimorfismo (Pépin *et al.*, 1995; Schlötterer, 1998). Sin embargo, en los microsatélites caracterizados en *C. edule* no se observa esta relación, dado que el mayor número de alelos lo presentaron tres *loci* (CeATC1-5, CeATC2-4 y CeATC2-11) con microsatélites interrumpidos. La presencia de este tipo de microsatélites podría estar relacionada con la dinámica cíclica de evolución de las secuencias microsatélite. Las interrupciones juegan un papel fundamental en la evolución de todos los tipos de microsatélites, afectando tanto a las repeticiones puras como a las compuestas y complejas. Se producen en el interior de las repeticiones debido sobre todo a

sustituciones, pero también a inserciones o deleciones de pequeño tamaño, y preferentemente en los extremos de la secuencia microsatélite (Brohede y Ellegren, 1999; Buschiazzi y Gemmell, 2006). Inicialmente, estas interrupciones dan estabilidad a los microsatélites, lo que acarrea una pérdida de polimorfismo (Balaresque, 2007). Con el tiempo, la acumulación de interrupciones rompe totalmente el patrón repetitivo, dando lugar a una mezcla compuesta por segmentos cortos del bloque original de repeticiones, que puede evolucionar hacia la desaparición o el renacimiento del microsatélite (Buschiazzi y Gemmell, 2006).

Cuatro de los *loci* caracterizados presentaron frecuencias elevadas ($\sim 0,20$) de alelos nulos. Estos alelos se deben a mutaciones en las regiones flanqueantes a los microsatélites que impiden la hibridación de los cebadores, provocando la ausencia de amplificación en el caso de individuos homocigotos y el genotipado de individuos heterocigotos como homocigotos. Aunque no se ha encontrado relación entre la frecuencia de alelos nulos y la longitud o la complejidad del motivo microsatélite (Li *et al.*, 2003), los organismos con tamaños efectivos altos, como los moluscos, se caracterizan por presentar frecuencias particularmente altas de estos alelos (McGoldrick *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003; Astane *et al.*, 2005; Carlsson *et al.*, 2006; Chapuis y Estoup, 2007). La presencia de alelos nulos a frecuencias elevadas ($>0,20$) puede provocar una sobreestimación de los niveles de diferenciación genética en casos de bajo flujo génico y afectar a los análisis de genética de poblaciones que se basan en la existencia de equilibrio H-W (Chapuis y Estoup, 2007; Carlsson, 2008). Si bien existen diferentes procedimientos estadísticos que permiten corregir los datos de genotipado para la presencia de alelos nulos (Van Oosterhout *et al.*, 2004; Chapuis y Estoup, 2007), en este estudio se optó por excluirlos de las PCRs *multiplex* con el fin de simplificar los análisis a gran escala.

A pesar de que la PCR *multiplex* es una técnica de biología molecular de uso ampliamente extendido y de que los microsatélites son especialmente idóneos para ser coamplificados por su pequeño tamaño, el desarrollo de PCRs *multiplex* para el genotipado de estos marcadores en bivalvos se limita a unos pocos casos (Taris *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010; Mura *et al.*, 2012; Borrell *et al.*, 2014). El uso de PCR *multiplex* conlleva varias ventajas respecto a la amplificación *monocus*, incluyendo

una menor cantidad de ADN molde. Este ahorro puede ser esencial cuando el material de partida es escaso, abriendo la posibilidad de realizar estudios adicionales o análisis complementarios sobre las muestras utilizadas (Persson *et al.*, 2005). La reducción en la cantidad de ADN molde implica también una menor manipulación de las muestras a analizar, disminuyendo con ello el riesgo de contaminación de las mismas. Por otro lado, la PCR *multiplex* permite identificar los falsos negativos debidos a fallos en la reacción, ya que cada amplicón constituye un control interno para los demás fragmentos amplificados (Edwards y Gibbs, 1994). Además, el gasto en reactivos, especialmente ADN polimerasa, y el tiempo de preparación disminuyen considerablemente al reducirse el número de tubos y el dispensado de los componentes de la reacción de amplificación. Las dos PCRs *multiplex* desarrolladas en este trabajo facilitan el análisis de ocho marcadores microsatélite al reducir a dos las amplificaciones necesarias, aumentando la eficacia del genotipado de muestras amplias en *C. edule*.

**Capítulo 3. Diversidad genética y estructura
poblacional en la región noroeste
de la Península Ibérica**

3.1. Introducción

España es el principal país productor de moluscos bivalvos en Europa. Las zonas productoras más importantes se concentran sobre todo en Galicia, donde el marisqueo y la acuicultura constituyen actividades de las que depende, directa o indirectamente, la economía de muchas localidades costeras. En el año 2013, el valor económico de los moluscos bivalvos subastados en las lonjas gallegas superó los 50 millones de euros por la venta de más de 6800 t de producción (Xunta de Galicia, 2014). *C. edule*, junto con las almejas autóctonas, *Ruditapes decussatus* (almeja fina), *Venerupis pullastra* (almeja babosa) y *V. rhomboides* (almeja rubia) y la almeja introducida *Ruditapes philippinarum* (almeja japonesa), constituyen los moluscos sometidos a marisqueo más destacados, tanto por el volumen de capturas como por los beneficios económicos que generan.

Atendiendo a los datos de primera venta facilitados por la Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia (2014), la producción de *C. edule* en el periodo comprendido entre 1997 y 2013 osciló entre 1172 y 5024 t/año (Figura 3.1), lo que supone una media de 3167,7 t/año, muy inferior a la recopilada en el período 1961-1977 (11850 t/año, Molares *et al.*, 2008). Las oscilaciones observadas pueden deberse a diferentes causas, pero se ha detectado una correlación significativa y de signo negativo entre las ventas en lonja de este recurso y las precipitaciones (Molares *et al.*, 2008), relacionada con riadas provocadas por lluvias intensas que causan mortalidades masivas en los bancos marisqueros situados en las desembocaduras de los ríos más caudalosos. Aunque la producción no se recuperó de un descenso brusco ocurrido en 1978 (~70%, Molares *et al.*, 2008), la productividad del berberecho en los últimos 17 años (Figura 3.1) sólo ha sido superada puntualmente por otras especies con estrategias de manejo similares (1998 y 2001 por *V. pullastra*; 2012 y 2013 por *R. philippinarum*) y los beneficios económicos generados llegaron a alcanzar en los años 2006, 2007 y 2011 valores superiores a los de otras especies con precios de mercado mucho más altos (Figura 3.2).

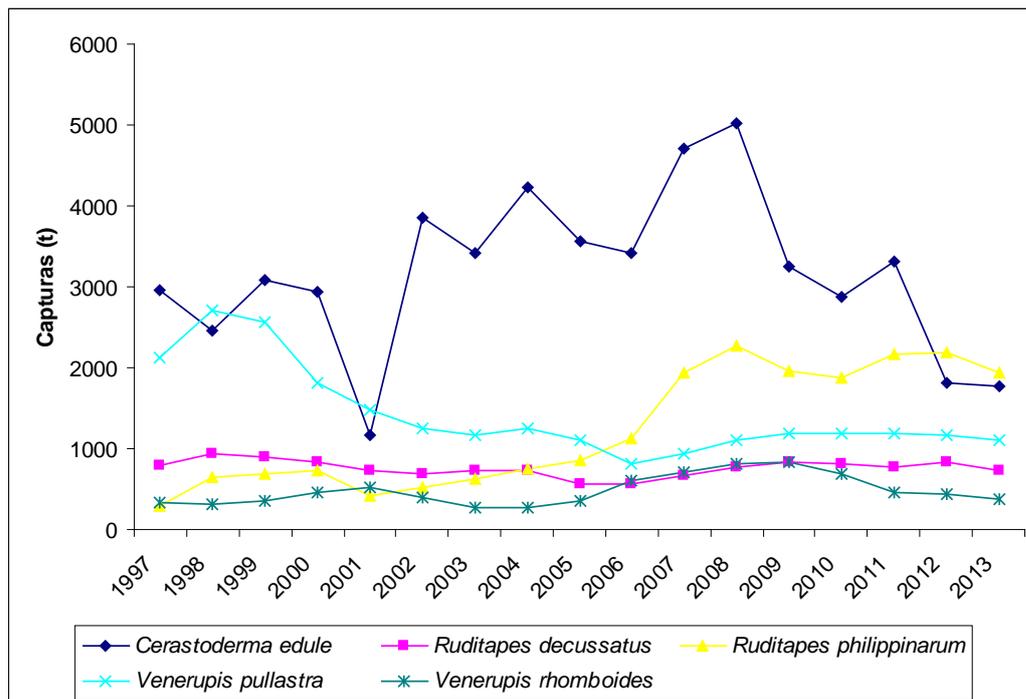


Figura 3.1. Capturas de *C. edule*, *R. decussatus*, *R. philippinarum*, *V. pullastra* y *V. rhomboides* en Galicia entre los años 1997 y 2013 según los datos de primera venta registrados por la Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia

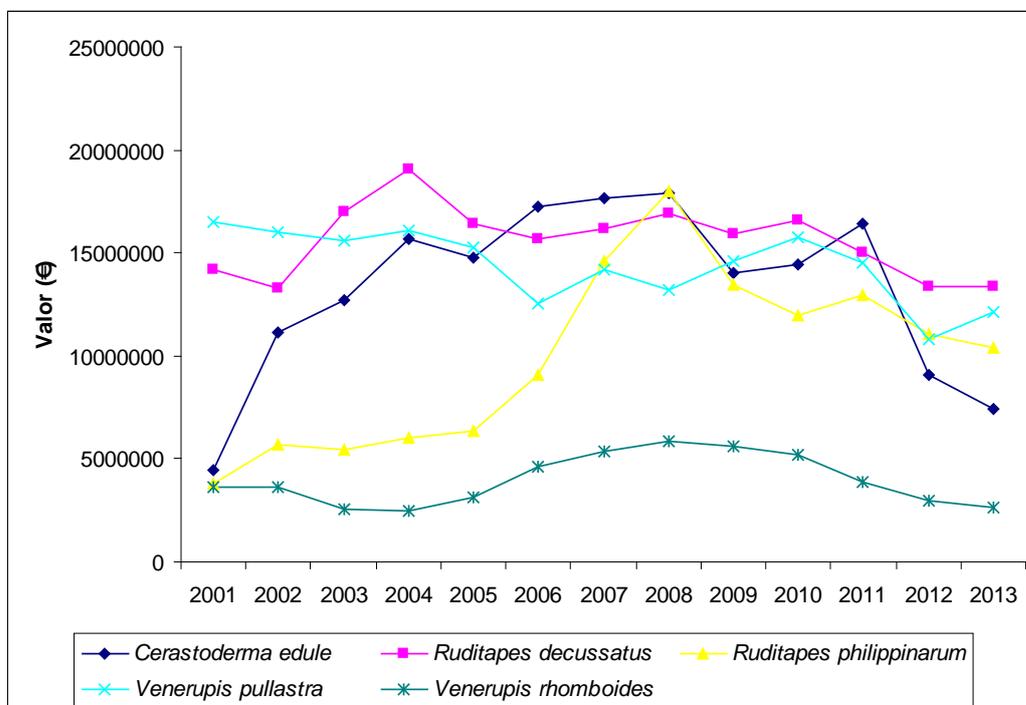


Figura 3.2. Valor económico en primera venta de *C. edule*, *R. decussatus*, *R. philippinarum*, *V. pullastra* y *V. rhomboides* en Galicia entre los años 2001 y 2013 según los datos registrados por la Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia

La producción de berberecho proviene de procesos extractivos de poblaciones naturales, pero éstos pueden acompañarse de operaciones de cultivo que incluyen aprovisionamiento y siembra de semilla salvaje, rareo de la población cuando la densidad es excesiva, traslado de individuos, recuperación de zonas improductivas, cuidado y oxigenación del sustrato, eliminación de algas y control de los depredadores. La extracción se realiza a pie con artes manuales, removiendo el sedimento con *sacho* o *angazo*, o desde pequeñas embarcaciones con sencillas artes de arrastre (*raño*, *rastro* o *gancha*). La extracción del berberecho, al igual que la de otros moluscos, está regulada por normas y orientaciones recogidas en un Plan General de Explotación Marisquera aprobado anualmente por la Consellería correspondiente de la Xunta de Galicia. En la elaboración del plan intervienen técnicos de la Consellería y entidades asociativas del sector (asociaciones de mariscadores y cofradías de pescadores) que presentan planes de explotación en los que cada entidad indica las especies de interés, el ámbito de explotación, número de participantes, calendario de explotación, topes de captura, artes a emplear, puntos de control, puntos de venta y acciones a realizar (recuperación de zonas improductivas, extracción de semilla, siembras, traslados, rareos y limpiezas).

Los objetivos de los planes de explotación son asegurar una explotación sostenible de los recursos pesqueros y alcanzar una mayor rentabilidad económica. Sin embargo, para mantener la productividad de las poblaciones sometidas a explotación, es crucial incorporar consideraciones genéticas (Allendorf *et al.*, 2008). Las especies sometidas a altos niveles de explotación sufren pérdidas de un número importante de individuos durante periodos de tiempo prolongados. Esto conlleva inevitablemente cambios genéticos en las poblaciones naturales que disminuyen su capacidad de recuperación a la sobreexplotación y aumentan el riesgo de extinción de la especie (Olsen *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2006).

Uno de los riesgos potenciales de la explotación es la pérdida de variación genética de las poblaciones naturales, un componente esencial de la biodiversidad que incrementa la probabilidad de supervivencia a enfermedades y que permite la adaptación y diversificación ante posibles cambios ambientales (King *et al.*, 2007; Saura y Faria, 2011). Para conseguir una explotación sostenible debe conocerse qué constituye la población explotada y cómo está delimitada genéticamente (Waples y Gaggiotti, 2006;

Palsbøll *et al.*, 2007), ya que el mantenimiento de la productividad de la especie a largo plazo depende de la conservación de todas las poblaciones, incluso las menos productivas (Hilborn *et al.*, 2003). Cuando los individuos sometidos a explotación constituyen una mezcla de varias poblaciones, puede producirse la eliminación de alguna de ellas. Por otro lado, si la población bajo explotación forma parte de un área geográfica mayor conectada a través de la migración, una explotación desigual podría cambiar los patrones de migración entre poblaciones, de forma que la región afectada sería mayor de la esperada inicialmente. La reducción del tamaño poblacional de una población causada por la explotación podría provocar una disminución en el número de migrantes, lo que produciría un aumento de la deriva y pérdida de variación genética. Igualmente, podría producirse un aumento de la llegada de migrantes a la población sobreexplotada desde otras poblaciones cercanas cuyo nivel de explotación fuese menor, produciéndose una saturación de la población receptora y la pérdida de las adaptaciones locales (Allendorf *et al.*, 2008).

Otra de las principales consecuencias de la explotación son los cambios genéticos debidos a la selección generada por la propia explotación. En las poblaciones naturales la explotación no se realiza al azar, sino que suele ser dependiente del fenotipo (Law, 2007); los individuos con características fenotípicas comercialmente deseables presentan una mayor probabilidad de ser recogidos de la población natural. Esta explotación selectiva debe evitarse en lo posible dado que, si el fenotipo deseable posee una base genética, conllevará cambios genéticos a nivel de la población natural, incluyendo el descenso de la frecuencia de esos fenotipos así como el de la productividad de la población (Allendorf *et al.*, 2008).

Debido a que cierto grado de cambio genético es inevitable, es importante desarrollar planes de gestión basados en el análisis genético de las poblaciones que minimicen los potenciales efectos dañinos de la explotación (Kuparinen y Merilä, 2007; Schwartz *et al.*, 2007; Allendorf *et al.*, 2008). Estos programas deben tener en cuenta la estructura genética de la especie, por la importancia de la gestión individual de las poblaciones aisladas reproductivamente. También deben mantener el tamaño efectivo de las poblaciones en un valor superior a un umbral por debajo del cual la pérdida de variación genética puede tener efectos perjudiciales aunque el tamaño censal de la población siga

siendo elevado. Además, deben buscar minimizar el efecto de la explotación selectiva, bien reduciendo los niveles de explotación, bien incluyendo todas las clases de edad y tamaño en las capturas. El diseño de estos programas de gestión puede verse muy beneficiado por la monitorización genética de muestras recogidas a lo largo del tiempo, ya que la detección temprana de los cambios genéticos potencialmente perjudiciales permitiría el diseño y aplicación de programas de gestión que frenasen o invirtiesen los efectos producidos por la explotación antes de que el cambio fuese sustancial o incluso irreversible.

En este capítulo se lleva a cabo un estudio con marcadores microsatélite a una escala geográfica reducida incluyendo berberechos de cuatro rías de Galicia y una de Portugal, no incluida en los planes de explotación de la costa gallega, para proporcionar estimas de diversidad genética y estructura poblacional que contribuyan a conocer las características genéticas de áreas productivas destacadas y sirvan de referencia para futuros programas de monitorización genética que complementen la gestión del recurso.

3.2. Material y métodos

3.2.1. Material de estudio y extracción de ADN

Los individuos de *C. edule* analizados fueron los recogidos en las rías gallegas de Ferrol (FE), Corcubión (CO), Arousa (BR) y Vigo (SS) y en la portuguesa de Aveiro (AV) (Figura 2.1).

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de músculo aductor según Fernández-Tajes y Méndez (2007) como se indica en el apartado 2.2.1.

3.2.2. Análisis de marcadores microsatélite

Se analizaron 11 *loci* microsatélite (CeATC1-5, CeATC1-22, CeATC1-36, CeATC1-52, CeATC1-54, CeATC2-4, CeATC2-11, CeATC2-12, CeATC2-34, CeATC2-44 y

CeATC2-51), realizándose la amplificación por PCR *monocus* e identificándose los alelos como se describe en el apartado 2.2.6.

El número de alelos (N_a), la heterozigosidad observada (H_o) y la heterozigosidad esperada (H_e) insesgada de Nei (1978) se obtuvieron con el programa Genetix v.4.03 (Belkhir *et al.*, 2004). Los valores de riqueza alélica (R_s) por *locus* y por combinación *locus*-localidad se calcularon usando el programa Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). También se analizó la existencia de correlación entre la frecuencia de alelos privados en cada localidad y el tamaño muestral utilizando el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc.). El mismo programa se utilizó para testar la existencia de diferencias significativas entre los valores de heterozigosidad y riqueza alélica de las localidades mediante un test de Friedman.

Los tests para determinar la bondad de ajuste al equilibrio H-W y a las condiciones de equilibrio de ligamiento se llevaron a cabo con el programa Genepop v.4.0. (Rousset, 2008). La significación se determinó mediante el método de cadena de Markov utilizando 10000 *dememorizations*, 5000 *batches* y 5000 iteraciones por *batch*. Con el programa Genetix v.4.03 se calculó el coeficiente de endogamia (F_{is}) de Weir y Cockerham (1984) por *locus*, localidad y combinación *locus*-localidad. La presencia de alelos nulos se detectó empleando el programa Microchecker (Van Oosterhout *et al.*, 2004) y su frecuencia se estimó según el método de Brookfield I (Brookfield, 1996). Cuando se llevaron a cabo tests estadísticos múltiples, los valores de significación se ajustaron utilizando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

La neutralidad de los marcadores microsatélite utilizados se evaluó con el test de homocigosidad de Ewens–Watterson (Watterson, 1978; Watterson, 1986) y el test exacto de Ewens-Watterson-Slatkin (Slatkin, 1994; Slatkin, 1996) implementados en el programa Arlequin v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

Se utilizó el programa Genetix v.4.03 para calcular el índice de fijación (F_{st}) de Weir y Cockerham (1984) por *locus*, por pares de localidades y global. Con el mismo programa se determinó la probabilidad de significación de los valores F_{st} mediante un método no paramétrico basado en permutaciones (10000 permutaciones). Dado que los valores de

F_{st} dependen en gran medida de los niveles de variación genética, la interpretación y comparación del nivel de diferenciación genética entre los diferentes *loci* y estudios resulta complicada, por lo que se calculó una medida estandarizada de F_{st} (F_{st}') siguiendo el método de Hedrick (2005) utilizando el programa Recodedata v.0.1. (Meirmans, 2006). Los valores de F_{st} por pares de localidades se representaron gráficamente mediante un escalamiento multidimensional no métrico (nMDS) obtenido mediante el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc.). A partir de los valores de F_{st} se obtuvieron estimas del número de migrantes por generación (Nm) entre pares de localidades con el programa GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006). También se analizó la diferenciación génica entre pares de localidades mediante el programa Genepop v.4.0. En caso de realizarse tests estadísticos múltiples, los valores de significación se ajustaron mediante la corrección secuencial de Bonferroni.

La estructura poblacional de las localidades muestreadas se analizó además con Structure v.2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Este programa determina el número de grupos genéticamente homogéneos (K) utilizando una aproximación bayesiana con métodos de cadena de Markov Monte Carlo para estimar la probabilidad de los datos para valores de K determinados por el usuario. Las simulaciones se realizaron utilizando modelos con y sin ascendencia mixta, empleando el origen de los individuos como información *a priori* y con frecuencias alélicas correlacionadas e independientes.

El programa Arlequin v.3.11 se empleó para realizar un análisis molecular de la varianza (AMOVA) *locus* por *locus* (10000 permutaciones), que utiliza permutaciones *bootstrapped* de los datos para testar un escenario hipotético de estructura genética poblacional definida por el usuario. El AMOVA permite evaluar el componente de diversidad genética atribuible a la varianza entre grupos (considerando diferentes agrupaciones de localidades), a la varianza entre localidades dentro de los grupos y a la varianza dentro de las localidades.

3.3. Resultados

3.3.1. Diversidad genética

Los 11 *loci* microsatélite analizados en muestras de al menos 41 individuos fueron polimórficos en todas las localidades (Anexo A). La Tabla 3.1 recoge los valores de los índices de diversidad estimados. El número de alelos por *locus* varió desde siete (CeATC2-44) hasta 45 (CeATC2-11). La heterozigosidad esperada insesgada de Nei por *locus* osciló entre 0,373 (CeATC1-36) y 0,939 (CeATC1-5), y la heterozigosidad observada entre 0,248 (CeATC2-12) y 0,830 (CeATC2-11). Los valores de riqueza alélica por *locus* variaron entre 6,984 (CeATC2-44) y 42,572 (CeATC2-11). Del total de 221 alelos identificados, 43 fueron privados (Tabla 3.2), con frecuencias siempre inferiores a 0,05; el número mínimo fue de cuatro en CO y el máximo de 12 en BR y AV. No se detectó la existencia de correlación significativa entre el número de alelos privados por localidad y el tamaño muestral ($F_{[1,3]}=4,377$, $P=0,128$, $R^2_{adj}=0,458$).

Tabla 3.1. Valores globales de diversidad genética, tamaño del alelo más común y coeficiente de endogamia para cada *locus*

	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Rs</i>	<i>A_C</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>Fis</i>
CeATC1-5	247	33	32,681	207	0,939	0,631	0,328
CeATC1-22	254	10	9,924	175	0,784	0,799	-0,019
CeATC1-36	252	8	7,932	144	0,373	0,325	0,128
CeATC1-52	236	26	26,000	136	0,812	0,775	0,045
CeATC1-54	272	31	29,883	154	0,809	0,610	0,246
CeATC2-4	263	15	14,791	172	0,633	0,430	0,321
CeATC2-11	277	45	42,572	214	0,894	0,830	0,071
CeATC2-12	238	17	16,911	123	0,728	0,248	0,660
CeATC2-34	268	14	13,505	191	0,746	0,702	0,060
CeATC2-44	270	7	6,984	135	0,636	0,607	0,045
CeATC2-51	255	15	14,920	151	0,812	0,416	0,489

N: número de individuos; *Na*: número de alelos; *Rs*: riqueza alélica basada en un tamaño muestral mínimo de 236 individuos; *A_C*: tamaño en pares de bases del alelo más común; *He*: heterozigosidad esperada insesgada de Nei; *Ho*: heterozigosidad observada; *Fis*: coeficiente de endogamia

Todas las localidades mostraron valores semejantes de heterozigosidad, tanto esperada como observada, con valores que variaron entre 0,729 (CO) y 0,751 (BR) y entre 0,549 (CO) y 0,602 (BR), respectivamente. Para todas ellas los valores de heterozigosidad esperada fueron superiores a los de heterozigosidad observada. Los valores de riqueza alélica por localidad variaron entre 9,948 para CO y 11,360 para FE (Tabla 3.2). El test de Friedman no mostró diferencias significativas entre localidades para ninguno de los tres parámetros de diversidad analizados (*Rs*, *He* y *Ho*).

Tabla 3.2. Valores de diversidad genética y coeficiente de endogamia por localidad

	AV	SS	BR	CO	FE
<i>N</i>	63	60	64	41	62
<i>Na</i>	143 (12)	133 (5)	134 (12)	116 (4)	149 (10)
<i>Rs</i>	10,600	10,312	10,297	9,948	11,360
<i>He</i>	0,742	0,732	0,751	0,729	0,743
<i>Ho</i>	0,579	0,567	0,602	0,549	0,594
<i>Fis</i>	0,222	0,228	0,200	0,250	0,202

N: número de individuos; *Na*: número de alelos (alelos privados); *Rs*: riqueza alélica basada en un tamaño muestral mínimo de 31 individuos; *He*: heterozigosidad esperada insesgada de Nei; *Ho*: heterozigosidad observada; *Fis*: coeficiente de endogamia

Ninguno de los tests de desequilibrio de ligamiento realizados para todos los pares de *loci* en cada localidad resultó significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni, por lo que puede considerarse que todos los *loci* segregan independientemente. Treinta y cuatro de las 55 combinaciones *locus*-localidad no mostraron desviaciones significativas del equilibrio H-W tras aplicar la corrección secuencial de Bonferroni (Anexo A) y de las 21 combinaciones en desequilibrio, 15 implicaron a localidades gallegas. Cinco de los 11 *loci* se ajustaron al equilibrio H-W en todas las localidades (CeATC1-22, CeATC1-36, CeATC1-52, CeATC2-11 y CeATC2-34), mientras que otros tres (CeATC1-5, CeATC2-12 y CeATC2-51) mostraron desviaciones significativas en todas las localidades. Todas las combinaciones que se desviaron de lo esperado bajo equilibrio H-W presentaron valores del estadístico *Fis* positivos, excepto el *locus* CeATC2-44 en la localidad de AV, donde el valor del estadístico *Fis* fue próximo a cero. Esto se debe a que, aunque las frecuencias globales de homocigotos y heterocigotos no difieren de las esperadas, la distribución de los heterocigotos entre los

diferentes genotipos heterocigotos posibles no se ajusta a lo esperado bajo equilibrio H-W.

Tanto el test de homocigosidad de Ewens–Watterson como el test exacto de Ewens–Watterson–Slatkin detectaron la existencia de desviaciones de la neutralidad para el *locus* CeATC1-5 en tres localidades (AV, SS y BR). El programa Microchecker detectó la presencia de alelos nulos en seis de los 11 *loci* analizados, en tres de ellos (CeATC1-5, CeATC2-12 y CeATC2-51) a frecuencias cercanas o superiores a 0,2 en alguna o todas las localidades analizadas (Tabla 3.3). Teniendo en cuenta que la presencia de alelos nulos a frecuencias superiores a 0,2 puede dar lugar a una sobreestimación del estadístico *Fst* y de la distancia genética (Chapuis y Estoup, 2007), estos tres *loci* fueron eliminados de los análisis posteriores.

Tabla 3.3. Frecuencias de alelos nulos obtenidas con el programa Microchecker siguiendo el método de Brookfield I

Localidad <i>Locus</i>	AV	SS	BR	CO	FE
CeATC1-5	0,136	0,166	0,110	0,192	0,166
CeATC1-54	0,137	0,112	0,070	0,122	0,079
CeATC2-4	0,170	0,135	0,094	0,132	0,071
CeATC2-11	0,062	-	-	0,068	-
CeATC2-12	0,292	0,244	0,299	0,290	0,244
CeATC2-51	0,141	0,219	0,205	0,247	0,267

3.3.2. Estructura poblacional

El valor global del estadístico *Fst* estimado con ocho *loci* fue 0,004, significativamente distinto de cero ($P=0,007$), mientras que el estandarizado *Fst'* fue 0,014. El valor de *Fst* por *locus* varió entre -0,003 (CeATC2-11) y 0,02 (CeATC2-44), resultando dos de ellos significativos para un $\alpha=0,05$ (CeATC1-54 y CeATC2-44) (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Valores *Fst* por *locus* y global

<i>Locus</i>	<i>Fst</i>	<i>P-valor</i>
CeATC1-22	0,0007	0,369
CeATC1-36	0,002	0,320
CeATC1-52	0,001	0,319
CeATC1-54	0,008	0,023*
CeATC2-4	0,002	0,318
CeATC2-11	-0,003	0,943
CeATC2-34	0,001	0,324
CeATC2-44	0,02	0,004*
Total	0,004	0,007*

(*): significativo para un $\alpha=0,05$

De los 10 tests *Fst* realizados entre pares de localidades, tres resultaron significativos tras aplicar la corrección secuencial de Bonferroni (Tabla 3.5). Todos los contrastes significativos incluyeron a FE, que resultó distinta a todas las demás localidades analizadas excepto CO. El análisis de la diferenciación poblacional en función de la distribución de las frecuencias génicas por pares de localidades para cada *locus*, tras aplicar la corrección secuencial de Bonferroni, sólo resultó significativo para el *locus* CeATC2-44 entre las localidades de FE y AV. En el escalamiento multidimensional no métrico (nMDS) CO, BR, SS y AV se agrupan juntas y separadas de la localidad de FE (Figura 3.3).

Tabla 3.5. Valores *Fst* por pares de localidades

	SS	BR	CO	FE
AV	-0,001	0,000	-0,002	0,008**
SS		0,005*	-0,003	0,008**
BR			0,005	0,008**
CO				0,001

(*): significativo para un $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

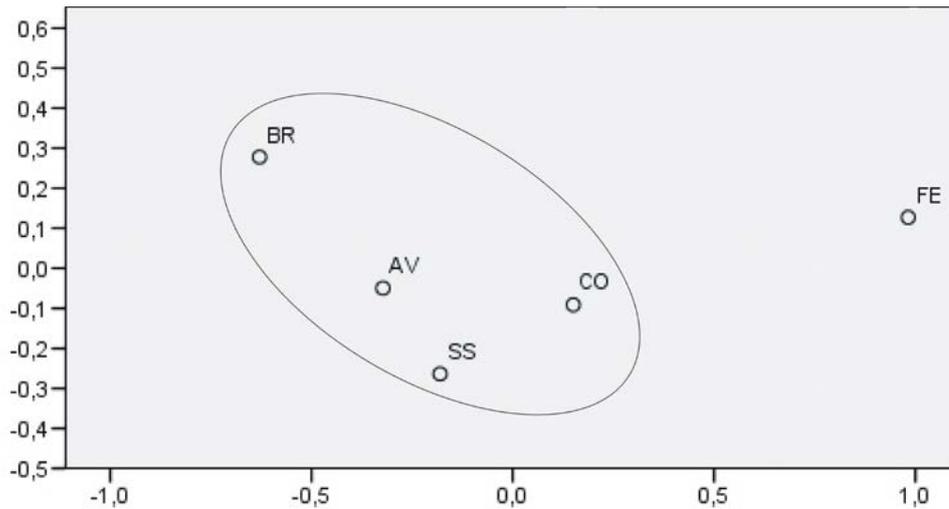


Figura 3.3. Representación del escalamiento multidimensional no métrico realizado sobre la matriz de valores F_{st} entre pares de localidades. La elipse engloba a las localidades no significativamente distintas

Las estimas más altas de Nm se obtuvieron entre las localidades de AV, SS, BR y CO, y las más bajas entre éstas y FE (Tabla 3.6). El programa Structure no detectó estructuración poblacional, aun cuando se consideraron diferentes modelos de ascendencia y frecuencias alélicas para realizar el análisis, no siendo posible asignar los individuos a un determinado grupo de forma fiable.

Tabla 3.6. Valores de Nm entre pares de localidades

	SS	BR	CO	FE
AV	53,026	48,931	51,375	26,235
SS		29,609	54,974	25,297
BR			28,994	25,991
CO				38,823

El AMOVA, al agrupar las localidades de FE y CO frente a las de BR, SS y AV para evaluar la proporción de varianza atribuible a diferencias entre grupos regionales, detectó un componente entre grupos significativo ($P=0,022$) que explicaba el 0,4% de la varianza total, con un componente de la varianza entre localidades dentro de los grupos no significativo, y la mayor parte de la varianza dentro de las localidades (99,4%). Teniendo en cuenta el resultado del análisis nMDS, se repitió el AMOVA enfrentando

FE a las demás localidades analizadas. En este caso el componente de la varianza entre grupos aumentó hasta el 0,57%, pero no se detectó significación estadística (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. AMOVA considerando dos agrupaciones: a) FE y CO frente a BR, SS y AV; y b) FE frente a las demás localidades

Fuente de variación	Suma de cuadrados a/b	Porcentaje de variación a/b	P-valor a/b
Entre grupos	6,374/6,627	0,404/0,574	0,022*/0,103
Entre localidades dentro de los grupos	10,491/10,239	0,220/0,203	0,205/0,260
Dentro de las localidades	1470,897/1470,897	99,377/99,223	0,007*/0,008*
Total	1487,763/1487,763		

Índices de fijación: a) $F_{ct}=0,004$, $F_{sc}=0,002$, $F_{st}=0,006$; b) $F_{ct}=0,006$, $F_{sc}=0,002$, $F_{st}=0,008$; (*): significativo para un $\alpha=0,05$

3.4. Discusión

Este trabajo aporta las primeras estimas de diversidad genética y diferenciación poblacional de *C. edule* de cuatro localidades gallegas y una portuguesa, en las que el berberecho se encuentra sometido a una intensa explotación. A pesar de la importancia económica del recurso, los estudios genético-poblacionales realizados hasta ahora en la especie no incluyeron muestras de la región de estudio analizada aquí.

Los 11 marcadores utilizados resultaron polimórficos en todas las localidades examinadas. Presentaron elevados niveles de polimorfismo, con un número de alelos que varió entre siete (CeATC2-44) y 45 (CeATC2-11). La heterozigosidad observada y esperada por *locus* osciló entre 0,248 (CeATC2-12) y 0,830 (CeATC2-11) y entre 0,373 (CeATC1-36) y 0,939 (CeATC1-5), siendo los valores globales de 0,580 y 0,742, respectivamente. Estos datos contrastan con los obtenidos en la misma especie utilizando marcadores alozímicos, en los que el rango del número de alelos por *locus* fue menor (3-11, Beaumont *et al.*, 1980; Beaumont y Pether, 1996) y también los valores globales de heterozigosidad esperada (0,28, Hummel *et al.*, 1994; 0,322, Beaumont y Pether, 1996) y observada (0,436, Beaumont *et al.*, 1980; 0,24, Hummel *et al.*, 1994; 0,278, Beaumont y Pether, 1996). La existencia de diferencias concuerda con

lo esperado, dado que los microsatélites son marcadores con una mayor variabilidad que las alozimas. Respecto a marcadores microsatélite, los valores de heterozigosidad, tanto observada como esperada, fueron similares a los obtenidos en otro estudio con el mismo panel de marcadores ($He=0,73$; $Ho=0,63$, Coscia *et al.*, 2013).

Todas las localidades, así como todas las combinaciones *locus*-localidad que se desviaron del equilibrio H-W excepto una, mostraron valores del estadístico *Fis* positivos, lo que indica un déficit de heterozigotos. Esta observación es frecuente en bivalvos (Zouros *et al.*, 1988) y ha sido documentada tanto en el caso de *loci* alozímicos (Zouros y Foltz, 1984; Gaffney, 1990; Fairbrother y Beaumont, 1993; Beaumont y Pether, 1996) como en el de los marcadores microsatélite (Launey *et al.*, 2002; Hedgecock *et al.*, 2004; Astanei *et al.*, 2005; Carlsson y Reece, 2007). Varios factores, tanto técnicos como biológicos, podrían ser la causa del déficit de heterozigotos observado, incluyendo la endogamia, el efecto Wahlund, la selección y la presencia de alelos nulos.

Dado que los bivalvos presentan emisión externa de gametos y una extensa dispersión larvaria no es probable que la endogamia sea la principal causa del déficit de heterozigotos observado. Por otro lado, la endogamia debería afectar por igual a todos los *loci*, detectándose déficit de heterozigotos en todos ellos (Astanei *et al.*, 2005). Sin embargo, los valores positivos de *Fis* obtenidos en este estudio se distribuyeron de forma heterogénea entre los *loci* (Anexo A).

El efecto Wahlund se refiere a la reducción de la heterozigosidad en una población causada por la estructuración poblacional; cuando una muestra incluye dos o más poblaciones con diferentes frecuencias alélicas en un *locus*, la heterozigosidad se ve reducida cuando se compara con el valor esperado bajo equilibrio H-W (Astanei *et al.*, 2005). En este estudio todas las localidades examinadas presentaron déficit de heterozigotos, pero no todas mostraron evidencias de diferenciación genética en los valores de *Fst* por pares, por lo que es altamente improbable que exista estructura de población en cada localidad y en consecuencia que el efecto Wahlund sea la principal causa del déficit de heterozigotos detectado.

Aunque los microsátélites son considerados marcadores neutrales, algunos pueden estar bajo el efecto de la selección de forma directa o indirecta (Li *et al.*, 2002). Los tests de neutralidad realizados detectaron desviaciones significativas de la neutralidad únicamente para el *locus* CeATC1-5 y en sólo tres de las cinco localidades en que este *locus* se desvió de lo esperado bajo equilibrio H-W. Aunque no puede descartarse que CeATC1-5 esté sometido a selección equilibradora, ésta sólo explicaría parte del déficit observado para este *locus*, por lo que la selección no parece ser la principal causa del déficit global de heterocigotos observado en este estudio.

Los alelos nulos también son una causa de déficit de heterocigotos debido a que la ausencia de amplificación provoca que heterocigotos con alelos nulos sean genotipados como homocigotos (Selkoe y Toonen, 2006). Los alelos nulos son un fenómeno común en los bivalvos y han sido descritos como la causa del déficit de heterocigotos en muchas especies incluyendo ostras (Galindo-Sánchez *et al.*, 2008), almejas (Vadopalas *et al.*, 2004) y mejillones (Gardeström *et al.*, 2008). El hecho de que en cinco de los seis *loci* que se desviaron de lo esperado bajo equilibrio H-W en alguna o todas las localidades se detectaran alelos nulos, en varios casos a frecuencias superiores a 0,2, indica que, al igual que en otros bivalvos, este tipo de alelos puede ser la principal causa del déficit de heterocigotos observado.

La heterocigosidad y la riqueza alélica son los parámetros principales de medida de la variación genética. Una reducción de la primera implicaría una pérdida de la *fitness* de los individuos, mientras que una disminución de la segunda reduciría la capacidad evolutiva futura de las poblaciones (Ryman *et al.*, 1995). Los tests de Friedman realizados no revelaron diferencias significativas de heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada, ni riqueza alélica entre las localidades, pero cabe destacar que los valores menores se encontraron en la localidad gallega de CO donde, según los datos históricos de capturas proporcionados por la Xunta de Galicia (2014), durante los últimos 10 años se han producido grandes oscilaciones en las capturas, con valores en general muy inferiores a los registrados para las otras tres localidades gallegas analizadas. En términos generales, el grado de variación reflejado por la riqueza alélica fue mayor que el reflejado por la heterocigosidad, lo cual es atribuible a que la heterocigosidad viene definida fundamentalmente por el tamaño efectivo de la

población, mientras que la riqueza alélica se ve también influida por su tamaño censal (Crow y Kimura, 1970). Así, la riqueza alélica es más sensible que la heterozigosidad a grandes reducciones del tamaño poblacional como las producidas por la explotación (Allendorf *et al.*, 2008), pudiendo producirse pérdidas de diversidad alélica incluso en poblaciones explotadas en las que la pérdida de heterozigosidad debida a la explotación es mínima (Ryman *et al.*, 1995). Esto hace que los programas de gestión y conservación deban prestar especial importancia a la riqueza alélica (Petit *et al.*, 1998), ya que la capacidad de respuesta a la selección está definida fundamentalmente por el número inicial de alelos y es independiente de las frecuencias alélicas.

Las localidades analizadas en este estudio mostraron una heterozigosidad esperada ($He=0,729-0,751$) similar a la de muestras del Mar de Irlanda ($He=0,708-0,741$), pero mayor riqueza alélica ($Rs=9,948-11,360$, presente estudio; $Rs=7,3-8,2$, Coscia *et al.*, 2013). Respecto a las estimas proporcionadas por marcadores microsatélite en otras especies de bivalvos en la misma región geográfica, los valores son superiores a los de la navaja *Ensis siliqua* ($Rs=8,305-10,519$; $He=0,569-0,634$, Arias-Pérez *et al.*, 2012) y la almeja *V. pullastra* ($Rs=5,488-6,207$; $He=0,566-0,590$, Pereira, 2013), e inferiores a los del mejillón *M. galloprovincialis* ($Rs=12,994-13,743$; $He=0,799-0,818$, Diz y Presa, 2009). Por otro lado, la volandeira *Aequipecten opercularis* mostró valores inferiores de heterozigosidad esperada, pero niveles superiores de riqueza alélica ($Rs=13,195-15,487$; $He=0,583-0,629$, Arias *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio revelaron la existencia de estructura genética significativa en las localidades analizadas ($Fst=0,004$, $P=0,007$). Dada la alta variabilidad de los *loci* microsatélite se espera que las estimas de diferenciación inferidas a partir de este tipo de marcadores sean bajas. En la práctica, el límite superior de Fst es el nivel de homocigosidad esperada, el cual es bajo en microsatélites, lo que implica una reducción en el valor máximo de Fst (Hedrick, 1999; Charlesworth, 1998). Morton *et al.* (1993) sugirieron que las medidas de diferenciación en *loci* altamente variables podrían llegar a ser hasta de un orden de magnitud más bajas que las de marcadores tradicionales como las alozimas. Teniendo esto en cuenta, se calculó un valor estandarizado de Fst ($Fst'=0,014$), el cual, según las pautas descritas por Wright (1978), indica un nivel bajo de diferenciación genética. Este grado de diferenciación no

fue suficiente para que los análisis bayesianos de agrupación realizados con el programa Structure detectasen la existencia de estructura poblacional entre las localidades muestreadas.

Los valores de F_{st} entre pares de localidades mostraron que la diferenciación detectada viene determinada por FE, la única localidad del estudio que mostró diferencias significativas respecto a otras localidades, resultando significativamente distinta a todas excepto CO. Esta diferenciación contrasta con las estimas de migrantes obtenidas, que se encuentran muy por encima de un migrante por generación, un valor que se considera suficiente para amortiguar la diferenciación genética entre las poblaciones causada por efecto de la deriva (Slatkin, 1987). Observaciones similares fueron descritas previamente por Beaumont y Pether (1996) en localidades de UK. Las discrepancias pueden ser debidas a que las estimas indirectas de migración son un reflejo de la media histórica del flujo génico necesario para explicar el modelo de diferenciación observado entre las poblaciones, lo que conlleva una sobreestimación del flujo génico real (Slatkin, 1985). No puede descartarse que el bajo nivel de diferenciación detectado en el berberecho se deba al traslado de ejemplares entre las diferentes zonas de explotación, como se ha sugerido para otras especies como el mejillón *M. galloprovincialis*. Sin embargo, parece poco probable ya que aparentemente es una práctica limitada.

El grado de diferenciación detectado fue inferior a los obtenidos en análisis con marcadores microsatélite en otras especies de moluscos marinos en Galicia. En el caso del mejillón *M. galloprovincialis*, al analizar 27 muestras procedentes de cinco rías gallegas (Diz y Presa, 2009), se obtuvo un valor global de F_{st} de 0,012, detectándose la existencia de diferenciación débil entre las muestras de las Rías Altas y las Rías Bajas ($F_{st}=0,017$). Los autores proponen que la diferenciación podría estar relacionada con una supuesta barrera oceanográfica descrita en el Cabo Fisterra, donde existe un fuerte afloramiento estacional debido a la presencia de un frente subsuperficial entre aguas de diferente origen (subpolar y subtropical). Piñeira *et al.* (2008) analizaron el caracol marino *Littorina saxatilis* en siete localidades distribuidas a lo largo de las costas de Galicia con diferentes marcadores (AFLPs, microsatélites y un carácter morfológico) y detectaron también la existencia de diferenciación entre las Rías Altas y las Rías Bajas. Como en el caso del mejillón, esta diferenciación se asocia principalmente con el Cabo

Fisterra, que al actuar como una barrera de restricción al flujo génico permitiría a la deriva, y probablemente también a la selección, generar la diferenciación observada.

En el caso de *C. edule*, a pesar de que los estadísticos F_{st} no detectaron diferencias entre las localidades de FE y CO, no puede descartarse la presencia de una barrera a nivel del Cabo Fisterra. Las agrupaciones analizadas mediante AMOVA mostraron que el mayor componente de la varianza entre grupos se obtuvo al enfrentar FE con el resto de localidades, aunque el poder estadístico no fue suficiente para poder detectar significación estadística. Dado que el poder estadístico depende del número de poblaciones por grupo analizadas, sería necesario incluir en el análisis poblaciones adicionales procedentes de las Rías Altas para poder confirmar la existencia de diferenciación Rías Altas-Rías Bajas en *C. edule*. No obstante, hay otros factores que pueden estar promoviendo el patrón de diferenciación observado. Por un lado, FE se encuentra en un enclave mucho más cerrado que las demás localidades, debido a que en la zona media de la ría hay un fuerte estrechamiento (~300 m entre los dos márgenes) que hace que el interior de la misma esté muy protegido, lo que podría ocasionar una restricción de la dispersión larvaria desde y hacia esta ría. Por otro lado, la diferenciación de FE también podría relacionarse con la hipótesis del *Sweepstakes Reproductive Success*, la cual postula una alta varianza en el éxito reproductivo en animales marinos con alta fecundidad debido a que es una especie de lotería que se combine la actividad reproductiva con condiciones oceanográficas favorables para la maduración de los gametos, la fecundación, el desarrollo larvario, la fijación y el reclutamiento a la población reproductora adulta. Ello explicaría que especies con larvas de alta capacidad dispersiva y poblaciones adultas débilmente estructuradas presenten a menudo una heterogeneidad genética caótica en una escala espacial reducida (Hedgecock, 1994; Hedgecock y Pudovkin, 2011). El análisis de muestras temporales permitirá conocer si la varianza en el éxito reproductivo de *C. edule* desempeña un papel determinante en la diferenciación de FE, pero la diferenciación genética revelada por el gen mitocondrial citocromo b entre almejas de Barallobre, una localidad próxima a FE, y O Grove, en la Ría de Arousa (Pereira, 2013), permite atribuir a la situación geográfica un papel preponderante. La existencia de homogeneidad genética a gran escala con diferenciación a nivel local no es inusual en *C. edule*. Coscia *et al.* (2013), al analizar cinco localidades de Irlanda y Gales, detectaron diferenciación en una de las

localidades, que atribuyeron a su emplazamiento en un estuario recogido donde la retención larvaria resulta favorecida.

El número estimado de migrantes entre las localidades que no muestran diferenciación genética llega a doblar los valores obtenidos con respecto a la localidad de FE (Tabla 3.6), lo que sugiere que el intercambio larvario podría ser el responsable de su homogeneidad genética. Aunque Nm es una valiosa medida relativa de la migración entre poblaciones debe ser interpretado con precaución, ya que se calcula en base al valor de F_{st} y éste generalmente se estima a partir de un número pequeño de *loci* en muestras limitadas de individuos de unas pocas poblaciones. Además, F_{st} es una función no lineal de Nm y, por tanto, pequeñas diferencias en el valor de F_{st} pueden dar lugar a variaciones importantes en las estimas de Nm (Whitlock y McCauley, 1999).

La homogeneidad genética entre las muestras de Galicia y Aveiro contrasta con los resultados obtenidos en la navaja *E. siliqua* mediante marcadores RAPD, ADNmt (Arias *et al.*, 2011b) y microsatélites (Arias-Pérez *et al.*, 2012) en los que se detectó diferenciación entre la localidad portuguesa y tres localidades gallegas (Celeiro, Fisterra y Barra de Cangas). En este caso la diferenciación genética observada, con valores del estadístico F_{st} de 0,304, 0,290 y 0,274, respectivamente, se atribuyó a la retención larvaria en Aveiro debido a que las condiciones oceanográficas, comportamiento larvario o distribución vertical de las larvas podrían provocar el autorreclutamiento. Otros estudios realizados en moluscos bivalvos sugieren también la existencia de diferenciación genética entre las costas de Galicia y el área de Portugal incluida en este estudio. Para el mejillón *M. galloprovincialis*, Diz y Presa (2008) describieron la existencia de diferencias significativas entre una localidad del sur de Galicia (Combarro) y la localidad portuguesa de Figueira da Foz ($F_{st}=0,030$), una localidad relativamente cercana a AV (~60 km). La distinta duración de los periodos larvarios de *E. siliqua* (14-19 días en condiciones de cultivo, da Costa *et al.*, 2010) y *C. edule* podría explicar, al menos en parte, las diferencias observadas en la estructura genética entre ambas especies. Sin embargo, otras causas deber tener mayor efecto ya que *M. galloprovincialis*, con un periodo larvario más largo (30-60 días, Figueras, 2007), muestra diferenciación genética.

Capítulo 4. Diversidad genética, estructura poblacional e historia evolutiva a escala macrogeográfica: microsatélites vs. gen citocromo b

4.1. Introducción

En gran medida, la distribución geográfica actual de las poblaciones y de la variabilidad genética de las especies marinas es consecuencia de factores ambientales históricos y contemporáneos. En el caso del género *Cerastoderma*, el registro fósil se remonta al Oligoceno hace ~40 Ma (Keen, 1969) y la divergencia de *C. edule* y *C. glaucum*, los dos representantes principales del género en la costa noreste del Océano Atlántico, se atribuye al aislamiento de las cuencas del Atlántico y el Mediterráneo en el final del Mioceno y principios del Plioceno (Rygg, 1970; Brock y Christiansen, 1989; Brock, 1991; Hummel *et al.*, 1994), acompañado del fraccionamiento del Mar Mediterráneo en múltiples lagunas con diferentes condiciones de salinidad durante la crisis salina del Messiniense hace ~6 Ma (Ruggieri, 1967; Hsü *et al.*, 1977). Las glaciaciones del Pleistoceno produjeron cambios considerables en la geografía del norte de Europa (Denton y Huges, 1981; Dawson, 1992) jugando un papel fundamental en el modelado de la evolución, estructura genética poblacional y distribución de la mayor parte de la fauna moderna (Hewitt, 1999, 2000; Maggs *et al.*, 2008), incluyendo probablemente también a *C. edule*. Existen evidencias de que, para sobrevivir durante los máximos glaciales, la mayor parte de la biota se retiró a zonas de refugio a latitudes menores donde las condiciones climáticas eran menos extremas para después, a medida que los hielos se retiraron y el clima se volvió más cálido, moverse de los refugios y recolonizar áreas situadas más al norte (Hewitt, 1999, 2000). Sin embargo, también hay datos que sugieren un escenario diferente en el que las especies podrían haber sobrevivido en refugios a latitudes mayores (Stewart y Lister, 2001; Roman y Palumbi, 2004; Provan *et al.*, 2005; Chevolut *et al.*, 2006; Krakau *et al.*, 2012). Además de los cambios geográficos y climáticos, otros factores como las condiciones hidrográficas pueden haber desempeñado también un papel importante en el moldeado del patrón poblacional actual de *C. edule* al restringir la conectividad y, en consecuencia, el flujo génico (Coscia *et al.*, 2013).

Los estudios de genética de poblaciones y filogeografía indican que las poblaciones de *C. edule* muestran un alto flujo génico, como se predice en la mayoría de las especies marinas, caracterizadas por una alta capacidad de dispersión debido a la existencia de una larga fase larvaria planctónica. Sin embargo, existen signos de la existencia de un

patrón débil pero significativo de diferenciación genética. Berberechos de la costa de Gales y Francia mostraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas del *locus* alozímico *Odh* con muestras del sur del Mar del Norte (Beaumont *et al.*, 1980). La diferenciación genética inferida a partir de siete *loci* alozímicos en ocho localidades de Dinamarca, Países Bajos y Francia fue baja ($F_{st}=0,04$, Hummel *et al.*, 1994), pero superior a la deducida para ocho localidades del sur de UK a partir de nueve *loci* ($F_{st}=0,016$, Beaumont y Pether, 1996). Atendiendo a las frecuencias alélicas, las poblaciones del sureste de UK fueron genéticamente homogéneas, mientras que las del suroeste mostraron variaciones significativas en siete de los nueve *loci* polimórficos examinados debido fundamentalmente a una localidad del sur de Gales. De acuerdo con marcadores microsatélite, tres poblaciones irlandesas y una galesa de ambos lados del Canal de San Jorge, al sur del Mar de Irlanda, son más similares entre sí que cualquiera de ellas con otra del sur de Gales ($F_{st}=0,02-0,007$, Coscia *et al.*, 2013) previamente diferenciada en base a *loci* alozímicos (Beaumont y Pether, 1996). Por otra parte, un análisis filogeográfico basado en el gen mitocondrial COI de 19 localidades distribuidas desde Marruecos a Rusia reveló la existencia de dos haplotipos centrales dominantes separados por baja divergencia, pero que definen un grupo de poblaciones genéticamente homogéneo al sur del Canal de la Mancha y otro genéticamente heterogéneo al norte (Krakau *et al.*, 2012).

Un aspecto común a todos los estudios genéticos realizados en *C. edule* es el análisis de un único tipo de marcador molecular (alozimas, microsatélites o el gen COI). Sin embargo, para inferir la estructura genética y la historia evolutiva de las poblaciones deberían analizarse genotipos tanto nucleares como citoplasmáticos (Sunnucks, 2000; Chenuil, 2006; Grobler *et al.*, 2011; Zarza *et al.*, 2011). Aunque en muchos casos los patrones genéticos inferidos a partir de diferentes tipos de marcadores genéticos coinciden (Avise, 2004), los estudios que detectan resultados discordantes entre marcadores nucleares y mitocondriales han ido en aumento con los años (Toews y Brelford, 2012), incluyendo inconsistencias entre microsatélites y ADNmt, los dos marcadores más populares en estudios de organismos marinos. Debe tenerse en cuenta que el genoma mitocondrial es haploide y presenta mayoritariamente herencia uniparental, lo que hace que su tamaño efectivo sea cuatro veces menor que el de los marcadores nucleares (Ferguson *et al.*, 1995; Ballard y Whitlock, 2004; Zink y

Barrowclough, 2008). Este patrón de herencia, unido a la ausencia de recombinación, hace que el genoma mitocondrial se comporte como un único *locus* (Galtier *et al.*, 2009). Por otra parte, al contener secuencias codificantes, el ADNmt puede estar sujeto a selección (Ballard y Whitlock, 2004; Galtier *et al.*, 2009). En contraposición, los microsatélites presentan un modo de herencia biparental, acumulan mutaciones rápidamente y, en general, los *loci* son selectivamente neutros (Chistiakov *et al.*, 2006). En consecuencia, los análisis basados únicamente en marcadores microsatélite o mitocondriales tienen el riesgo de proporcionar una visión sesgada e incompleta de los patrones de población subyacentes

En este capítulo se analizaron marcadores microsatélite y el gen mitocondrial citocromo b en 19 muestras de *C. edule* recogidas a lo largo de su ámbito de distribución para evaluar su diversidad genética y diferenciación poblacional y examinar su historia evolutiva. Con ello se pretende evitar los inconvenientes derivados del análisis de un único tipo de marcador o de un número reducido de poblaciones y contribuir a crear una visión integrada y global de las características genéticas y evolutivas de la especie.

4.2. Material y métodos

4.2.1. Material de estudio y extracción de ADN

Los individuos de *C. edule* analizados proceden de 19 localidades distribuidas a lo largo de la costa noreste del Océano Atlántico, desde Marruecos hasta Rusia (Tabla 4.1). En los ejemplares de AV, BR, CO y OS la extracción de ADN se realizó según Fernández-Tajes y Méndez (2007), como se describe en el apartado 2.2.1, mientras que en todos los demás se siguió un método rápido y sencillo basado en el desarrollado por Walsh *et al.* (1991). Para cada individuo, se introdujo un fragmento de músculo aductor (~1 mm³ conservado en etanol al 96%) en 100 µl de CHELEX 100TM al 10% en H₂O milliQ estéril y se incubó a 100°C durante 20 min. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron 2 min a 12500 g, recogiendo después el sobrenadante. La cuantificación del ADN extraído se realizó en un espectrofotómetro nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.).

Tabla 4.1. Localización de los sitios de muestreo

Código	Localidad	País	Latitud*	Longitud*
MO	Merja Zerja	Marruecos	34°50'N	06°14'O
AV	Aveiro	Portugal	40°39'N	08°45'O
BR	Boiro	España	42°38'N	08°53O
CO	Corcubión	España	42°56'N	09°11'O
AR	Arcachon	Francia	44°35'N	01°14'O
RO	Roscoff	Francia	48°43'N	03°58'O
TH	Southend	Inglaterra	51°28'N	00°42'E
DB	Dublin	Irlanda	53°19'N	06°12'O
SO	St. Andrews	Escocia	56°21'N	02°50'O
OS	Oostershelde	Países Bajos	51°50'N	04°05'E
LA	Langeoog	Alemania	53°45'N	07°29'E
SY	Sylt	Alemania	55°01'N	08°26'E
LF	Limfjord	Dinamarca	56°56'N	09°04'E
NM	Norsminde	Dinamarca	56°02'N	10°25'E
FL	Arendal	Noruega	58°26'N	08°48'E
BN	Bergen	Noruega	60°23'N	05°20'E
SL	North Gluss	Escocia	60°28'N	01°21'O
BO	Bodoe	Noruega	67°17'N	14°37'E
DZ	Murmansk	Rusia	69°10'N	36°05'E

*Valores aproximados en grados decimales

4.2.2. Análisis de marcadores microsatélite

Los individuos analizados se genotiparon para ocho *loci* microsatélite polimórficos distribuidos en las dos PCRs *multiplex* optimizadas en el Capítulo 2, con la excepción de los individuos de AV, BR, CO y OS que fueron genotipados para los mismo *loci* pero en PCRs *monolocus*. Para equiparar los genotipos obtenidos mediante las dos estrategias de amplificación, en cada una de las reacciones *multiplex* realizadas se incluyeron al menos cuatro individuos previamente genotipados en reacciones *monolocus*.

Los parámetros de diversidad genética (N_a , H_o , H_e y R_s), correlación entre el número de alelos privados y tamaño muestral, bondad de ajuste al equilibrio H-W y equilibrio de ligamiento, frecuencia de alelos nulos y coeficiente de endogamia (F_{is}), se calcularon como se describe en el apartado 3.2.2. Además, se utilizó el paquete

estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc.) para determinar la relación entre la latitud y los diferentes parámetros de diversidad (H_e , H_o y R_s) mediante análisis de regresión. En caso de realizarse tests estadísticos múltiples, los p -valores se ajustaron utilizando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

La existencia de estructura poblacional se testó mediante un análisis bayesiano utilizando el programa Structure v.2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Se analizó un número posible de grupos de entre 1 y 19, con 10 simulaciones independientes para cada posible valor de K , utilizando un modelo de ascendencia mixta, con frecuencias alélicas correlacionadas y empleando el origen de los individuos como información *a priori*. Para las cadenas de Markov Monte Carlo se estableció un *burn-in* de 50000 y 100000 iteraciones. El análisis se realizó tres veces para asegurar la reproducibilidad de los resultados. Los resultados obtenidos se procesaron con el programa Struture Harvester (Earl y vonHoldt, 2012) y el valor de K más probable se determinó utilizando tanto el logaritmo de la probabilidad de los datos (Pritchard *et al.*, 2000) como el estadístico ΔK de Evanno *et al.* (2005). Se utilizó CLUMPP v.1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007) para obtener la matriz promedio de los coeficientes de pertenencia individual de las 10 réplicas realizadas para el valor estimado de K . Estas matrices se introdujeron en el programa Distruct (Rosenberg, 2004) para obtener un gráfico de barras en el que cada individuo se representa como un segmento dividido en K colores distintos que representan el coeficiente estimado de pertenencia a cada uno de los K grupos. La diferenciación poblacional se estimó también mediante el estadístico F_{st} (Weir y Cockerham, 1984), calculándose un valor global estandarizado (F_{st}'), y mediante AMOVA de igual forma que en el apartado 3.2.2.

La correlación lineal entre la distancia genética ($F_{st}/(1-F_{st})$) y la distancia geográfica entre pares de localidades (medida como la distancia en línea de costa [km] entre las localidades muestreadas) se analizó mediante un test de Mantel con 10000 aleatorizaciones utilizando el programa IBDWS v.3.16 (Jensen *et al.*, 2005).

Dado que las poblaciones que han sufrido un cuello de botella reciente presentan una diversidad genética mayor de la que se esperaría para una población en equilibrio mutación-deriva, se realizó un test de Wilcoxon con el programa Bottleneck v.1.2.02

(Cornuet y Luikart, 1996) para determinar si en alguna de las poblaciones la proporción de *loci* con exceso de heterozigosis era significativamente mayor que la esperada en equilibrio. Los análisis se realizaron usando el modelo de mutación TPM, como sugieren los autores, con 1000 iteraciones y una proporción $P=0,10$ de mutaciones en varios pasos. La posibilidad de una expansión poblacional reciente se testó mediante el test *k intralocus* y el test *g interlocus* (Reich y Goldstein, 1998) utilizando el programa Kgtests (Bilgin, 2007).

4.2.3. Análisis del gen mitocondrial citocromo b

Se amplificó un fragmento de ~450 pb de la región 5' del gen citocromo b con los cebadores CytB 397F (5'-YWYTRCTTgRggCARTATC-3') y CytB 811R (5'-gCRWAYARAAARTAYCAYTCWgg-3') diseñados por Dahlgren *et al.* (2000). La reacción de PCR tuvo lugar en un volumen final de 25µl con ~100 ng de ADN molde, 0,2 mM de cada dNTP, 0,6 µM de cada cebador, 1,5 mM de MgCl₂ y 0,6 U de *Taq* ADN polimerasa. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 50°C y 30 s a 72°C; seguidos de una extensión final a 72°C durante 5 min.

El producto de PCR se secuenció en ambas direcciones y las secuencias se editaron en el programa Bioedit v.7.0.9 (Hall, 1999), eliminando los extremos donde la lectura es ambigua. La identidad de las secuencias se verificó mediante la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) disponible online en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Después de alinear las secuencias con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), se seleccionó un fragmento de 305 pb para los análisis posteriores. Al tratarse de un gen que codifica para una proteína, los alineamientos se realizaron tanto con la secuencia nucleotídica como con la aminoacídica (respetando la pauta de lectura) para determinar el número de mutaciones sinónimas y no sinónimas.

Las diversidades haplotípica (H_d) y nucleotídica (π) se estimaron con el programa DnaSP v.5.10 (Librado y Rozas, 2009). La relación entre la latitud y la diversidad haplotípica se analizó mediante un análisis de regresión con el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc.), mientras que las frecuencias haplotípicas se calcularon con el

programa Arlequín v.3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Este mismo programa se utilizó para estimar la diferenciación genética (F_{st}) y su significación (10000 permutaciones). Se calculó además una medida estandarizada de la diferenciación global (F_{st}') según el método de Hedrick (2005). Los tests de AMOVA y Mantel se realizaron de igual forma que con los marcadores microsatélite.

Las relaciones genealógicas entre los haplotipos se evaluaron mediante una red de haplotipos construida con el programa Network v.4.6.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) utilizando el algoritmo Median-Joining (Bandelt *et al.*, 1999). Para determinar la posible existencia de expansiones poblacionales se analizó la distribución de *mismatches* (Rogers y Harpending, 1992), donde las diferencias observadas entre pares de haplotipos se representan frente a las esperadas en caso de expansión poblacional. Con la misma finalidad, se realizaron los tests D de Tajima (Tajima, 1989), F_s de Fu (Fu, 1997) y R_2 de Ramos-Onsins y Rozas (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). En todos los casos se utilizó el programa DnaSP v.5.10, determinándose la significación por simulación coalescente (1000 réplicas).

4.3. Resultados

4.3.1. Marcadores microsatélite

4.3.1.1. Diversidad genética

Mediante las dos PCRs *multiplex* que amplifican conjuntamente ocho *loci* microsatélite se genotipó un total de 880 individuos de *C. edule* procedentes de 19 localidades atlánticas (Anexo B). El 90% de los individuos analizados pudieron ser genotipados para al menos siete de los *loci*. Todos los *loci* resultaron polimórficos en todas las localidades, con un número de alelos por *locus* entre ocho (CeATC2-44) y 64 (CeATC2-11). Sesenta y seis de los 218 alelos detectados en el total de los *loci* fueron privados, encontrándose siempre a frecuencias inferiores a 0,05 y en número fuertemente correlacionado con el tamaño muestral ($F[1,17]=30,93$, $P<0,001$, $R^2_{adj}=0,624$). La heterocigosidad esperada por *locus* varió entre 0,461 (CeATC1-36) y 0,891

(CeATC2-11), la observada entre 0,430 (CeATC1-36) y 0,801 (CeATC2-11) y la riqueza alélica entre 8,000 (CeATC2-44) y 63,207 (CeATC2-11).

La Tabla 4.2 muestra las estimas de diversidad genética de las localidades, con valores de heterozigosidad esperada entre 0,700 (CO) y 0,761 (SY) y de heterozigosidad observada de 0,596 (DZ) a 0,707 (TH). Los niveles de heterozigosidad esperada fueron superiores a los de heterozigosidad observada en todas las localidades. La riqueza alélica osciló entre 6,491 (SL) y 8,390 (AR). Al representar los valores de heterozigosidad, tanto esperada como observada, frente a la latitud, el mejor ajuste se obtuvo para regresiones cúbicas, registrándose los mayores valores para ambos parámetros a latitudes intermedias. Sin embargo, la riqueza alélica mostró una correlación lineal significativa, indicando una tendencia a disminuir a medida que aumenta la latitud (Figura 4.1).

Ningún *locus* mostró evidencias de desequilibrio de ligamiento y 142 de las 152 combinaciones *locus*-localidad se ajustaron al equilibrio H-W tras aplicar la corrección secuencial de Bonferroni. Cuatro de los *loci* se ajustaron al equilibrio H-W en todas las localidades, mientras que dos de ellos (CeATC1-54 y CeTAC2-4) ocasionaron ocho de las 10 desviaciones detectadas. Todas las combinaciones que se desviaron del equilibrio H-W excepto una mostraron valores del estadístico *Fis* positivos, indicando la existencia de un déficit de heterozigotos.

Según el programa Microchecker, tres *loci* (CeATC1-54, CeATC2-4 y CeATC2-11) mostraron evidencias de alelos nulos en más de una localidad, con frecuencias superiores a 0,2 para el *locus* CeATC1-54 en DZ y para el *locus* CeATC2-4 en SL. No se encontraron otros errores de genotipado excepto en el *locus* CeATC2-4, que mostró evidencias de bandas tartamudas en dos localidades (TH y OS). Por ello, los *loci* CeATC1-54 y CeATC2-4 fueron excluidos de los análisis posteriores (Tabla 4.3).

4.3.1.2. Estructura poblacional

El análisis bayesiano realizado mediante el programa Structure en base a seis *loci* microsatélite detectó la existencia de diferenciación genética. Tanto el valor de máxima verosimilitud [$\ln \Pr(X/K)$] como el estadístico ΔK indicaron la existencia de dos

Tabla 4.2. Diversidad genética y coeficiente de endogamia de las localidades en marcadores microsatélite

	MO	AV	BR	CO	AR	RO	TH	DB	SO	OS	LA	SY	LF	NM	FL	BN	SL	BO	DZ
<i>N</i>	59	63	64	41	57	44	48	49	45	78	30	30	33	31	49	50	40	49	20
<i>Rs</i>	8,118	8,217	8,188	7,619	8,390	8,112	7,841	7,430	7,740	8,016	8,218	7,980	6,950	6,743	7,393	6,551	6,491	6,865	6,535
<i>He</i>	0,712	0,713	0,727	0,700	0,713	0,734	0,756	0,730	0,736	0,746	0,750	0,761	0,738	0,757	0,754	0,725	0,730	0,726	0,725
<i>Ho</i>	0,673	0,622	0,660	0,618	0,650	0,668	0,707	0,671	0,670	0,691	0,658	0,693	0,684	0,688	0,662	0,677	0,658	0,664	0,596
<i>Fis</i>	0,055	0,129	0,092	0,118	0,090	0,091	0,066	0,082	0,091	0,075	0,124	0,091	0,075	0,093	0,124	0,066	0,100	0,086	0,182

N: número de individuos; *Rs*: riqueza alélica basada en un tamaño muestral mínimo de 18 individuos; *He*: heterozigosidad esperada insesgada de Nei; *Ho*: heterozigosidad observada; *Fis*: coeficiente de endogamia

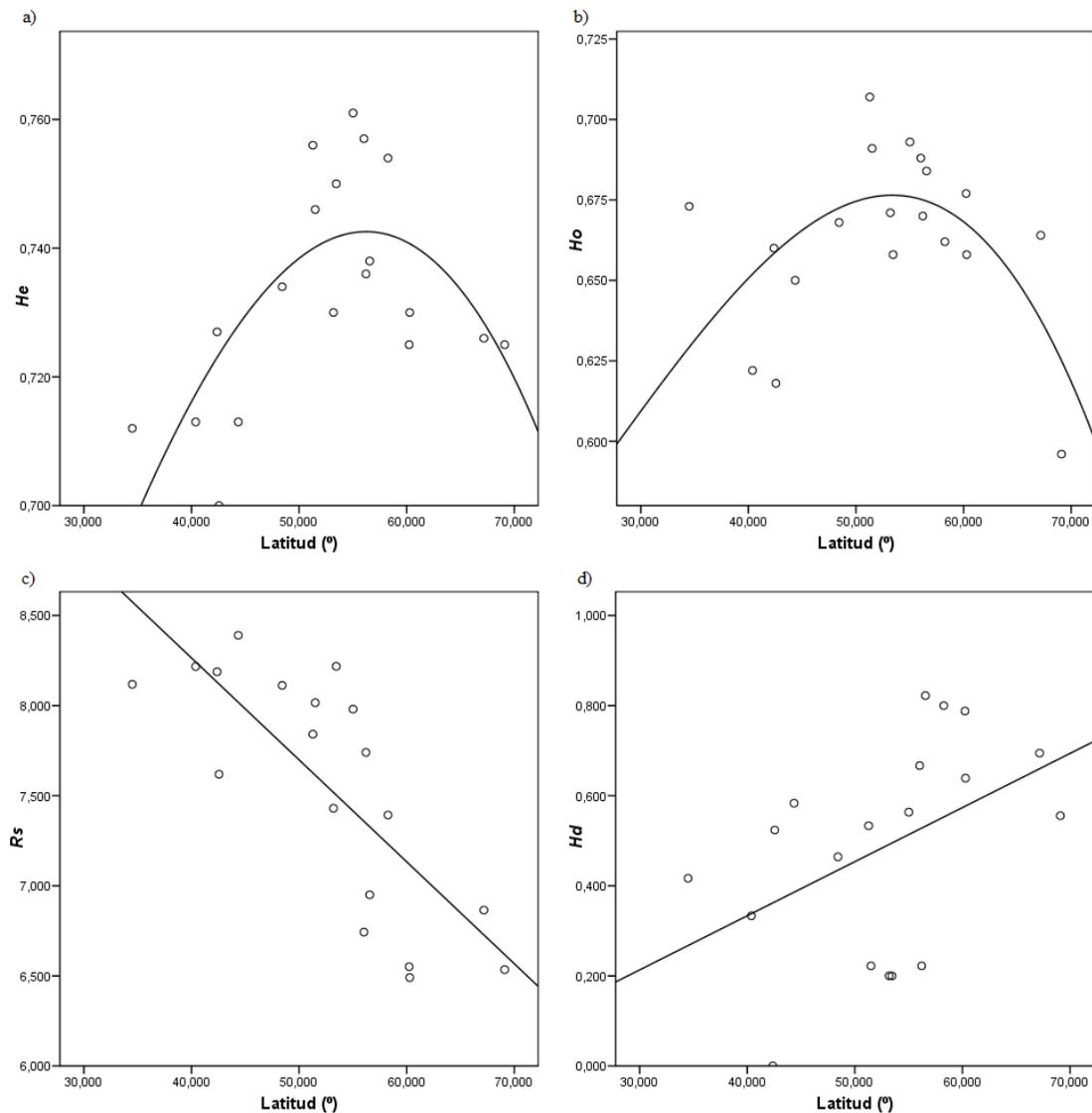


Figura 4.1. Diversidad genética de las muestras en función de la latitud. La heterozigosidad esperada (a) y observada (b) se ajustaron a una regresión cúbica ($R^2_{adj}=0,441$, $P=0,004$; $R^2_{adj}=0,280$, $P=0,028$), mientras que la riqueza alélica (c) y la diversidad haplotípica (d) lo hicieron a una regresión lineal ($R^2_{adj}=0,568$, $P<0,001$; $R^2_{adj}=0,164$, $P=0,048$)

grandes grupos genéticamente distintos. Los individuos de las localidades más meridionales MO, AV, BR, CO, AR y RO fueron asignados a uno de ellos y los de las más septentrionales LF, NM, FL, BN, SL, BO y DZ al otro. Los individuos de Irlanda, Gran Bretaña (GB) y la zona sur del Mar del Norte (TH, DB, SO, OS, LA y SY) mostraron coeficientes de asignación similares a cada uno de los grupos (Figura 4.2a).

Análisis posteriores realizados excluyendo las localidades del norte mostraron que los individuos de Irlanda, GB y sur del Mar del Norte son genéticamente distintos a los de la región sur (Figura 4.2b). Del mismo modo, al excluir del análisis las localidades del sur, los individuos de Irlanda, GB y sur del Mar del Norte resultaron también genéticamente diferentes a los del norte que, a su vez, constituyen un grupo heterogéneo, siendo las localidades de SL, BO y DZ diferentes entre ellas y del resto de localidades de la región norte (Figura 4.2c). Por tanto, el análisis bayesiano sugiere la existencia de tres grupos de poblaciones: el grupo sur (MO, AV, BR, CO, AR y RO), otro representado por los berberechos de Irlanda, GB y sur del Mar del Norte (TH, DB, SO, OS, LA y SY) y el grupo norte (LF, NM, FL, BN, SL, BO y DZ), este último con cierto nivel de estructuración interna.

Tabla 4.3. Combinaciones *locus*-localidad con bandas tartamudas y/o alelos nulos

Localidad	<i>Locus</i>	CeATC1-36		CeATC1-54		CeATC2-4		CeATC2-11	
		BT	AN	BT	AN	BT	AN	BT	AN
MO		-	-	-	-	-	0,082	-	-
AV		-	-	-	0,137	-	0,171	-	0,055
BR		-	0,071	-	0,070	-	0,095	-	-
CO		-	-	-	0,122	-	0,132	-	0,068
AR		-	-	-	0,141	-	0,089	-	-
RO		-	-	-	-	-	0,094	-	-
TH		-	-	-	0,086	X	0,087	-	-
DB		-	-	-	-	-	0,096	-	-
SO		-	-	-	0,106	-	0,135	-	0,087
OS		-	-	-	-	X	0,140	-	-
LA		-	-	-	0,127	-	0,094	-	-
SY		-	-	-	-	-	0,093	-	-
LF		-	-	-	0,139	-	-	-	-
NM		-	-	-	0,163	-	-	-	-
FL		-	-	-	0,118	-	0,102	-	0,109
BN		-	-	-	0,079	-	0,080	-	0,063
SL		-	-	-	0,082	-	0,286	-	-
BO		-	-	-	-	-	-	-	0,055
DZ		-	-	-	0,224	-	0,111	-	0,098

BT: presencia de bandas tartamudas; AN: frecuencia de alelos nulos

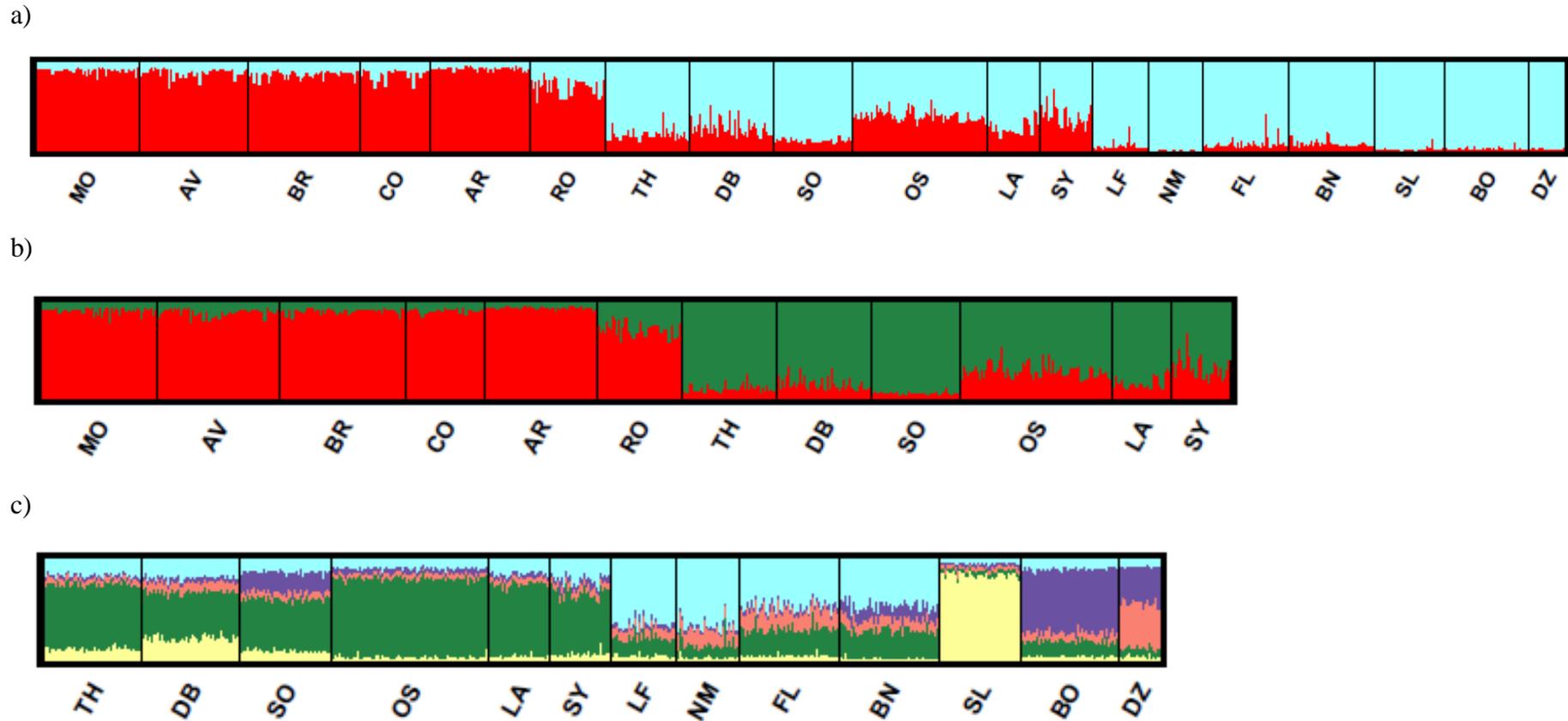


Figura 4.2. Análisis bayesiano de agrupación basado en marcadores microsatélite considerando el total de las localidades (a), las muestras del sur, Irlanda, GB y sur del Mar del Norte (b) y las localidades del norte, Irlanda, GB y sur del Mar del Norte (c). Cada color representa un grupo genético. Cada individuo figura como una barra vertical dividida en segmentos con colores que corresponden al coeficiente estimado de pertenencia a cada uno de los K grupos

Los seis *loci* analizados proporcionaron un valor global de F_{st} de 0,016, significativamente distinto de cero ($P < 0,001$), y un valor estandarizado (F_{st}') de 0,055. Las estimas de F_{st} por *locus* fueron todas significativas para un α del 5% y oscilaron entre 0,009 (CeATC1-22) y 0,031 (CeATC1-36).

Los valores de F_{st} por pares de localidades se muestran en la Tabla 4.4. Setenta y cuatro de las 171 combinaciones fueron significativas tras la corrección secuencial de Bonferroni, la mayoría de ellas (60) entre localidades de las tres regiones identificadas en los análisis bayesianos de agrupación. Los valores más altos de F_{st} se obtuvieron para las comparaciones que incluían a la localidad de DZ. Esta localidad y SL, ambas de la región norte, fueron diferentes entre ellas y respecto al resto de localidades analizadas, englobando 35 del total de combinaciones significativas. Cuando se agruparon las muestras en función de las tres regiones geográficas definidas por los análisis bayesianos de agrupación, los tres valores de F_{st} resultantes fueron significativos, obteniéndose el mayor valor para la comparación entre el grupo del norte y el del sur (Tabla 4.5).

El AMOVA (Tabla 4.6) mostró que un porcentaje pequeño (1%) pero significativo de la variación se debe a diferencias entre las tres regiones principales identificadas y que un porcentaje menor (0,32%) es explicado por las diferencias entre muestras dentro de las regiones. La mayor parte de la variación responde a las diferencias entre individuos.

4.3.1.3. Inferencia demográfica

La Tabla 4.7 indica los resultados del análisis demográfico. De acuerdo con el test de Wilcoxon no hay exceso de heterozigosidad en ninguna de las tres regiones (sur, Irlanda/GB/sur del Mar del Norte y norte), descartándose en consecuencia la existencia de cuellos de botella. Respecto a la expansión poblacional, ni el test g ni el test k permitieron rechazar la hipótesis de equilibrio demográfico para un $\alpha=0,05$ en la región de Irlanda/GB/sur del Mar del Norte y en la región norte. Sin embargo, el test k reveló la existencia de un crecimiento poblacional significativo para la región sur. El hecho de que en esta región se haya detectado un déficit significativo de heterozigotos, podría ser también una señal de expansión poblacional reciente en esta región.

Tabla 4.4. Valores *Fst* por pares de localidades para los marcadores microsatélite

	AV	BR	CO	AR	RO	TH	DB	SO	OS	LA	SY	LF	NM	FL	BN	SL	BO	DZ
MO	0,002	0,005*	0,000	-0,004	-0,002	0,017**	0,007*	0,015*	0,011*	0,024**	0,004	0,021**	0,039**	0,024**	0,007*	0,050**	0,024**	0,080**
AV	-	-0,002	-0,002	0,001	0,002	0,018**	0,007*	0,011*	0,007*	0,011*	0,003	0,022**	0,038**	0,017**	0,009*	0,040**	0,022**	0,081**
BR		-	0,000	0,001	0,003	0,016**	0,010*	0,006*	0,006*	0,011*	0,002	0,017*	0,030**	0,011*	0,008*	0,031**	0,015**	0,056**
CO			-	-0,002	-0,001	0,019**	0,007	0,013*	0,010*	0,022**	0,006	0,025**	0,041**	0,023**	0,008*	0,035**	0,017**	0,074**
AR				-	-0,003	0,013**	0,007*	0,015*	0,008*	0,024**	0,002	0,020**	0,034**	0,020**	0,005*	0,043**	0,017**	0,069**
RO					-	0,009*	0,006	0,008*	0,003	0,020*	-0,002	0,018*	0,035**	0,019**	0,006	0,035**	0,016*	0,073**
TH						-	0,004	0,012*	0,003	0,015*	0,001	0,015*	0,018*	0,013*	0,006*	0,022**	0,019**	0,066**
DB							-	0,010*	0,003	0,011*	-0,001	0,009*	0,025**	0,016**	0,003	0,028**	0,022**	0,082**
SO								-	0,001	-0,004	0,002	0,014*	0,030**	0,010*	0,008*	0,027**	0,007*	0,050**
OS									-	0,003	-0,004	0,013*	0,027**	0,010*	0,004	0,025**	0,011*	0,061**
LA										-	0,004	0,009	0,027**	0,003	0,012*	0,034**	0,025**	0,062**
SY											-	0,000	0,012*	0,006	-0,004	0,034**	0,010*	0,054**
LF												-	0,008	0,007	0,005	0,045**	0,029**	0,071**
NM													-	0,007	0,012*	0,049**	0,037**	0,051**
FL														-	0,006*	0,030**	0,024**	0,041**
BN															-	0,040**	0,012*	0,059**
SL																-	0,032**	0,083**
BO																	-	0,051**

(*): significativo para un $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

Tabla 4.5. *F_{st}* entre pares de regiones identificadas en los análisis bayesianos de agrupación. Valores estimados a partir de marcadores microsátélite (sobre la diagonal) o del gen citocromo b (bajo la diagonal)

	Sur	Irlanda/GB/sur Mar del Norte	Norte
Sur	-	0,009*	0,014*
Irlanda/GB/sur Mar del Norte	0,197*	-	0,005*
Norte	0,348*	0,232*	-

(*): significativo para un $\alpha=0,05$

Tabla 4.6. AMOVA basado en marcadores microsátélite. Los grupos incluyen: (i) las localidades del sur (MO, AV, BR, CO, AR y RO); (ii) Irlanda/GB/sur del Mar del Norte (TH, DB, SO, OS, LA y SY); y (iii) las localidades del norte (LF, NM, FL y BN), excepto SL, BO y DZ por tratarse de muestras aisladas

Fuente de variación	Porcentaje de variación	P-valor
Entre grupos	1,002	<0,001*
Entre poblaciones dentro de los grupos	0,316	<0,001*
Dentro de las poblaciones	98,682	<0,001*

Índices de fijación: $F_{ct}=0,010$; $F_{sc}=0,003$; $F_{st}=0,013$; (*): significativo para un $\alpha=0,05$

Tabla 4.7. Análisis de cuellos de botella y expansión poblacional con marcadores microsátélite

	Sur	Irlanda/GB/sur Mar del Norte	Norte
Cuellos de botella			
<i>P</i> (<i>H</i> déficit)/ <i>P</i> (<i>H</i> exceso)	0,008*/1	0,039*/0,977	0,219/0,922
Test <i>g</i> interlocus			
Valor <i>g</i>	2,911	3,112	3,301
<i>P</i> -valor	ns	ns	ns
Test <i>k</i> intralocus			
Nº <i>loci</i> con <i>k</i> negativo	6	5	4
<i>P</i> -valor	0,013*	0,096	0,316

(*): significativo para un $\alpha=0,05$; ns: no significativo

4.3.2. Gen mitocondrial citocromo b

4.3.2.1. Diversidad genética

Se analizó un fragmento de 305 pb del gen citocromo b en 173 individuos de las 19 localidades muestreadas (Tabla 4.8). Un total de 32 posiciones nucleotídicas fueron variables, comprendiendo 27 transiciones, 2 transversiones y 3 transiciones/transversiones. Las secuencias aminoacídicas mostraron una única sustitución no sinónima en la que el aminoácido valina fue sustituido por la isoleucina, ambos aminoácidos no polares. Se identificaron 30 haplotipos (Anexo C), ninguno presente en todas las localidades y 23 de ellos privados. El haplotipo 2 (H2) fue el más frecuente, encontrándose en 14 de las 19 localidades, seguido de los haplotipos 4 (H4) y 1 (H1), presentes en 7 y 5 de las localidades, respectivamente. Globalmente, la diversidad haplotípica fue alta (0,799) y la diversidad nucleotídica baja (0,0071). En las localidades, la diversidad haplotípica osciló entre 0,200 (DB y LA) y 0,822 (LF) y la diversidad nucleotídica entre 0,0007 (LA) y 0,007 (FL), excluyendo BR, que no mostró variación. Al representar la diversidad haplotípica frente a la latitud, el mejor ajuste correspondió a una regresión lineal, mostrando una tendencia a aumentar con la latitud, aunque con una significación cercana al 5% (Figura 4.1).

4.3.2.2. Estructura poblacional

El gen citocromo b también reveló la existencia de diferenciación significativa entre las localidades, con un valor de F_{st} global de 0,383 ($P < 0,001$) y un valor estandarizado de $F_{st}' = 0,706$. Cincuenta y nueve de las 171 combinaciones por pares de localidades fueron significativas tras la corrección secuencial de Bonferroni (Tabla 4.9), una proporción menor que la revelada por los marcadores microsatélite. Los valores F_{st} significativos fueron también más frecuentes (51) en las comparaciones entre localidades de diferentes regiones (sur, Irlanda/GB/sur del Mar del Norte y norte). La discordancia entre ambos marcadores fue evidente en 86 comparaciones, 36 de las cuales mostraron una diferenciación genética significativa para el gen citocromo b pero homogeneidad en los marcadores microsatélite. La mayoría de estas comparaciones (27) incluyeron una localidad de la región de Irlanda/GB/sur del Mar del Norte y otra de la región norte o sur. Las localidades de BN y BO, ambas de la región norte, aunque no

fueron significativamente distintas entre ellas, mostraron los mayores valores de F_{st} y englobaron 26 del total de combinaciones significativas. Cuando los individuos se agruparon según las regiones definidas por los marcadores microsatélite, los valores de F_{st} entre pares de regiones fueron significativos, obteniéndose el valor más alto en la comparación norte-sur (Tabla 4.5).

Tabla 4.8. Diversidad genética de las localidades en el gen citocromo b

Localidad	N	π	h	hp	Hd
MO	9	0,0022	3	2	0,417
AV	6	0,0011	2	1	0,333
BR	7	0,0000	1	0	0,000
CO	7	0,0056	3	2	0,524
AR	9	0,0022	4	2	0,583
RO	8	0,0025	3	1	0,464
TH	10	0,0043	4	3	0,533
DB	10	0,0013	2	1	0,200
SO	9	0,0007	2	1	0,222
OS	9	0,0029	2	0	0,222
LA	10	0,0007	2	1	0,200
SY	11	0,0049	3	1	0,564
LF	10	0,0067	5	1	0,822
NM	9	0,0051	3	0	0,667
FL	10	0,0073	5	1	0,800
BN	12	0,0050	5	1	0,788
SL	9	0,0069	3	1	0,639
BO	9	0,0027	4	2	0,694
DZ	9	0,0020	3	2	0,556
Global	173	0,0071	30	23	0,799

N : tamaño muestral ; π : diversidad nucleotídica; h : número de haplotipos; hp : número de haplotipos privados; Hd : diversidad haplotípica

Al superponer las frecuencias haplotípicas en un mapa geográfico (Figura 4.3) destaca un escenario de estructuración genética con tres grupos de poblaciones diferenciados, aunque los límites geográficos de estos grupos difieren de los definidos con los marcadores microsatélite. Un grupo está definido por una clara dominancia del haplotipo H2 y engloba las localidades del sur, Irlanda y GB (MO, AV, BR, CO, AR, RO, TH, DB y SO); otro se caracteriza por una frecuencia elevada del hapotipo H1, lo que ocurre en la zona sur del Mar del Norte (OS, LA y SY); y el tercer grupo incluye a las demás localidades, caracterizadas por la presencia del haplotipo H4 (NM, LF, FL,

Tabla 4.9. Valores F_{st} por pares de localidades para el gen citocromo b

	MO	AV	BR	CO	AR	RO	TH	DB	SO	OS	LA	SY	LF	NM	FL	BN	SL	BO
AV	-0,063	-																
BR	-0,070	-0,064	-															
CO	0,051	0,083	0,028	-														
AR	-0,079	-0,058	-0,046	0,087	-													
RO	-0,056	-0,055	-0,071	0,028	-0,038	-												
TH	0,488**	0,459*	0,539*	0,692**	0,431**	0,514*	-											
DB	0,416**	0,384*	0,461*	0,618**	0,361*	0,444**	0,287*	-										
SO	0,395*	0,364*	0,442*	0,605*	0,340*	0,422*	0,355*	0,182*	-									
OS	0,315*	0,285*	0,351*	0,494**	0,267*	0,341**	0,281**	0,088	0,209*	-								
LA	0,306*	0,274*	0,345*	0,501**	0,256*	0,335*	0,253*	0,038	0,157*	0,084	-							
SY	0,431**	0,399**	0,476**	0,632**	0,375**	0,458**	0,303*	0,016	0,199*	0,134*	-0,032	-						
LF	-0,052	-0,057	-0,054	0,062	-0,046	-0,044	0,456**	0,389*	0,366*	0,293*	0,283*	0,402**	-					
NM	-0,012	0,008	-0,051	-0,040	0,027	-0,024	0,630**	0,562**	0,543**	0,449**	0,451*	0,576**	0,009	-				
FL	-0,025	-0,008	-0,061	-0,031	0,011	-0,035	0,611**	0,542**	0,522*	0,429**	0,429**	0,556**	-0,005	-0,055	-			
BN	0,663*	0,643**	0,733*	0,875**	0,597**	0,681**	0,611**	0,542**	0,569**	0,470**	0,473**	0,446*	0,616**	0,789**	0,778**	-		
SL	0,294*	0,261*	0,332*	0,488*	0,244*	0,322*	0,241*	0,024	0,144	0,080	-0,053	-0,081	0,271*	0,438**	0,417*	0,354*	-	
BO	0,680**	0,662**	0,749**	0,882**	0,616**	0,696**	0,630**	0,562**	0,589**	0,489**	0,500**	0,468*	0,633**	0,800**	0,789**	-0,055	0,377*	-
DZ	0,349*	0,322*	0,393*	0,550*	0,300*	0,373*	0,440**	0,375**	0,382**	0,306**	0,302*	0,286*	0,322*	0,487*	0,467*	0,084	0,183*	0,100

(*): significativo para un $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

BN, SL, BO y DZ). Las localidades del sur, Irlanda y GB carecen de haplotipos típicos del norte, pero su haplotipo principal (H2) se encuentra a baja frecuencia en algunas localidades del norte y sur del Mar del Norte.

El AMOVA se realizó con los tres grupos de localidades establecidos según los marcadores microsátélite (datos no mostrados), sin embargo se obtuvo un mejor ajuste al considerar los grupos revelados por la distribución haplotípica (Tabla 4.10), detectándose un porcentaje significativo del 42,10% de la varianza distribuida entre los grupos y un 4,96% entre las localidades dentro de los grupos.

Tabla 4.10. AMOVA basado en el gen citocromo b. Los grupos incluyen: (i) las localidades del sur, Irlanda y GB (MO, AV, BR, CO, AR, RO, TH, DB y SO); (ii) sur del Mar del Norte (OS, LA y SY); y (iii) localidades del norte (LF, NM, FL, BN, SL, BO y DZ)

Fuente de variación	Porcentaje de variación	P-valor
Entre grupos	42,10	<0,001*
Entre poblaciones dentro de los grupos	4,96	<0,001*
Dentro de las poblaciones	52,94	<0,001*

Índices de fijación: $F_{ct}=0,421$; $F_{sc}=0,086$; $F_{st}=0,471$; (*): significativo para un $\alpha=0,05$

El test de Mantel no fue significativo al analizar el total de las localidades ($R^2=0,04$; $P=0,057$), sin embargo reveló la existencia de correlación significativa entre las distancias genética y geográfica al agrupar las localidades del sur, Irlanda y GB, explicando un 23,5% de la variación observada ($R^2=0,235$; $P=0,011$). Al analizar conjuntamente las localidades del norte y las del sur del Mar del Norte, el resultado no fue significativo ($R^2=0,0003$; $P=0,490$).

4.3.2.3. Inferencia demográfica

La red de haplotipos muestra una estructura estrellada, característica de los procesos de expansión poblacional, centrada en H2, el haplotipo más frecuente de la región sur/Irlanda/GB (Figura 4.4). Además pueden distinguirse otras dos estructuras en estrella menos definidas: una centrada en el haplotipo principal del sur del Mar del Norte (H1) y la otra en el haplotipo característico de las localidades del norte (H4). Los análisis de *mismatches* (Figura 4.5) mostraron una distribución unimodal en la región

sur/Irlanda/GB, en consonancia tanto con los valores negativos y significativos de los estadísticos D de Tajima y F_s de Fu como con el valor significativo del estadístico R_2 de Ramos-Onsís (Tabla 4.11), indicando un proceso de expansión poblacional en esta región. El sur del Mar del Norte y la región norte mostraron tests de neutralidad no significativos, y sus distribuciones de *mismatches* mostraron gráficos con topologías multimodales (Figura 4.5), lo que podría ser indicativo de equilibrio demográfico o zona de contacto secundario.

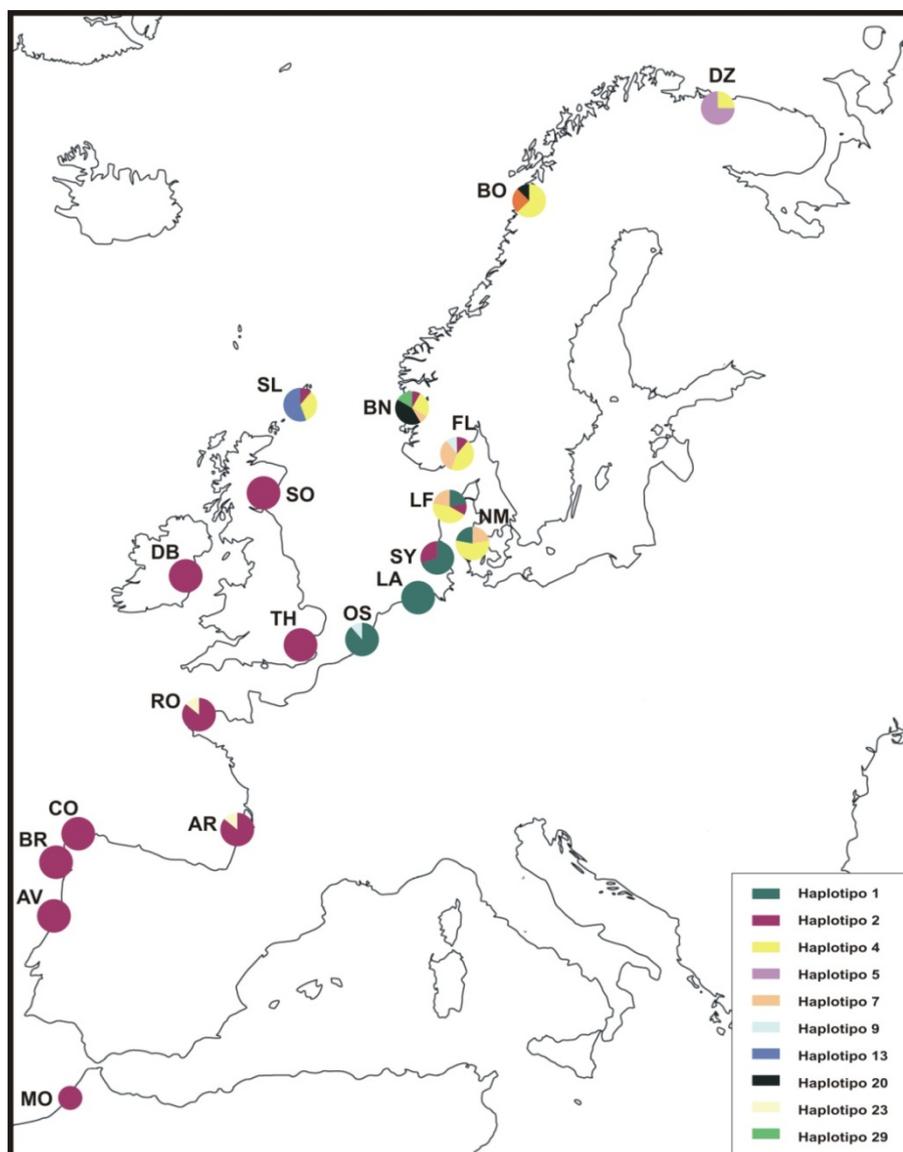


Figura 4.3. Distribución de haplotipos del gen citocromo b en las localidades de estudio. Los haplotipos se representan con colores y los sectores de los gráficos son proporcionales a las frecuencias haplotípicas. Los haplotipos únicos no aparecen representados

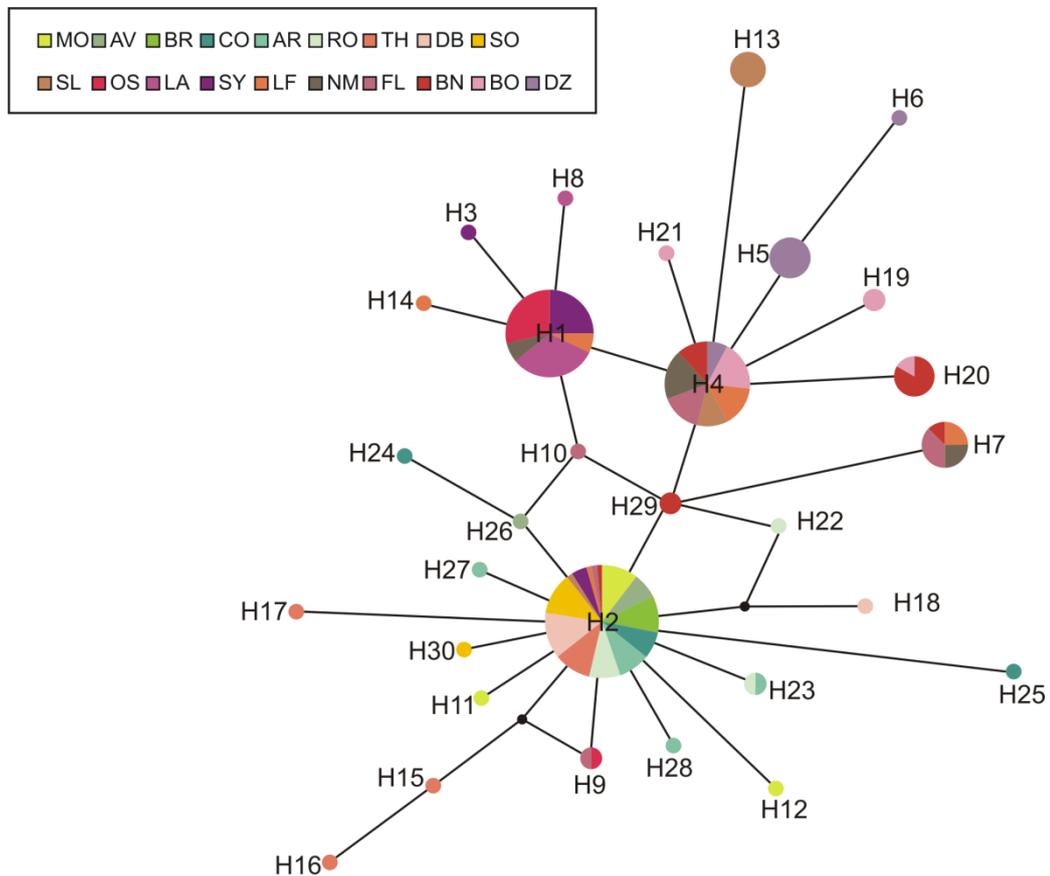


Figura 4.4. Red de haplotipos obtenida para el gen citocromo b. Las localidades se representan con colores y los sectores de los gráficos son proporcionales a la frecuencia del haplotipo en cada localidad

Tabla 4.11. Tests de neutralidad para las tres regiones geográficas inferidas a partir del gen citocromo b

Región	F_s	P -valor	D	P -valor	R_2	P -valor
Sur/Irlanda/GB	-15,822	0,000	-2,540	0,000	0,030	0,018
Sur del Mar del Norte	-0,857	0,284	-1,125	0,169	0,078	0,067
Norte	-4,694	0,030	-1,029	0,163	0,066	0,165

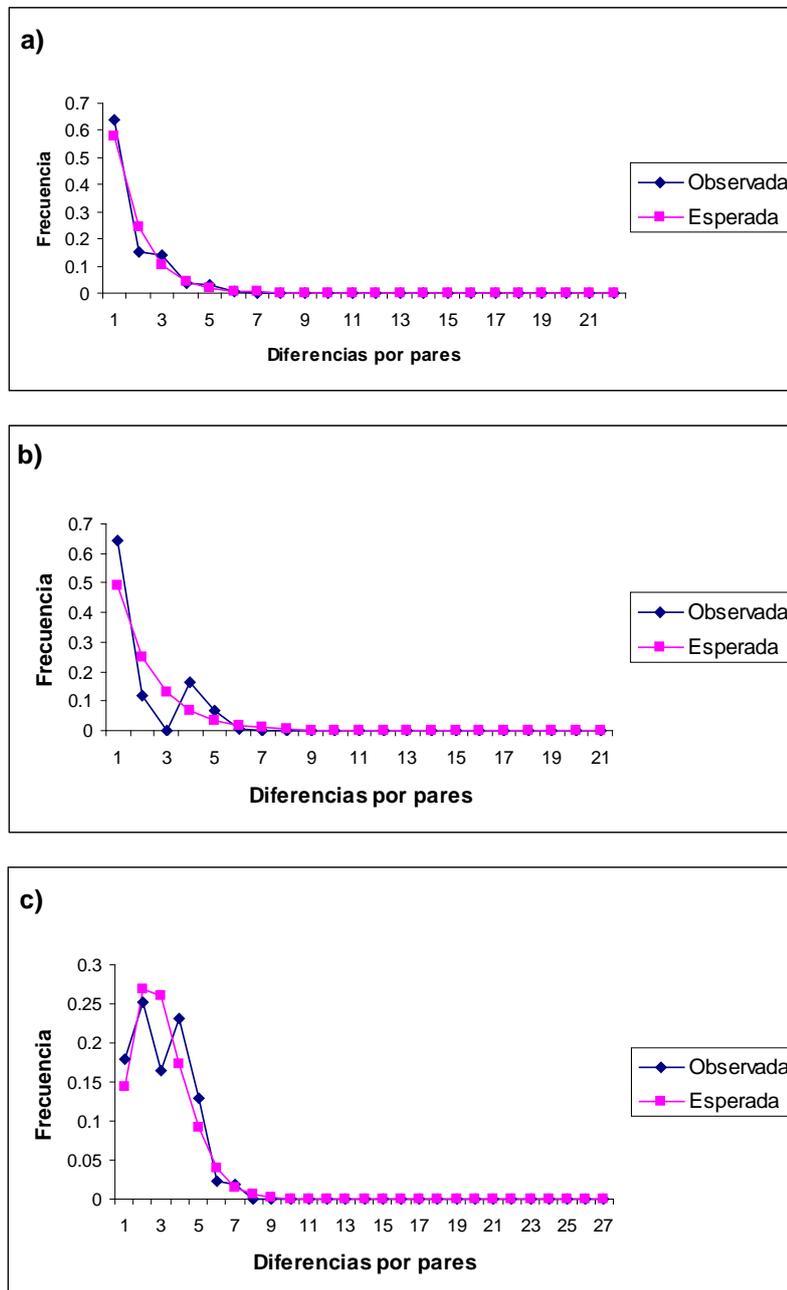


Figura 4.5. Distribución de *mismatches* en la región sur/Irlanda/GB (a), sur del Mar del Norte (b) y región norte (c)

4.4. Discusión

En este estudio se realiza por primera vez en *C. edule* un análisis genético-poblacional a lo largo del rango de distribución geográfica de la especie basado tanto en marcadores nucleares (microsatélites) como mitocondriales (gen citocromo b). Por las diferencias en la dinámica evolutiva y el modo de herencia, el contraste de los patrones genéticos revelados por ambos tipos de marcadores mejora la caracterización genética y la comprensión de la historia evolutiva de las poblaciones, al proporcionar una visión más completa del nivel y distribución de la diversidad genética así como de la diferenciación poblacional de esta especie con elevado impacto ecológico y comercial.

Tanto los microsatélites como el gen citocromo b revelaron una diversidad genética considerable en *C. edule*, con valores globales de riqueza alélica, heterozigosidad esperada y diversidad haplotípica de 27,026, 0,746 y 0,799 respectivamente. Atendiendo a la heterozigosidad esperada global, la estima obtenida es equiparable a la de la especie congénérica *C. glaucum* ($H_e=0,740$, Tarnowska *et al.*, 2010) e intermedia en relación con las de otros bivalvos de la costa europea (Huvet *et al.*, 2000; Launey *et al.*, 2002; Arias *et al.*, 2010; Becquet *et al.*, 2012; Borrell *et al.*, 2014). La diversidad haplotípica global es superior a la de las almejas *Artica islandica* ($H_d=0,687$, Dahlgren *et al.*, 2000) y *V. pullastra* ($H_d=0,620$, Pereira, 2013), las únicas especies de bivalvos para las que se ha evaluado la diversidad genética en el gen citocromo b hasta la fecha. Especies de gasterópodos también mostraron menor diversidad haplotípica en el gen citocromo b (Small y Gosling, 2000a,b; Lee y Boulding, 2009). En comparación con la diversidad haplotípica del gen COI, el valor obtenido en este estudio es semejante al estimado por Krakau *et al.* (2012) al analizar prácticamente las mismas localidades de *C. edule* ($H_d=0,866$) y más alto que el obtenido en el berberecho *C. glaucum* ($H_d=0,633$, Tarnowska *et al.*, 2010).

Los principales parámetros de diversidad genética (R_s , H_e , H_o y H_d) mostraron diferentes patrones de variación geográfica. Al representar el valor de estos parámetros frente a la latitud de las localidades muestreadas, tanto la heterozigosidad observada como la esperada presentaron los valores más altos a latitudes intermedias (Irlanda, GB y sur del Mar del Norte). Sin embargo, la tendencia de la riqueza alélica fue disminuir

progresivamente al aumentar la latitud, y la de la diversidad haplotípica fue aumentar, aunque en este caso con menor apoyo estadístico. Las diferencias en los patrones de riqueza alélica y heterocigosidad podrían responder a que ambos parámetros muestran una sensibilidad diferente a los cambios demográficos. El hecho de que los valores más altos de riqueza alélica se encuentren en las localidades del sur podría estar relacionado con el escenario de expansión poblacional inferido a partir de varios análisis demográficos (ver más adelante). En procesos de expansión cabe esperar un exceso aparente del número de alelos, la mayoría de origen reciente y a baja frecuencia en la población, lo que generaría un exceso de diversidad alélica y una reducción transitoria de la heterocigosidad respecto a lo esperado en una población en equilibrio mutación-deriva (Maruyama y Fuerst, 1984). Por otro lado, la existencia de discrepancias en la diversidad reflejada por marcadores mitocondriales y microsatélite se ha señalado en estudios previos, atribuyéndose generalmente a sesgos en la dispersión de los sexos, cuellos de botella o barridos selectivos (Brito, 2007; Hoffman *et al.*, 2009). Dado que en *C. edule* la dispersión tiene lugar durante la fase de larva planctónica, mucho antes de que se pudiesen manifestar potenciales diferencias de comportamiento relacionadas con la determinación sexual, es poco probable que la existencia de diferencias en la tasa de dispersión entre sexos sea la causa de las discrepancias observadas entre ambos tipos de marcadores. La ausencia de evidencias sobre reducciones drásticas del tamaño poblacional en las muestras analizadas permite igualmente descartar cuellos de botella. Teniendo en cuenta que el genoma mitocondrial animal por norma general no sufre recombinación (Birky, 2001), cualquier codón afectado por la selección producirá un efecto *hitch-hicking* sobre el conjunto de la molécula, haciéndola particularmente sensible a los barridos selectivos. No obstante, aunque el *hitch-hicking* tiene el potencial de modelar la diversidad mitocondrial, las evidencias empíricas de barridos selectivos son escasas (Ballard y Whitlock, 2004; Dowling *et al.*, 2008; Karl *et al.*, 2012) y su efecto real es bastante incierto.

Es de destacar la ausencia de diversidad haplotípica mitocondrial en localidad española de Boiro, mientras que para los marcadores microsatélite no se detectaron diferencias de variabilidad respecto a las localidades adyacentes. Esto podría ser un reflejo de las diferentes dinámicas evolutivas de ambos tipos de marcadores: el ADNmt, al tener un tamaño efectivo poblacional cuatro veces menor que el del ADN nuclear, es más

propenso a los efectos de la deriva genética (Ferguson *et al.*, 1995; Ballard y Whitlock, 2004; Zink y Barrowclough, 2008). Sin embargo, también podría deberse a diferencias en el tamaño muestral, considerablemente menor en los análisis del gen citocromo b, lo que podría haber impedido la detección de haplotipos presentes a bajas frecuencias.

Tanto los microsatélites como el gen citocromo b detectaron la existencia de estructura genética significativa en *C. edule* a lo largo de su rango de distribución, en consonancia con estudios previos realizados con marcadores alozímicos (Beaumont *et al.*, 1980; Beaumont y Pether, 1996), el gen mitocondrial COI (Krakau *et al.*, 2012) y marcadores microsatélite (Coscia *et al.*, 2013). En el estudio geográficamente más amplio realizado hasta el momento, Krakau *et al.* (2012) propusieron la existencia de dos grupos de poblaciones, uno en el norte y otro en el sur, coincidiendo el límite de separación con el Canal de la Mancha. Los datos obtenidos en este estudio confirman este patrón de estructuración norte-sur, pero aportan evidencias de un patrón de diferenciación genética más complejo. Los marcadores microsatélite indicaron la existencia de un grupo sur de poblaciones que comprende las localidades examinadas desde Marruecos hasta Francia, un grupo norte de poblaciones que incluye las localidades desde Dinamarca hasta Rusia además de la localidad escocesa de SL, y un tercer grupo formado por las demás localidades de las Islas Británicas y zona sur del Mar del Norte. En lo que respecta al gen citocromo b, los valores F_{st} apoyaron el patrón de diferenciación detectado por los marcadores microsatélite, pero la distribución geográfica de haplotipos y los AMOVAs revelaron un escenario de tres grupos donde el grupo norte comprende las mismas localidades, pero el grupo sur engloba también las localidades de Irlanda y GB, y las localidades del sur del Mar del Norte componen el tercer grupo. Por tanto, ambos tipos de marcadores revelan un patrón de diferenciación con tres grupos poblacionales, pero difieren en la delimitación del grupo intermedio.

El núcleo del grupo sur de poblaciones (MO, AV, BR, CO, AR y RO) se caracteriza por presentar una alta homogeneidad genética, sin que se hayan detectado diferencias significativas entre las localidades, lo que concuerda con resultados previos de otras especies marinas en la misma área geográfica (Durán *et al.*, 2004; Triantafyllidis *et al.*, 2005; Couceiro *et al.*, 2007; Xavier *et al.*, 2012). Tanto las corrientes oceánicas como procesos demográficos podrían jugar un papel destacado en aumentar la conectividad

entre estas localidades. El flujo de agua a lo largo de la costa Atlántica de la Península Ibérica está dirigido por la *Iberian Poleward Current*, que fluye en dirección norte desde el sur de Portugal hasta el Cabo Fisterra, después hacia el este a lo largo del Mar Cantábrico y de nuevo en dirección norte en el Golfo de Vizcaya (Frouin *et al.*, 1990; Haynes y Barton, 1990) y por el Sistema de Corrientes de Portugal, que fluye a lo largo de la costa portuguesa en ambas direcciones (Bischof *et al.*, 2003). En el límite sur de la Península Ibérica, el movimiento del agua está dirigido por la rama este de la Corriente de las Azores, que entra en el Golfo de Cádiz y se dirige hacia el sur, actuando como un medio de transporte de larvas entre las costas del sur de Europa y del noroeste africano (Martins *et al.*, 2002). Estos sistemas de corrientes que fluyen en sentido opuesto son un factor fundamental en la dinámica de dispersión y estructura de población de los animales marinos en estas regiones (Monteiro *et al.*, 1997). Por otro lado, la ausencia de estructura genética en la región sur podría estar también influenciada por un proceso de expansión poblacional reciente. La existencia de este proceso se ve reflejada en la red de haplotipos, en la que los haplotipos presentes en las localidades del sur conforman un patrón de estrella centrado en el haplotipo H2, así como en la distribución unimodal de *mismatches* y en los resultados significativos obtenidos en el test *k intralocus* y los tests de neutralidad. Alternativamente, la recuperación subsiguiente a un cuello de botella o a un barrido selectivo podría dar lugar a un patrón genético similar al generado por un fenómeno de expansión poblacional, ya que al reducirse la diversidad aumentaría la homogeneidad genética y con ello las estimas de flujo génico entre las poblaciones (Tajima, 1989). Sin embargo, no se detectó ninguna señal de cuello de botella en este grupo de poblaciones, y es poco probable que se hayan producido barridos selectivos en múltiples marcadores nucleares no ligados y en marcadores mitocondriales (Strasser y Barber, 2009).

En contraste con el grupo sur, el grupo norte de poblaciones muestra límites bien definidos y claras evidencias de cierto nivel de estructuración interna, con las localidades de SL, BO y DZ genéticamente diferentes entre ellas y a la mayor parte sino todas las localidades del grupo (NM, LF, FL y BN). La presencia del haplotipo único H5 a alta frecuencia en la muestra de DZ, sugiere que esta localidad ha permanecido aislada de las demás durante cierto tiempo. Una situación similar puede inferirse para la localidad escocesa de SL, en la que el haplotipo único H13 aparece con una frecuencia

relativamente alta. Dado que las localidades de SL, BO y DZ están más próximas al límite norte de distribución de la especie, es de esperar que estén sujetas a presiones selectivas más intensas al habitar en un ambiente más extremo. La adaptación a las condiciones locales a través del aislamiento y la selección podría explicar la diferenciación genética detectada. Además, las poblaciones cercanas a los extremos de distribución de las especies son particularmente propensas a la deriva genética (Lesica y Allendorf, 1995), lo que da lugar a la fijación o pérdida de haplotipos, y a la divergencia genética entre las poblaciones. Si estos procesos fuesen la causa de la divergencia observada en el grupo norte, deberían conllevar una disminución de la diversidad haplotípica, lo que sólo se observa en la localidad más septentrional DZ.

El mayor nivel de diversidad haplotípica observado en el gen citocromo b en el grupo norte de poblaciones respecto al del sur probablemente indica la existencia en el pasado de varios refugios. Dada la tasa de mutación del ADNmt (Nikula y Väinölä, 2003; Lee y Boulding, 2009; Krakau *et al.*, 2012), la mayoría de los polimorfismos que implican diferencias de más de una posición nucleotídica seguramente son anteriores al LGM. Por tanto, la existencia de dos diferencias nucleotídicas entre los haplotipos principales del norte (H4) y del sur (H2) sugieren que la divergencia entre ambos tuvo lugar antes del LGM, lo que apoyaría la existencia de refugios en las regiones del norte, donde al menos una población con el haplotipo H4 pudo sobrevivir a las glaciaciones, como propusieron Krakau *et al.* (2012) y Tarnowska *et al.* (2012). La existencia de un refugio en la costa norte de Noruega ha sido sugerida para otras especies marinas (Van Oppen *et al.*, 1995).

La región de Irlanda/GB/sur del Mar del Norte podría representar una zona de contacto secundario colonizada por individuos procedentes tanto de refugios del norte como del sur cuando los hielos se retiraron tras el LGM. La mezcla de linajes genéticos debida a la recolonización del hábitat a partir de distintos refugios puede dar lugar a una diversidad genética alta, como es el caso de esta región a tenor de la distribución de la heterocigosidad en función de la latitud (Figura 4.1). Otras evidencias de contacto secundario son los coeficientes de pertenencia de los individuos en el análisis bayesiano de agrupación para $K=2$, la baja proporción de haplotipos privados encontrados en el sur del Mar del Norte para el gen citocromo b, así como la distribución multimodal de

mismatches, un patrón que es indicativo de mezcla de poblaciones (Awise, 2000). Teniendo en cuenta que la expansión poblacional del grupo norte fue anterior a la del grupo sur (Krakau *et al.*, 2012), el haplotipo dominante en el sur del Mar del Norte (H1), con sólo una posición nucleotídica diferente respecto al haplotipo del norte H4, probablemente no constituye un haplotipo ancestral, sino que divergió a partir de H4 durante o después de la expansión hacia el sur del grupo norte de poblaciones (*i.e.* tras el LGM). Debido al alto potencial de dispersión de *C. edule* es probable que éste haya recolonizado rápidamente áreas previamente cubiertas por el hielo convertidas posteriormente en hábitats óptimos para la especie, entre ellas el Mar del Norte. Con la retirada del hielo y la formación del Mar del Norte, esa área ofrecía una zona arenosa de aguas poco profundas que constituye una zona de contacto secundario para otras especies marinas (Gysels *et al.*, 2004; Chevolot *et al.*, 2006; Nikula *et al.*, 2007; Derycke *et al.*, 2008).

Las corrientes oceánicas han podido jugar un papel relevante en la colonización de las costas de Irlanda, GB y sur del Mar del Norte por individuos procedentes de las áreas de refugio. La llegada de individuos procedentes de los refugios del sur pudo verse beneficiada por la entrada de una rama de la Corriente del Atlántico Norte en el Mar del Norte (Turrel, 1992), lo que explicaría que sólo en la región de Skagerrak/Mar del Norte se solapen las distribuciones de los haplotipos principales del sur (H2) y del norte (H4). Por otro lado, los individuos originarios del norte pudieron alcanzar Skagerrak y Kattegat mediante la entrada de un brazo del Mar de Noruega (Coyer *et al.*, 2003).

La alta frecuencia del haplotipo H2 en las localidades de TH, DB y SO, unida a su ausencia o baja frecuencia en la región del sur del Mar de Norte y Skagerrak, apoya la idea de que los individuos procedentes del sur se vieron forzados a expandirse alrededor de las Islas Británicas hacia la zona norte del Mar del Norte. Esto concuerda con el aislamiento por distancia detectado tanto por los microsátélites como por el gen citocromo b (explicando un 32% y un 23% de la variación, respectivamente) al analizar conjuntamente las localidades del sur, Irlanda y GB. También es compatible con los patrones de circulación de agua, ya que su afluencia a largo plazo a través del Estrecho de Dover (Canal de la Mancha) es mucho menor que la que llega desde el Atlántico hacia la zona norte del Mar del Norte (Turrell, 1992), en consonancia con restricciones

al flujo génico entre el este y oeste del Canal de la Mancha (Dupont *et al.*, 2003) detectadas en muchas especies de invertebrados marinos (Roman y Palumbi, 2004; Jolly *et al.*, 2005; Derycke *et al.*, 2008; Krakau *et al.*, 2012; Tarnowska *et al.*, 2012). Mientras los haplotipos procedentes de la región del sur se expandieron hacia el Mar del Norte, ningún haplotipo del norte, incluido H4, se encuentra en localidades al sur del Canal de la Mancha, lo que indica que los haplotipos originados en poblaciones del norte no han podido expandirse al sur. No sólo el Canal de la Mancha, sino también la circulación de agua en el centro y norte del Mar del Norte, con un patrón de movimiento contrario a las agujas del reloj (Kautsky, 1973; Prandle, 1984; Kershaw y Baxter, 1995), podría actuar reteniendo las larvas y, en consecuencia, como una barrera a su dispersión (Brown *et al.*, 1999).

La existencia de un escenario de contacto secundario puede ser una de las razones que subyacen a las discrepancias en los resultados obtenidos con los marcadores microsatélite y el gen citocromo b. Taxones con grupos aislados durante largos periodos de tiempo y que actualmente están en contacto secundario, como parece ser el caso de *C. edule*, frecuentemente muestran discrepancias biogeográficas nuclear-mitocondriales. Tras producirse el contacto secundario, las poblaciones genéticamente diferenciadas se cruzan entre ellas en mayor o menor medida, formando zonas híbridas donde cabe esperar diferentes patrones de flujo génico entre los dos genomas (Toews y Brelsford, 2012).

Conclusiones

1. La construcción de una genoteca enriquecida en secuencias microsatélite permitió desarrollar los primeros marcadores microsatélite en *C. edule*. Se han caracterizado 12 *loci* polimórficos no ligados e identificado otros 15 presumiblemente también polimórficos, lo cual proporciona herramientas útiles para futuros estudios genéticos en este berberecho.
2. Para facilitar el genotipado de marcadores microsatélite a gran escala se han optimizado dos PCRs *multiplex* que amplifican cada una cuatro *loci* simultáneamente.
3. Se aportan las primeras estimas de diversidad genética para la región noroeste de la Península Ibérica, sometida a una intensa explotación, encontrándose valores similares en todas las localidades analizadas y dentro del rango estimado en bivalvos explotados en la misma región.
4. Las localidades analizadas en la región noroeste de la Península Ibérica mostraron homogeneidad genética, con tasas de migración elevadas. No obstante, la localidad de Ferrol mostró una diferenciación débil pero significativa respecto a localidades situadas al sur del entorno del Cabo Fisterra. Es probable que la localización de Ferrol en un enclave cerrado determine la diferenciación genética observada, aunque también puede relacionarse con una posible barrera oceanográfica a la altura del Cabo Fisterra o con la varianza en el éxito reproductivo. El análisis de muestras temporales y más localidades de las Rías Altas permitirá determinar las causas de la diferenciación detectada.
5. Las estimas obtenidas en el ámbito de distribución de la especie indican que globalmente *C. edule* tiene una diversidad genética alta, tanto en marcadores microsatélite como en el gen mitocondrial citocromo b, analizado también por primera vez en este estudio, y equiparable en los *loci* nucleares a la de *C. glaucum*, una especie congénica con la que puede cohabitar. Geográficamente, se aprecian diferentes patrones de variación en los principales parámetros de diversidad: la mayor heterocigosidad observada y esperada se encuentra a latitudes intermedias,

mientras que la riqueza alélica disminuye al aumentar la latitud y la diversidad haplotípica, con menor apoyo estadístico, aumenta.

6. Tanto los marcadores microsatélite como el gen citocromo b corroboran que *C. edule* muestra una estructuración genética significativa a lo largo de su rango de distribución geográfica. Ambos tipos de marcadores desvelan un escenario con tres grupos de poblaciones: un grupo sur, uno norte y otro intermedio dentro de la región de Irlanda/GB/sur del Mar del Norte, pero difieren en la delimitación de los grupos sur e intermedio.
7. El núcleo del grupo sur de poblaciones destaca por su homogeneidad genética, atribuible al sistema de corrientes marinas y a un proceso de expansión poblacional reciente. El grupo norte es heterogéneo por la diferenciación genética de las localidades más septentrionales, debido probablemente al ambiente extremo del límite de distribución de la especie, y muestra indicios de la existencia de refugios durante el Último Máximo Glacial. El grupo de poblaciones de la región de Irlanda/GB/sur del Mar del Norte podría constituir una zona de contacto secundario.
8. Los datos obtenidos podrán servir de referencia en la monitorización de la variación genética de las poblaciones naturales, necesaria para la conservación y gestión del recurso, y en estudios destinados a desvelar los factores intrínsecos y extrínsecos que modulan la biodiversidad en el ecosistema costero.

Bibliografía

- Abdelkrim J, Robertson BC, Stanton JA, Gemmell NJ (2009) Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *Biotechniques* **46**, 185-192.
- Allendorf FW, England PR, Luikart G, Ritchie PA, Ryman N (2008) Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology and Evolution* **23**, 327-337.
- Allendorf FW, Luikart G, Aitken SN (2013) *Conservation and the genetics of populations* (2nd edition). Wiley-Blackwell, Oxford.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- An HS, Kim EM, Park JY (2009) Isolation and characterization of microsatellite markers for the clam *Ruditapes philippinarum* and cross-species amplification with the clam *Ruditapes variegata*. *Conservation Genetics* **10**, 1821-1823.
- André C, Jonsson PR, Lindegarth M (1993) Predation on settling bivalve larvae by benthic suspension feeders: the role of hydrodynamics and larval behaviour. *Marine Ecology Progress Series* **97**, 183-192.
- André C, Lindegarth M (1995) Fertilization efficiency and gamete viability of a sessile, free-spawning bivalve, *Cerastoderma edule*. *Ophelia* **43**, 215-227.
- André C, Lindegarth M, Jonsson PR, Sundberg P (1999) Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **79**, 563-565.
- Arias A, Freire R, Pablo de La Roche J, Román G, Méndez J, Insua A (2011a) Identification, inheritance, and variation of microsatellite markers in the black scallop *Mimachlamys varia*. *Biochemical Genetics* **49**, 139-152.
- Arias A, Fernández-Moreno M, Fernández-Tajes J, Gaspar MB, Méndez J (2011b) Strong genetic differentiation among east Atlantic populations of the sword razor shell (*Ensis siliqua*) assessed with mtDNA and RAPD markers. *Helgolander Marine Research* **65**, 81-89.
- Arias A, Freire R, Méndez J, Insua A (2010) Isolation and characterization of microsatellite markers in the queen scallop *Aequipecten opercularis* and their application to a population genetic study. *Aquatic Living Resources* **23**, 199-207.
- Arias-Pérez A, Fernández-Tajes J, Gaspar MB, Méndez J (2012) Isolation of microsatellite markers and analysis of genetic diversity among east Atlantic populations of the sword razor shell *Ensis siliqua*: a tool for population management. *Biochemical Genetics* **50**, 397-415.

- Astane I, Gosling E, Wilson J, Powell E (2005) Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Molecular Ecology* **14**, 1655-1666.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Avise JC (2004) *Molecular markers, natural history and evolution* (2nd edition). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- B**alaresque P (2007) Microsatellites: life cycle concept and neutrality issues. *M S-Medecine Sciences* **23**, 729-734.
- Ballard JWO (2000) Comparative genomics of mitochondrial DNA in members of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Journal of Molecular Evolution* **51**, 48-63.
- Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* **13**, 729-744.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* **16**, 37-48.
- Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C (2007) Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* **16**, 3759-3767.
- Beaumont AR, Day TR, Gade G (1980) Genetic variation at the octopine dehydrogenase locus in the adductor muscle of *Cerastoderma edule* (L) and six other bivalve species. *Marine Biology Letters* **1**, 137-148.
- Beaumont AR, Pether SMJ (1996) Allozyme variation and gene flow between cockle *Cerastoderma edule* populations in southern United Kingdom. *Fisheries Research* **28**, 263-275.
- Becquet V, Simon-Bouhet B, Pante E, Hummel H, Garcia P (2012) Glacial refugium versus range limit: conservation genetics of *Macoma balthica*, a key species in the Bay of Biscay (France). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **432**, 73-82.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier.
- Bensasson D, Zhang DX, Hartl DL, Hewitt GM (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution* **16**, 314-321.
- Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* **27**, 573-580.

- Beukema JJ (1979) Biomass and species richness of the macrobenthic animals living on a tidal flat area in the Dutch Wadden Sea: effects of a severe winter. *Netherlands Journal of Sea Research* **13**, 203-223.
- Bilgin R (2007) Kgtests: a simple Excel Macro program to detect signatures of population expansion using microsatellites. *Molecular Ecology Notes* **7**, 416-417.
- Billote N, Lagoda PJJ, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* **54**, 277-288.
- Birky CW (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics* **35**, 125-148.
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1522.
- Bischof B, Mariano AJ, Ryan EH (2003) The Portugal Current System. Ocean Surface Currents. Disponible en: <http://oceancurrents.rsmas.miami.edu/atlantic/portugal.html>. Consultado el 23/01/2014.
- Boomer JJ, Stow AJ (2010) Rapid isolation of the first set of polymorphic microsatellite loci from the Australian gummy shark, *Mustelus antarcticus* and their utility across divergent shark taxa. *Conservation Genetics Resources* **2**, 393-395.
- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* **27**, 1767-1780.
- Borrell YJ, Arias-Pérez A, Freire R, Valdés A, Sánchez JA, Méndez J, Martínez D, López J, Carleos C, Blanco G, Insua AM (2014) Microsatellites and multiplex PCRs for assessing aquaculture practices of the grooved carpet shell *Ruditapes decussatus* in Spain. *Aquaculture* **426-427**, 49-59.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* **32**, 314-331.
- Boyden CR (1972) The behaviour, survival and respiration of the cockles *Cerastoderma edule* and *C. glaucum* in air. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom* **52**, 661-680.
- Boyle EE, Etter RJ (2013) Heteroplasmy in a deep-sea protobranch bivalve suggests an ancient origin of doubly uniparental inheritance of mitochondria in Bivalvia. *Marine Biology* **160**, 413-422.
- Brito PH (2007) Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite genetic structure among western European populations of tawny owls (*Strix aluco*). *Molecular Ecology* **16**, 3423-3437.

- Brock V (1978) Morphological and biochemical criteria for separation of *Cardium glaucum* (Bruguiere) from *Cardium edule* (L). *Ophelia* **17**, 207-214.
- Brock V (1980) The geographical distribution of *Cerastoderma* [*Cardium*] *edule* (L) and *Cerastoderma lamarcki* (Reeve) in the Baltic and adjacent seas related to salinity and salinity fluctuations. *Ophelia* **19**, 207-214.
- Brock V (1987) Genetic relations between the bivalves *Cardium* (*Cerastoderma*) *edule*, *Cardium lamarcki* and *Cardium glaucum*, studied by means of crossed immunoelectrophoresis. *Marine Biology* **93**, 493-498.
- Brock V, Christiansen G (1989) Evolution of *Cardium* (*Cerastoderma*) *edule*, *Cardium lamarcki* and *Cardium glaucum*: studies of DNA variation. *Marine Biology* **102**, 505-511.
- Brock V (1991) *An interdisciplinary study of evolution in the cockles Cardium (Cerastoderma) edule, C. glaucum and C. lamarcki*. Vestjyds, Vinderup, Denmark.
- Brohede J, Ellegren H (1999) Microsatellite evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **266**, 825-833.
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* **5**, 453-455.
- Brown J, Hill AE, Fernand L, Horsburgh KJ (1999) Observations of a seasonal jet-like circulation at the central North Sea cold pool margin. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **48**, 343-355.
- Brown WM, George M, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**, 1967-1971.
- Buschiazzo E, Gemmell NJ (2006) The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays* **28**, 1040-1050.
- Cardoso JFMM, Witte JIJ, van der Veer HW (2009) Differential reproductive strategies of two bivalves in the Dutch Wadden Sea. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **84**, 37-44.
- Carlsson J (2008) Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* **99**, 616-623.
- Carlsson J, Morrison CL, Reece KS (2006) Wild and aquaculture populations of the eastern oyster compared using microsatellites. *Journal of Heredity* **97**, 595-598.

- Carlsson J, Reece KS (2007) Eight PCR primers to amplify EST-linked microsatellites in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* genome. *Molecular Ecology Notes* **7**, 257-259.
- Castoe TA, Poole AW, Gu W, Jason de Koning AP, Daza JM, Smith EN, Pollock DD (2010) Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite loci from modest amounts of 454 shotgun genome sequence. *Molecular Ecology Resources* **10**, 341-347.
- Chacón G, Arias-Pérez A, Méndez J, Insua A, Freire R (2013) Development and multiplex PCR amplification of microsatellite markers in the commercial clam *Venerupis rhomboides* (Mollusca: Bivalvia). *Molecular Biology Reports* **40**, 1625-1630.
- Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, Deka R (1997) Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 1041-1046.
- Chambers GK, MacAvoy ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology* **126**, 455-476.
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 621-631.
- Charlesworth B (1998) Measures of divergence between populations and the effect of forces that reduce variability. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 538-543.
- Chenuil A (2006) Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica* **127**, 101-120.
- Chevolot M, Hoarau G, Rijnsdorp AD, Stam WT, Olsen JL (2006) Phylogeography and population structure of thornback rays (*Raja clavata* L., Rajidae). *Molecular Ecology* **15**, 3693-3705.
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FAM (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: a review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* **255**, 1-29.
- Comes HP, Kadereit JW (1998) The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* **3**, 432-438.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* **144**, 2001-2014.
- Coscia I, Robins PE, Porter JS, Malham SK, Ironside JE (2013) Modelled larval dispersal and measured gene flow: seascape genetics of the common cockle *Cerastoderma edule* in the southern Irish Sea. *Conservation Genetics* **14**, 451-466.

- Couceiro L, Barreiro R, Ruiz JM, Sotka EE (2007) Genetic isolation by distance among populations of the netted dog whelk *Nassarius reticulatus* (L.) along the European Atlantic coastline. *Journal of Heredity* **98**, 603-610.
- Coyer JA, Peters AF, Stam WT, Olsen JL (2003) Post-ice age recolonization and differentiation of *Fucus serratus* L. (Phaeophyceae; Fucaceae) populations in Northern Europe. *Molecular Ecology* **12**, 1817-1829.
- Creek GA (1960) The development of the lamellibranch *Cardium edule* L. *Proceedings of the Zoological Society of London* **135**, 243-260.
- Crow JF, Kimura M (1970) *An Introduction to Population Genetics Theory*. Harper and Row, New York.
- Cruz F, Pérez M, Presa P (2005) Distribution and abundance of microsatellites in the genome of bivalves. *Gene* **346**, 241-247.
- D**abouineau L, Ponsero A (2009) Synthesis on biology of common European cockle *Cerastoderma edule*. Disponible en: <http://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00581394/en/>. Consultado el 28/10/2013.
- da Costa F, Martínez-Patino D, Ojea J, Nóvoa S (2010) Larval rearing and spat production of the razor clam *Ensis siliqua* (Bivalvia: Pharidae). *Journal of Shellfish Research* **29**, 347-351.
- Dahlgren TG, Weinberg JR, Halanych KM (2000) Phylogeography of the ocean quahog (*Arctica islandica*): influences of paleoclimate on genetic diversity and species range. *Marine Biology* **137**, 487-495.
- Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* **12**, 499-510.
- Dawson AG (1992) *Ice age earth. Late Quaternary Geology and Climate*. Routledge, London.
- de Montaudouin (1997) Potential of bivalves' secondary settlement differ with species: a comparison between cockle (*Cerastoderma edule*) and clam (*Ruditapes philippinarum*) juvenile resuspension. *Marine biology* **128**, 639-648.
- Denton GH, Hughes TJ (1981) *The last great ice sheets*. Wiley and Sons, New York.
- Derycke S, Remerie T, Backeljau T, Vierstraete A, Vanfleteren J, Vincx M, Moens T (2008) Phylogeography of the *Rhabditis (Pellioiditis) marina* species complex: evidence for long-distance dispersal, and for range expansions and restricted gene flow in the northeast Atlantic. *Molecular Ecology* **17**, 3306-3322.

- Díaz S, Villalba A, Insua A, Soudant P, Fernández-Tajes J, Méndez J, Carballal MJ (2013) Disseminated neoplasia causes changes in ploidy and apoptosis frequency in cockles *Cerastoderma edule*. *Journal of Invertebrate Pathology* **113**, 214-219.
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human-populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3166-3170.
- Distefano G, Caruso M, La Malfa S, Gentile A, Wu S-B (2012) High resolution melting analysis is a more sensitive and effective alternative to gel-based platforms in analysis of SSR-An example in citrus. *Plos One* **7**, e44202.
- Diz AP, Presa P (2008) Regional patterns of microsatellite variation in *Mytilus galloprovincialis* from the Iberian Peninsula. *Marine Biology* **154**, 277-286.
- Diz AP, Presa P (2009) The genetic diversity pattern of *Mytilus galloprovincialis* in Galician Rias (NW Iberian estuaries). *Aquaculture* **287**, 278-285.
- Dowling DK, Friberg U, Lindell J (2008) Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution* **23**, 546-554.
- Ducrotoy JP, Rybarczyk H, Souprayen J, Bachelet G, Beukema JJ, Desprez M, Dörjes J, Essink K, Guillou J, Michaelis H, Sylvand B, Wilson JG, Elkaïm B, Ibanez F (1991) A comparison of the population dynamics of the cockle (*Cerastoderma edule*, L.) in north-western Europe. En: Elliott M and Ducrotoy JP (eds) *Estuaries and Coasts: spatial and temporal intercomparisons. Proceedings of the 19th Estuarine and Coastal Sciences Association Symposium*. Olsen and Olsen, Denmark, pp. 173-184.
- Dupont L, Jollivet D, Viard F (2003) High genetic diversity and ephemeral drift effects in a successful introduced mollusc (*Crepidula fornicata*: Gastropoda). *Marine Ecology Progress Series* **253**, 183-195.
- Durán S, Palacín C, Becerro MA, Turon X, Giribet G (2004) Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular Ecology* **13**, 3317-3328.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* **4**, 359-361.
- Edwards KJ, Barker JHA, Daly A, Jones C, Karp A (1996) Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *BioTechniques* **20**, 758-760.

- Edwards MC, Gibbs RA (1994) Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *PCR Methods and Applications* **3**, S65-S75.
- Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* **16**, 551-558.
- Estoup A, Jarne P, Cornuet JM (2002) Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* **11**, 1591-1604.
- Etter PD, Bassham S, Hohenlohe PA, Johnson EA, Cresko WA (2011) SNP discovery and genotyping for evolutionary genetics using RAD sequencing. *Methods in molecular biology* **772**, 157-178.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* **14**, 2611-2620.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* **1**, 47-50.
- F**airbrother JE, Beaumont AR (1993) Heterozygote deficiencies in a cohort of newly settled *Mytilus edulis* spat. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **73**, 647-653.
- FAO (2014) Fisheries and Aquaculture Department. FishStat Plus—Programa informático universal para series cronológicas de estadísticas pesqueras. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/es>. Consultado el 11/03/2014.
- Ferguson A, Taggart JB, Prodöhl PA, McMeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity P, Hynes RA (1995) The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology* **47**, 103-126.
- Fernández-Tajes J, Méndez J (2007) Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 7278-7282.
- Figueras A (2007) *Biología y cultivo del mejillón (Mytilus galloprovincialis) en Galicia*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Freire R, Arias A, Méndez J, Insua A (2011) Identification of European commercial cockles (*Cerastoderma edule* and *C. glaucum*) by species-specific PCR amplification of the ribosomal DNA ITS region. *European Food Research and Technology* **232**, 83-86.
- Freire R, Insua A, Méndez J (2005) *Cerastoderma glaucum* 5S ribosomal DNA: characterization of the repeat unit, divergence with respect to *Cerastoderma edule*, and PCR-RFLPs for the identification of both cockles. *Genome* **48**, 427-442.
- Frouin R, Fiuza AFG, Ambar I, Boyd TJ (1990) Observations of a poleward surface current off the coasts of Portugal and Spain during winter. *Journal of Geophysical Research: Oceans* **95**, 679-691.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* **147**, 915-925.
- Gaffney PM (1990) Enzyme heterozygosity, growth rate and viability in *Mytilus edulis*: another look. *Evolution* **44**, 204-210.
- Galindo-Sánchez CE, Gaffney PM, Pérez-Rostro CI, 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. *Journal of Shellfish Research* **27**, 721-727.
- Galtier N, Nabholz B, Glemin S, Hurst GDD (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* **18**, 4541-4550.
- Gam M, de Montaudouin X, Bazairi H (2010) Population dynamics and secondary production of the cockle *Cerastoderma edule*: A comparison between Merja Zerga (Moroccan Atlantic Coast) and Arcachon Bay (French Atlantic Coast). *Journal of Sea Research* **63**, 191-201.
- Gardeström J, Pereyra RT, Andre C (2008) Characterization of six microsatellite loci in the Baltic blue mussel *Mytilus trossulus* and cross-species amplification in North Sea *Mytilus edulis*. *Conservation Genetics* **9**, 1003-1005.
- Garvin MR, Saitoh K, Gharrett AJ (2010) Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. *Molecular Ecology Resources* **10**, 915-934.
- Goudet J (2001) Fstat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Institut d'Ecologie, Université de Lausanne, Dorigny, Switzerland. Disponible en: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.

- Grobler JP, Jones JW, Johnson NA, Neves RJ, Hallerman EM (2011) Homogeneity at nuclear microsatellite loci masks mitochondrial haplotype diversity in the endangered fanshell pearlymussel (*Cyprogenia stegaria*). *Journal of Heredity* **102**, 196-206.
- Guillou J, Bachelet G, Desprez M, Ducrottoy JP (1990) Les modalités de la reproduction de la coque (*Cerastoderma edule*) sur le littoral français de la Manche et de l'Atlantique. *Aquatic Living Resources* **3**:29–41.
- Gupta PK, Rustgi S, Sharma S, Singh R, Kumar N, Balyan HS (2003) Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics and Genomics* **270**, 315-323.
- Gysels ES, Hellemans B, Pampoulie C, Volckaert FAM (2004) Phylogeography of the common goby, *Pomatoschistus microps*, with particular emphasis on the colonization of the Mediterranean and the North Sea. *Molecular Ecology* **13**, 403-417.
- H**all TA (1999) BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.
- Hancock DA (1967) Growth and mesh selection in the edible cockle (*Cardium edule* L.). *Journal of Applied Ecology* **4**, 137-157.
- Hartl DL, Clark AG (2007) *Principles of population genetics* (4th edition). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Haynes R, Barton ED (1990) A poleward flow along the Atlantic coast of the Iberian Peninsula. *Journal of Geophysical Research: Oceans* **95**, 11425-11441.
- Hayward PJ, Ryland JS (1995) *Handbook of the marine fauna of north-west Europe*. Oxford University Press, Oxford.
- Hedgecock D (1994) Does variance in reproductive success limit effective population size of marine organisms? En: Beaumont A (ed) *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Chapman and Hall, London, pp. 122–134.
- 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*. *Journal of Shellfish Research* **23**, 379-385.
- Hedgecock D, Pudovkin AI (2011) Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: a review and commentary. *Bulletin of Marine Science* **87**, 971-1002.
- Hedrick PW (1999) Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* **53**, 313-318.

- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* **59**, 1633-1638.
- Hewitt G (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907-913.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**, 247-276.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* **68**, 87-112.
- Hilborn R, Quinn TP, Schindler DE, Rogers DE (2003) Biocomplexity and fisheries sustainability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6564-6568.
- Hoffman JI (2009) A panel of new microsatellite loci for genetic studies of antarctic fur seals and other otariids. *Conservation Genetics* **10**, 989-992.
- Hoffman JI, Dasmahapatra KK, Amos W, Phillips CD, Gelatt TS (2009) Contrasting patterns of genetic diversity at three different genetic markers in a marine mammal metapopulation. *Molecular Ecology* **18**, 2961-2978.
- Holleley CE, Geerts PG (2009) Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotechniques* **46**, 511-517.
- Hou R, Bao Z, Wang S, Su H, Li Y, Du H, Hu J, Wang S, Hu X (2011) Transcriptome sequencing and de novo analysis for yesso scallop (*Patinopecten yessoensis*) using 454 GS FLX. *Plos One* **6**, e21560.
- Hsü KJ, Montadert L, Bernoulli D, Cita MB, Erickson A, Garrison RE, Kidd RB, Mèlierés F, Müller C, Wright R (1977) History of the Mediterranean salinity crisis. *Nature* **267**:399-402.
- Hu JJ, Nakatani M, Mizuno K, Fujimura T (2004) Development and characterization of microsatellite markers in sweetpotato. *Breeding Science* **54**, 177-188.
- Hummel H, Wolowicz M, Bogaards RH (1994) Genetic variability and relationships for populations of *Cerastoderma edule* and of the *C. glaucum* complex. *Netherlands Journal of Sea Research* **33**, 81-89.
- Huvet A, Lapègue S, Magoulas A, Boudry P (2000) Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Conservation Genetics* **1**, 251-262.
- Iglesias JIP, Navarro E (1990) Shell growth of the cockle *Cerastoderma edule* in the Mundaca Estuary (North Spain). *Journal of Molluscan Studies* **56**, 229-238.

Insua A, Thiriot-Quévieux C (1992) Karyotypes of *Cerastoderma edule*, *Venerupis pullastra* and *Venerupis rhomboides* (Bivalvia, Veneroida). *Aquatic Living Resources* **5**, 1-8.

Insua A, Freire R, Méndez J (1999) The 5S rDNA of the bivalve *Cerastoderma edule*: nucleotide sequence of the repeat unit and chromosomal location relative to 18S-28S rDNA. *Genetics Selection Evolution* **31**, 509-518.

Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* **23**, 1801-1806.

Jelnes JE, Høpner Petersen G, Russel PJC (1971) Isoenzyme taxonomy applied on four species of *Cardium* from Danish and British waters with a short description of the distribution of the species (Bivalvia). *Ophelia* **9**, 15-19.

Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* **6**, 13.

Jensen KT (1992) Dynamics and growth of the cockle, *Cerastoderma edule*, on an intertidal mud-flat in the Danish Wadden Sea: effects of submersion time and density. *Netherlands Journal of Sea Research* **28**, 335-345.

Jia MJ, Li JL, Wang SL (2010) Isolation and characterization of 18 polymorphic microsatellite loci from freshwater pearl mussel (*Cristaria plicata*). *Conservation Genetics* **11**, 1131-1133.

Jolly MT, Jollivet D, Gentil F, Thiebaut E, Viard F (2005) Sharp genetic break between Atlantic and English Channel populations of the polychaete *Pectinaria koreni*, along the North coast of France. *Heredity* **94**, 23-32.

Jonsson PR, André C, Lindegarth M (1991) Swimming behavior of marine bivalve larvae in a flume boundary-layer flow: evidence for near-bottom confinement. *Marine Ecology Progress Series* **79**, 67-76.

Karl SA, Toonen RJ, Grant WS, Bowen BW (2012) Common misconceptions in molecular ecology: echoes of the modern synthesis. *Molecular Ecology* **21**, 4171-4189.

Kautsky H (1973) The distribution of the radio nuclide caesium-137 as an indicator for North Sea watermass transport. *Deutsche Hydrografische Zeitschrift* **26**, 241-246.

Keen AM (1969) Superfamily Cardiacea Lamarck, 1809. En: Moore RC (ed) *Treatise on invertebrate paleontology*, part N, Mollusca 6, Bivalvia. University of Kansas Press, Lawrence, pp 583-594.

- Kershaw P, Baxter A (1995) The transfer of reprocessing wastes from north-west Europe to the arctic. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **42**, 1413-1448.
- Kimura M, Crow JF (1964) Number of alleles that can be maintained in finite population. *Genetics* **49**, 725-&.
- Kimura M, Ohta T (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**, 2868-2872.
- King TL, Verspoor E, Spidle AP, Gross R, Phillips RB, Koljonen ML, Sánchez JA, Morrison CL (2007) Biodiversity and population structure. En: Verspoor E, Stradmeyer L, Nielsen, JL (eds) *The Atlantic salmon: genetics, conservation and management*. Blackwell Publishing, Oxford, pp 117-166.
- Kingston PF (1974) Studies on the reproductive cycles of *Cardium edule* and *C. glaucum*. *Marine Biology* **28**, 317-323.
- Koulman JG, Wolff WJ (1977) The mollusca of the estuarine region of the rivers Rhine, Meuse, and Scheldt in relation to the hydrography of the area. V. The cardiidae. *Basteria* **41**, 21-32.
- Krakau M, Jacobsen S, Jensen KT, Reise K (2012) The cockle *Cerastoderma edule* at Northeast Atlantic shores: genetic signatures of glacial refugia. *Marine Biology* **159**, 221-230.
- Kuparinen A, Merilä J (2007) Detecting and managing fisheries-induced evolution. *Trends in Ecology and Evolution* **22**, 652-659.
- Launey S, Ledu C, Boudry P, Bonhomme F, Naciri-Graven Y (2002) Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *Journal of Heredity* **93**, 331-338.
- Law R (2007) Fisheries-induced evolution: present status and future directions. *Marine Ecology Progress Series* **335**, 271-277.
- Lebour MV (1938) Notes on the breeding of some lamellibranchs from Plymouth and their larvae. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **23**, 119-144.
- Lee HJE, Boulding EG (2009) Spatial and temporal population genetic structure of four northeastern Pacific littorinid gastropods: the effect of mode of larval development on variation at one mitochondrial and two nuclear DNA markers. *Molecular Ecology* **18**, 2165-2184.

- Leitão A, Chaves R, Joaquim S, Matias D, Ruano F, Guedes-Pinto H (2008) Supernumerary chromosomes on southern European populations of the cockle *Cerastoderma edule*: consequence of environmental pollution? *Estuarine Coastal and Shelf Science* **79**, 152-156.
- Leitão A, Chaves R, Matias D, Joaquim S, Ruano F, Guedes-Pinto H (2006) Restriction enzyme digestion chromosome banding on two commercially important venerid bivalve species: *Ruditapes decussatus* and *Cerastoderma edule*. *Journal of Shellfish Research* **25**, 857-863.
- Lesica P, Allendorf FW (1995) When are peripheral populations valuable for conservation? *Conservation Biology* **9**, 753-760.
- Li WH (1997) *Molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Li G, Hubert S, Bucklin K, Ribes V, Hedgecock D (2003) Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes* **3**, 228-232.
- Li JJ, Li Q, Kong LF (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in the xishishe clam *Coelomactra antiquata* (Bivalvia: Veneroidea). *Conservation Genetics* **9**, 453-455.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* **11**, 2453-2465.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451-1452.
- Lindegarh M, André C, Jonsson PR (1995) Analysis of the spatial variability in abundance and age structure of two infaunal bivalves, *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*, using hierarchical sampling programs. *Marine Ecology Progress Series* **116**, 85-97.
- Liu J, Li Q, Kong LF (2009) Isolation and characterization of 13 microsatellite loci in the pen shell *Atrina pectinata* (Bivalvia: Pinnidae). *Conservation Genetics* **10**, 1369-1371.
- Liu ZJ, Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* **242**, 735-736.
- Machado MM, Costa AM (1994) Enzymatic and morphological criteria for distinguishing between *Cardium edule* and *C. glaucum* of the Portuguese coast. *Marine Biology* **120**, 535-544.

- Mader E, Lukas B, Novak J (2008) A strategy to setup codominant microsatellite analysis for high-resolution-melting-curve-analysis (HRM). *BMC Genetics* **9**, 69.
- Maggs CA, Castilho R, Foltz D, Henzler C, Jolly MT, Kelly J, Olsen J, Perez KE, Stam W, Väinölä R, Viard F, Wares J (2008) Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology* **89**, S108-S122.
- Malausa T, Gilles A, Meglecz E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Délye C, Feau N, Frey P, Gauthier P, Guillemaud T, Hazard L, Le Corre V, Lung-Escarmant B, Malé PJ, Ferreira S, Martin JF (2011) High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Resources* **11**, 638-644.
- Malham SK, Hutchinson TH, Longshaw M (2012) A review of the biology of European cockles (*Cerastoderma* spp.). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **92**, 1563-1577.
- MarLIN (2006) BIOTIC-Biological Traits Information Catalogue. Disponible en: www.marlin.ac.uk/biotic. Consultado el 29/1/2014.
- Martins CS, Hamann M, Fiúza AFG (2002) Surface circulation in the eastern North Atlantic, from drifters and altimetry. *Journal of Geophysical Research: Oceans* **107**, 3217.
- Maruyama T, Fuerst PA (1984) Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. I. Allele numbers when populations evolve from zero variability. *Genetics* **108**, 745-763.
- Masski H, Guillou J (1999) The role of biotic interactions in juvenile mortality of the cockle (*Cerastoderma edule* L.): field observations and experiment. *Journal of Shellfish Research* **18**, 575-578.
- May B (1998) Starch gel electrophoresis of allozymes. En: Hoelzel AR (ed) *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford University Press, New York, pp 1-28.
- McGoldrick DJ, Hedgecock D, English LJ, Baoprasertkul P, Ward RD (2000) The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles. *Journal of Shellfish Research* **19**, 779-788.
- Meirmans PG (2006) Using the AMOVA framework to estimate a standardized genetic differentiation measure. *Evolution* **60**, 2399-2402.
- Metzgar D, Bytof J, Wills C (2000) Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* **10**, 72-80.

- Molares J, Parada JM, Navarro-Pérez E, Fernández A (2008) Variabilidad interanual de las ventas de los principales recursos marisqueros de Galicia y su relación con las condiciones ambientales. *Revista Galega dos Recursos Mariños* (Artículos e Informes Técnicos) **2**, 1-42.
- Monteiro FA, SoleCava AM, Thorpe JP (1997) Extensive genetic divergence between populations of the common intertidal sea anemone *Actinia equina* from Britain, the Mediterranean and the Cape Verde Islands. *Marine Biology* **129**, 425-433.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**, 269-292.
- Morton NE, Collins A, Balazs I (1993) Kinship bioassay on hypervariable loci in blacks and caucasians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 1892-1896.
- Mueller RL (2006) Evolutionary rates, divergence dates, and the performance of mitochondrial genes in Bayesian phylogenetic analysis. *Systematic Biology* **55**, 289-300.
- Mura L, Cossu P, Cannas A, Scarpa F, Sanna D, Dedola GL, Floris R, Lai T, Cristo B, Curini-Galletti M, Fois N, Casu M (2012) Genetic variability in the Sardinian population of the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Biochemical Systematics and Ecology* **41**, 74-82.
- Narváez DA, Klinck JM, Powell EN, Hofmann EE, Wilkin J, Haidvogel DB (2012) Modeling the dispersal of eastern oyster (*Crassostrea virginica*) larvae in Delaware Bay. *Journal of Marine Research* **70**, 381-409.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**, 583-590.
- Nikula R, Strelkov P, Väinölä R (2007) Diversity and trans-Arctic invasion history of mitochondrial lineages in the North Atlantic *Macoma balthica* complex (Bivalvia: Tellinidae). *Evolution* **61**, 928-941.
- Nikula R, Väinölä R (2003) Phylogeography of *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia: Cardiidae) across Europe: a major break in the Eastern Mediterranean. *Marine Biology* **143**, 339-350.
- O'Connor MI, Bruno JF, Gaines SD, Halpern BS, Lester SE, Kinlan BP, Weiss JM (2007) Temperature control of larval dispersal and the implications for marine ecology, evolution, and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1266-1271.

- Olsen EM, Heino M, Lilly GR, Morgan MJ, Brattey J, Ernande B, Dieckmann U (2004) Maturation trends indicative of rapid evolution preceded the collapse of northern cod. *Nature* **428**, 932-935.
- Palsbøll PJ, Berube M, Allendorf FW (2007) Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution* **22**, 11-16.
- Palumbi SR (1996) Macrospatial genetic structure and speciation in marine taxa with high dispersal abilities. En: Ferraris JD and Palumbi SR (eds) *Molecular zoology: advances, strategies, and protocols*. Wiley Liss, New York, pp 101-117.
- Park SDE (2001) Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Tesis doctoral, Universidad de Dublin.
- Pashley CH, Ellis JR, McCauley DE, Burke JM (2006) EST databases as a source for molecular markers: lessons from *Helianthus*. *Journal of Heredity* **97**, 381-388.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**, 288-295.
- Pearson C (2003) The genetic population structure of the lagoon specialists *Nematostella vectensis*, *Cerastoderma glaucum* and *Gammarus insensibilis* from populations along the southern and eastern coasts of the United Kingdom. Tesis doctoral, Universidad de Southampton.
- Pépin L, Amigues Y, Lépingle A, Berthier JL, Bensaid A, Vaiman D (1995) Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat) and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. *Heredity* **74**, 53-61.
- Pereira SM (2013) Estudio genético poblacional en la almeja babosa *Venerupis pullastra*. Tesis doctoral, Universidade da Coruña.
- Pereira SM, Arias A, Méndez J, Insua A, Freire R (2010) Isolation of twelve microsatellite markers in the pullet carpet shell *Venerupis pullastra* (Bivalvia: Veneridae). *Conservation Genetics Resources* **2**, 201-203.
- Pérez-Camacho A, Román G (1987) La reproducción en los moluscos bivalvos. En: Espinosa de los Monteros J, Labarta U (eds) *Reproducción en acuicultura*. CAYCIT, Madrid, pp 133-184.
- Persson K, Hamby K, Ugozzoli LA (2005) Four-color multiplex reverse transcription polymerase chain reaction-Overcoming its limitations. *Analytical Biochemistry* **344**, 33-42.
- Petit RJ, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12**, 844-855.

- Piñeira J, Quesada H, Rolán-Alvarez E, Caballero A (2008) Genetic discontinuity associated with an environmentally induced barrier to gene exchange in the marine snail *Littorina saxatilis*. *Marine Ecology Progress Series* **357**, 175-184.
- Prandle D (1984) A modeling study of the mixing of ^{137}Cs in the seas of the European continental shelf. *Philosophical Transactions of the Royal Society. Series A, Mathematical Physical and Engineering Sciences* **310**, 407-436.
- Presá P, Pérez M, Diz AP (2002) Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus* spp.). *Conservation Genetics* **3**, 441-443.
- Primack RB (1993) *Essentials of conservation biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Primmer CR, Ellegren H (1998) Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 997-1008.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945-959.
- Provan J, Wattier RA, Maggs CA (2005) Phylogeographic analysis of the red seaweed *Palmaria palmata* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel. *Molecular Ecology* **14**, 793-803.
- R**amos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* **19**, 2092-2100.
- Rasmussen DA, Noor MAF (2009) What can you do with 0.1x genome coverage? A case study based on a genome survey of the scuttle fly *Megaselia scalaris* (Phoridae). *BMC Genomics* **10**, 382.
- Reich DE, Goldstein DB (1998) Genetic evidence for a Paleolithic human population expansion in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 8119-8123.
- Reise, K. (1985) Tidal flat ecology. *Ecological Studies* **54**, 1-191.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* **9**, 552-569.
- Rolán E, Otero-Schmitt J, Rolán E (1989) *Moluscos de la ría de Vigo II: polioplacóforos, bivalvos, escafópodos, cefalópodos*. *Thalassas: Revista de Ciencias del Mar* **7**, Anexo 2, 1-276.
- Roman J, Palumbi SR (2004) A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. *Molecular Ecology* **13**, 2891-2898.

- Rosenberg NA (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* **4**, 137-138.
- Ross CL, Dyer KA, Erez T, Miller SJ, Jaenike J, Markow TA (2003) Rapid divergence of microsatellite abundance among species of *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* **20**, 1143-1157.
- Rousset F (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* **8**, 103-106.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 365-386.
- Ruggieri G (1967) The Miocene and later evolution of the Mediterranean Sea. En: Adams GC, Ager DV (eds) *Aspects of Tethyan biogeography*. Systematics Association, London, pp 283-290.
- Rygg B (1970) Studies on *Cerastoderma edule* (L.) and *Cerastoderma glaucum* (Poiret). *Sarsia* **43**:65-80.
- Ryman N, Utter F, Laikre L (1995) Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **5**, 417-446.
- Saarinen EV, Austin JD (2010) When technology meets conservation: increased microsatellite marker production using 454 genome sequencing on the endangered Okaloosa darter (*Etheostoma okaloosae*). *Journal of Heredity* **101**, 784-788.
- Saavedra C (2007) Recursos genéticos de moluscos y acuicultura. En: Espinosa de los Monteros J. (ed) *Genética y genómica en acuicultura*. Observatorio Español de Acuicultura, Madrid, pp. 67-112.
- Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular cloning. a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez-Salazar ME, Griffiths CL, Seed R (1987) The interactive roles of predation and tidal elevation in structuring populations of the edible cockle, *Cerastoderma edule*. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **25**, 245-260.
- Santana QC, Coetzee MPA, Steenkamp ET, Mlonyeni O, Hammond G, Wingfield M, Wingfield B (2009) Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *Biotechniques* **46**, 217-223.
- Saura M, Faria R (2011) Genetic tools for restoration of fish populations. *Journal of Applied Ichthyology* **27**, 5-15.

- Schlötterer C (1998) Microsatellites. En: Hoelzel AR (ed) *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach*. Oxford University Press, New York, pp 237-261.
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**, 365-371.
- Schwartz MK, Luikart G, Waples RS (2007) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution* **22**, 25-33.
- Scotti I, Magni F, Paglia GP, Morgante M (2002) Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 40-50.
- Seed R, Brown RA (1977) A comparison of the reproductive cycles of *Modiolus modiolus* (L.), *Cerastoderma* (= *Cardium*) *edule* (L.), and *Mytilus edulis* L. in Strangford Lough, Northern Ireland. *Oecologia* **30**, 173-188.
- Seed R, Brown RA (1978) Growth as a strategy for survival in two marine bivalves, *Cerastoderma edule* and *Modiolus modiolus*. *Journal of Animal Ecology* **47**, 283-292.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9**, 615-629.
- Sharma PC, Grover A, Kahl G (2007) Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in Biotechnology* **25**, 490-498.
- Shinde D, Lai YL, Sun FZ, Arnheim N (2003) *Taq* DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Research* **31**, 974-980.
- Slatkin M (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **16**, 393-430.
- Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **236**, 787-792.
- Slatkin M (1994) An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. *Genetical Research* **64**, 71-74.
- Slatkin M (1996) A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. *Genetical Research* **68**, 259-260.
- Small MP, Gosling EM (2000a) Genetic structure and relationships in the snail species complex *Littorina arcana* Hannaford Ellis, *L. compressa* Jeffreys and *L. saxatilis* (Olivi) in the British Isles using SSCPs of cytochrome-b fragments. *Heredity* **84**, 692-701.

- Small MP, Gosling EM (2000b) Species relationships and population structure of *Littorina saxatilis* Olivi and *L. tenebrosa* Montagu in Ireland using single-strand conformational polymorphisms (SSCPs) of cytochrome b fragments. *Molecular Ecology* **9**, 39-52.
- Sobrinho B, Brión M, Carracedo A (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International* **154**, 181-194.
- Stachowitsh M (1992) *The invertebrates: an illustrated glossary*. Wiley-Liss, New York.
- Stewart JR, Lister AM (2001) Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends in Ecology and Evolution* **16**, 608-613.
- Strasser CA, Barber PH (2009) Limited genetic variation and structure in softshell clams (*Mya arenaria*) across their native and introduced range. *Conservation Genetics* **10**, 803-814.
- Strasser M, Reinwald T, Reise K (2001) Differential effects of the severe winter of 1995/96 on the intertidal bivalves *Mytilus edulis*, *Cerastoderma edule* and *Mya arenaria* in the Northern Wadden Sea. *Helgoland Marine Research* **55**, 190-197.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* **15**, 199-203.
- T**ajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **123**, 585-595.
- Tanguy A, Bierne N, Saavedra C, Pina B, Bachère E, Kube M, Bazin E, Bonhomme F, Boudry P, Boulo V, Boutet I, Cancela L, Dossat C, Favrel P, Huvet A, Jarque S, Jollivet D, Klages S, Lapègue S, Leite R, Moal J, Moraga D, Reinhardt R, Samain JF, Zouros E, Canario A (2008) Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. *Gene* **408**, 27-36.
- Taris N, Baron S, Sharbel TF, Sauvage C, Boudry P (2005) A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high-throughput parentage analyses in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture Research* **36**, 516-518.
- Tarnowska K, Chenuil A, Nikula R, Feral JP, Wolowicz M (2010) Complex genetic population structure of the bivalve *Cerastoderma glaucum* in a highly fragmented lagoon habitat. *Marine Ecology Progress Series* **406**, 173-184.

- Tarnowska K, Krakau M, Jacobsen S, Wolowicz M, Féral JP, Chenuil A (2012) Comparative phylogeography of two sister (congeneric) species of cardiid bivalve: strong influence of habitat, life history and post-glacial history. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **107**, 150-158.
- Tebble N (1966) *British bivalves seashells*. British Museum, London.
- Teuchen N, Arias RS, Glynn NC, Pan Z, Khan IA, Scheffler BE (2010) Optimized construction of microsatellite-enriched libraries. *Molecular Ecology Resources* **10**, 508-515.
- Theologidis I, Fodelianakis S, Gaspar MB, Zouros E (2008) Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial dna in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problem of its sporadic detection in Bivalvia. *Evolution* **62**, 959-970.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Thorisson GA, Smith AV, Krishnan L, Stein LD (2005) The International HapMap Project Web site. *Genome Research* **15**, 1592-1593.
- Toews DPL, Brelsford A (2012) The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* **21**, 3907-3930.
- Toth G, Gaspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* **10**, 967-981.
- Triantafyllidis A, Apostolidis AP, Katsares V, Kelly E, Mercer J, Hughes M, Jørstad KE, Tsolou A, Hynes R, Triantaphyllidis C (2005) Mitochondrial DNA variation in the European lobster (*Homarus gammarus*) throughout the range. *Marine Biology* **146**, 223-235.
- Turrell WR (1992) New hypotheses concerning the circulation of the North Sea and its relation to North Sea fish recruitment. *ICES Journal of Marine Science* **49**, 107-123.
- Vadopalas B, Leclair LL, Bentzen P (2004) Microsatellite and allozyme analyses reveal few genetic differences among spatially distinct aggregations of geoduck clams (*Panopea abrupta*, Conrad 1849). *Journal of Shellfish Research* **23**, 693-706.
- Van Colen C, Montserrat F, Vincx M, Herman PM, Ysebaert T, Degraer S (2010) Long-term divergent tidal flat benthic community recovery following hypoxia-induced mortality. *Marine Pollution Bulletin* **60**, 178-186.

- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* **4**, 535-538.
- Van Oppen MJH, Olsen JL, Stam WT (1995) Genetic variation within and among North Atlantic and Baltic populations of the benthic alga *Phycodrys rubens* (Rhodophyta). *European Journal of Phycology* **30**, 251-260.
- Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution* **34**, 275-305.
- Villalba A, Carballal MJ, López C (2001) Disseminated neoplasia and large foci indicating heavy haemocytic infiltration in cockles *Cerastoderma edule* from Galicia (NW Spain). *Diseases of Aquatic Organisms* **46**, 213-216.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.
- Walsh MR, Munch SB, Chiba S, Conover DO (2006) Maladaptive changes in multiple traits caused by fishing: impediments to population recovery. *Ecology Letters* **9**, 142-148.**
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* **10**, 506-513.
- Wang Y, Wang X, Wang A, Guo X (2010) A 16-microsatellite multiplex assay for parentage assignment in the eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin). *Aquaculture* **308**, S28-S33.
- Waples RS, Gaggiotti O (2006) What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology* **15**, 1419-1439.
- Ward RD (2000) Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* **420**, 191-201.
- Watterson GA (1978) Homozygosity test of neutrality. *Genetics* **88**, 405-417.
- Watterson GA (1986) The homozygosity test after a change in population size. *Genetics* **112**, 899-907.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Whitlock MC, McCauley DE (1999) Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal to $1/(4Nm+1)$. *Heredity* **82**, 117-125.

- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**, 6531-6535.
- Wren JD, Forgacs E, Fondon JW 3rd, Pertsemlidis A, Cheng SY, Gallardo T, Williams RS, Shohet RV, Minna JD, Garner HR (2000) Repeat polymorphisms within gene regions: phenotypic and evolutionary implications. *American Journal of Human Genetics* **67**, 345-356.
- Wright S (1978) *Evolution and the genetics of populations. Vol.4. Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago.
- Xavier R, Santos AM, Branco M (2012) MtDNA and nuclear data reveal patterns of low genetic differentiation for the isopods *Stenosoma lancifer* and *Stenosoma acuminatum*, with low dispersal ability along the northeast Atlantic coast. *Scientia Marina* **76**, 133-140.
- Xunta de Galicia (2014) Plataforma Tecnológica da Pesca. Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos. Disponible en: www.pescadegalicia.com. Consultado el 4/03/2014.
- Yankson K (1986) Reproductive cycles of *Cerastoderma glaucum* (Bruguiere) and *C. edule* (L) with special reference to the effects of the 1981-82 severe winter. *Journal of Molluscan Studies* **52**, 6-14.
- Yasuda N, Nagai S, Yamaguchi S, Lian CL, Hamaguchi M (2007) Development of microsatellite markers for the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Molecular Ecology Notes* **7**, 43-45.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* **11**, 1-16.
- Zarza E, Reynoso VH, Emerson BC (2011) Discordant patterns of geographic variation between mitochondrial and microsatellite markers in the Mexican black iguana (*Ctenosaura pectinata*) in a contact zone. *Journal of Biogeography* **38**, 1394-1405.
- Zink RM, Barrowclough GF (2008) Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology* **17**, 2107-2121.
- Zouros E, Foltz DW (1984) Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. *Malacologia* **25**, 583-591.
- Zouros E, Romerodorey M, Mallet AL (1988) Heterozygosity and growth in marine bivalves: further data and possible explanations. *Evolution* **42**, 1332-1341.

Anexos

Anexo A. Diversidad genética, coeficiente de endogamia y ajuste al equilibrio H-W de los *loci* microsatélite en las localidades del noroeste de la Península Ibérica

		CeATC 1-5	CeATC 1-22	CeATC 1-36	CeATC 1-52	CeATC 1-54	CeATC 2-4	CeATC 2-11	CeATC 2-12	CeATC 2-34	CeATC 2-44	CeATC 2-51	Total <i>loci</i>
AV	<i>N</i>	57	56	63	52	61	55	60	53	59	60	53	63
	<i>Na</i>	22(1)	8(0)	5(0)	17(4)	18(1)	13(1)	26(3)	11(0)	9(2)	5(0)	9(0)	
	<i>R</i>	195-261	166-190	135-157	112-260	141-215	161-190	122-378	84-152	157-200	129-141	133-160	
	<i>A_C</i>	207	175	144	136	154	172	214	123	191	129	151	
	<i>Frec A_C</i>	0,123	0,429	0,786	0,346	0,320	0,518	0,217	0,396	0,492	0,425	0,283	
	<i>Rs</i>	19,486	7,159	4,235	13,602	14,260	10,205	18,279	9,534	7,342	4,285	8,217	10,600
	<i>He</i>	0,937	0,742	0,367	0,823	0,811	0,694	0,890	0,765	0,697	0,633	0,808	0,742
	<i>Ho</i>	0,667**	0,750	0,333	0,808	0,557**	0,400**	0,767*	0,245**	0,661*	0,633**	0,547**	0,579
	<i>Fis</i>	0,290	-0,011	0,091	0,019	0,314	0,426	0,140	0,682	0,052	-0,0007	0,325	0,222
SS	<i>N</i>	49	52	51	46	53	57	57	52	57	54	45	60
	<i>Na</i>	21(1)	9(1)	5(0)	11(0)	17(1)	10(0)	25(2)	9(0)	10(0)	5(0)	11(0)	
	<i>R</i>	195-290	163-187	135-147	123-181	108-209	155-190	122-372	84-152	154-194	129-141	133-164	
	<i>A_C</i>	243	175	144	136	154	172	214	123	191	129	147	
	<i>Frec A_C</i>	0,112	0,298	0,833	0,348	0,396	0,526	0,175	0,481	0,430	0,463	0,289	
	<i>Rs</i>	19,089	8,348	4,542	10,191	13,409	8,253	18,584	7,782	7,970	4,499	10,765	10,312
	<i>He</i>	0,942	0,821	0,299	0,800	0,771	0,670	0,903	0,661	0,751	0,610	0,829	0,732
	<i>Ho</i>	0,612**	0,885	0,255	0,761	0,566*	0,439**	0,842	0,250**	0,684	0,519	0,422**	0,567
	<i>Fis</i>	0,353	-0,078	0,149	0,050	0,268	0,347	0,067	0,624	0,090	0,151	0,493	0,228

Anexo A. (continuación)

		CeATC 1-5	CeATC 1-22	CeATC 1-36	CeATC 1-52	CeATC 1-54	CeATC 2-4	CeATC 2-11	CeATC 2-12	CeATC 2-34	CeATC 2-44	CeATC 2-51	Total <i>loci</i>
BR	<i>N</i>	45	54	49	49	57	61	61	50	58	55	61	64
	<i>Na</i>	19(1)	8(0)	6(0)	16(3)	17(2)	9(0)	23(4)	9(1)	9(0)	7(0)	11(1)	
	<i>R</i>	184-258	166-190	132-157	120-247	108-282	155-184	122-392	117-152	157-194	129-148	130-166	
	<i>A_C</i>	240	175	144	136	151	172	214	129	191	135	151	
	<i>Frec A_C</i>	0,133	0,370	0,704	0,276	0,342	0,623	0,221	0,400	0,397	0,427	0,303	
	<i>Rs</i>	17,513	7,389	4,898	13,655	13,915	7,251	17,708	8,033	7,810	5,933	9,163	10,297
	<i>He</i>	0,934	0,764	0,473	0,854	0,818	0,579	0,887	0,691	0,769	0,669	0,821	0,751
	<i>Ho</i>	0,711**	0,704	0,367	0,816	0,684	0,426*	0,853	0,180**	0,724	0,709	0,443**	0,602
	<i>Fis</i>	0,241	0,079	0,225	0,044	0,164	0,260	0,039	0,742	0,059	-0,060	0,463	0,200
CO	<i>N</i>	40	41	37	41	41	34	38	31	37	40	37	41
	<i>Na</i>	21(0)	7(0)	5(0)	9(0)	13(1)	7(0)	20(1)	11(1)	8(1)	7(0)	8(0)	
	<i>R</i>	192-258	166-184	135-147	130-181	108-185	161-178	122-335	84-167	157-197	129-148	137-160	
	<i>A_C</i>	207	175	144	136	154	172	214	123	191	135	151	
	<i>Frec A_C</i>	0,150	0,329	0,797	0,463	0,427	0,559	0,197	0,387	0,432	0,475	0,432	
	<i>Rs</i>	19,248	6,940	4,834	8,673	11,495	6,817	18,361	11,000	7,786	6,492	7,785	9,948
	<i>He</i>	0,930	0,787	0,355	0,740	0,759	0,637	0,903	0,784	0,747	0,643	0,733	0,729
	<i>Ho</i>	0,550**	0,756	0,378	0,756	0,537*	0,412**	0,763*	0,258**	0,703	0,625	0,297**	0,549
	<i>Fis</i>	0,412	0,040	-0,066	-0,023	0,295	0,357	0,157	0,674	0,060	0,028	0,598	0,250

Anexo A. (continuación)

		CeATC 1-5	CeATC 1-22	CeATC 1-36	CeATC 1-52	CeATC 1-54	CeATC 2-4	CeATC 2-11	CeATC 2-12	CeATC 2-34	CeATC 2-44	CeATC 2-51	Total <i>loci</i>
FE	<i>N</i>	56	51	52	48	60	56	61	52	57	61	59	62
	<i>Na</i>	26(5)	8(0)	7(0)	17(2)	18(0)	10(0)	23(2)	13(1)	8(0)	6(0)	13(0)	
	<i>R</i>	171-380	166-187	129-147	123-275	108-203	155-190	122-350	84-164	154-194	129-145	130-164	
	<i>A_C</i>	198	172/175	144	136	154	172	170	123	191	135	151	
	<i>Frec A_C</i>	0,134	0,265	0,788	0,354	0,325	0,625	0,189	0,462	0,342	0,607	0,305	
	<i>Rs</i>	21,348	7,676	5,869	14,563	14,144	8,630	17,159	11,229	6,874	5,815	11,653	11,360
	<i>He</i>	0,936	0,812	0,369	0,827	0,835	0,581	0,899	0,736	0,763	0,582	0,834	0,743
	<i>Ho</i>	0,607**	0,902	0,308*	0,729	0,683**	0,464*	0,902	0,308**	0,737	0,557	0,339**	0,594
	<i>Fis</i>	0,353	-0,113	0,167	0,119	0,183	0,203	-0,003	0,584	0,034	0,042	0,596	0,202
Total													
	<i>Na</i>	33	10	8	26	31	15	45	17	14	7	15	
	<i>R</i>	171-380	163-190	129-157	112-275	108-282	155-190	122-392	84-167	154-200	129-148	130-166	
	<i>Rs</i>	32,681	9,924	7,932	26,000	29,883	14,791	42,572	16,911	13,505	6,984	14,920	19,646
	<i>He</i>	0,939	0,784	0,373	0,812	0,809	0,633	0,894	0,728	0,746	0,636	0,812	0,742
	<i>Ho</i>	0,631	0,799	0,325	0,775	0,610	0,430	0,830	0,248	0,702	0,607	0,416	0,580
	<i>Fis</i>	0,328	-0,019	0,128	0,045	0,246	0,321	0,071	0,660	0,060	0,045	0,489	

N: número de individuos; *Na*: número de alelos (alelos privados); *R*: rango de tamaño de los alelos en pares de bases; *A_C*: tamaño en pares de bases del alelo más común; *Frec A_C*: frecuencia del alelo más común; *Rs*: riqueza alélica basada en un tamaño muestral mínimo de 31 individuos; *He*: heterocigosidad esperada insesgada de Nei; *Ho*: heterocigosidad observada; *Fis*: coeficiente de endogamia; Ajuste a equilibrio H-W: (*): significativo para un $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

Anexo B. Diversidad genética, coeficiente de endogamia y ajuste al equilibrio H-W de los *loci* microsatélite analizados a lo largo del ámbito de distribución de la especie

		CeATC1-22	CeATC1-36	CeATC1-52	CeATC1-54	CeATC2-4	CeATC2-11	CeATC2-34	CeATC2-44	Total <i>loci</i>
MO	<i>N</i>	56	58	58	55	54	55	57	58	59
	<i>N_a</i>	9 (1)	5(0)	18(3)	20(3)	13(0)	25(4)	8(0)	7(0)	
	<i>R</i>	163-190	135-148	130-301	109-314	162-183	123-452	157-198	130-150	
	<i>A_C</i>	178	145	136	155	168	215	192	130	
	<i>Frec A_C</i>	0,295	0,810	0,414	0,355	0,398	0,209	0,430	0,534	
	<i>R_s</i>	6,641	3,971	10,280	10,567	7,951	14,032	6,462	5,041	8,118
	<i>He</i>	0,794	0,333	0,782	0,783	0,763	0,901	0,742	0,602	0,712
	<i>Ho</i>	0,768	0,293	0,759	0,709	0,611*	0,855	0,754	0,638	0,673
	<i>F_{is}</i>	0,034	0,121	0,030	0,095	0,200	0,052	-0,017	-0,060	0,055
AV	<i>N</i>	56	63	52	61	55	60	59	60	63
	<i>N_a</i>	8 (0)	7(0)	17(2)	18(1)	14(0)	27(7)	9(0)	5(0)	
	<i>R</i>	169-193	135-158	112-256	141-216	163-192	123-378	157-201	130-143	
	<i>A_C</i>	178	145	136	155	174	215	192	130	
	<i>Frec A_C</i>	0,429	0,762	0,346	0,320	0,518	0,208	0,492	0,425	
	<i>R_s</i>	6,366	4,960	10,620	11,113	8,427	13,998	6,294	3,959	8,217
	<i>He</i>	0,742	0,406	0,823	0,811	0,695	0,894	0,697	0,640	0,713
	<i>Ho</i>	0,750	0,349	0,808	0,557**	0,400**	0,783*	0,661*	0,667**	0,622†
	<i>F_{is}</i>	-0,011	0,141	0,019	0,314	0,426	0,124	0,052	-0,043	0,129

Anexo B. (continuación)

		CeATC1-22	CeATC1-36	CeATC1-52	CeATC1-54	CeATC2-4	CeATC2-11	CeATC2-34	CeATC2-44	Total loci
BR	<i>N</i>	54	49	49	57	61	61	58	55	64
	<i>Na</i>	8(0)	7(1)	16(2)	17(0)	10(0)	23(3)	9(0)	7(0)	
	<i>R</i>	169-193	132-158	121-244	109-282	157-186	123-393	157-194	130-150	
	<i>A_C</i>	178	145	136	152	174	215	192	136	
	<i>Frec A_C</i>	0,370	0,704	0,276	0,342	0,623	0,221	0,397	0,427	
	<i>Rs</i>	6,738	4,691	10,943	10,979	6,596	13,550	6,892	5,111	8,188
	<i>He</i>	0,764	0,477	0,854	0,818	0,581	0,887	0,769	0,669	0,727
	<i>Ho</i>	0,704	0,367	0,816	0,684	0,426*	0,853	0,724	0,709	0,660
	<i>Fis</i>	0,079	0,231	0,044	0,164	0,267	0,039	0,059	-0,060	0,092
CO	<i>N</i>	41	38	41	41	34	38	37	40	41
	<i>Na</i>	7(0)	7(0)	9(0)	13(1)	7(0)	20(2)	8(0)	7(0)	
	<i>R</i>	169-187	135-148	130-179	109-186	163-180	123-336	157-198	130-150	
	<i>A_C</i>	178	145	136	155	174	215	192	136	
	<i>Frec A_C</i>	0,329	0,776	0,476	0,427	0,559	0,197	0,432	0,475	
	<i>Rs</i>	6,564	5,444	7,736	9,026	5,742	14,186	6,834	5,416	7,619
	<i>He</i>	0,787	0,391	0,732	0,759	0,637	0,903	0,747	0,643	0,700
	<i>Ho</i>	0,756	0,368	0,781	0,537*	0,412*	0,763*	0,703	0,625	0,618
	<i>Fis</i>	0,040	0,058	-0,067	0,295	0,357	0,157	0,060	0,028	0,118

Anexo B. (continuación)

		CeATC1-22	CeATC1-36	CeATC1-52	CeATC1-54	CeATC2-4	CeATC2-11	CeATC2-34	CeATC2-44	Total loci
AR	<i>N</i>	56	53	54	56	55	55	52	51	57
	<i>Na</i>	9(1)	8(0)	12(1)	19(2)	9(1)	27(3)	11(1)	6(0)	
	<i>R</i>	169-196	135-158	109-214	109-311	162-195	123-393	150-201	130-150	
	<i>A_C</i>	178	145	136	155	174	215	192	130	
	<i>Frec A_C</i>	0,286	0,736	0,426	0,321	0,645	0,255	0,375	0,480	
	<i>Rs</i>	6,870	5,773	8,322	11,332	6,736	15,313	8,045	4,725	8,390
	<i>He</i>	0,808	0,448	0,763	0,815	0,561	0,896	0,793	0,622	0,713
	<i>Ho</i>	0,804	0,415	0,704	0,554**	0,418*	0,927	0,731*	0,647	0,650
	<i>Fis</i>	0,005	0,073	0,078	0,323	0,257	-0,035	0,080	-0,040	0,090
RO	<i>N</i>	34	43	43	34	34	34	43	42	44
	<i>Na</i>	7(0)	6(1)	10(1)	16(0)	14(0)	14(1)	8(0)	7(0)	
	<i>R</i>	172-190	135-161	130-229	109-213	157-256	123-365	157-194	130-150	
	<i>A_C</i>	178	145	136	152	174	171/215	192	130	
	<i>Frec A_C</i>	0,279	0,767	0,419	0,382	0,382	0,176	0,407	0,452	
	<i>Rs</i>	6,672	4,904	7,477	11,672	10,578	11,584	6,240	5,767	8,112
	<i>He</i>	0,809	0,401	0,746	0,801	0,797	0,896	0,758	0,659	0,734
	<i>Ho</i>	0,765	0,372	0,744	0,677	0,618*	0,824	0,674	0,667	0,668
	<i>Fis</i>	0,055	0,072	0,003	0,158	0,228	0,082	0,112	-0,011	0,091

Anexo B. (continuación)

		CeATC1-22	CeATC1-36	CeATC1-52	CeATC1-54	CeATC2-4	CeATC2-11	CeATC2-34	CeATC2-44	Total loci
TH	<i>N</i>	48	47	47	47	46	48	47	47	48
	<i>Na</i>	7(0)	7(0)	14(0)	15(2)	13(0)	17(0)	8(0)	6(0)	
	<i>R</i>	169-187	135-152	127-200	109-234	157-265	123-418	157-194	130-150	
	<i>A_C</i>	178	145	136	155	174	171	192	130	
	<i>Frec A_C</i>	0,313	0,681	0,426	0,351	0,402	0,250	0,319	0,383	
	<i>Rs</i>	5,739	5,152	9,638	9,425	9,164	12,112	6,128	5,367	7,841
	<i>He</i>	0,785	0,510	0,771	0,778	0,794	0,875	0,780	0,759	0,756
	<i>Ho</i>	0,896	0,447	0,702	0,617*	0,630*	0,875	0,723	0,766	0,707
	<i>Fis</i>	-0,143	0,125	0,091	0,209	0,207	-0,0003	0,073	-0,009	0,066
DB	<i>N</i>	45	49	49	47	45	46	48	49	49
	<i>Na</i>	5(0)	8(1)	9(0)	19(2)	10(0)	18(0)	7(0)	5(0)	
	<i>R</i>	172-184	135-155	130-200	109-292	163-256	123-418	157-194	130-143	
	<i>A_C</i>	178	145	136	155	174/177	186	192	130	
	<i>Frec A_C</i>	0,422	0,745	0,439	0,383	0,289	0,272	0,323	0,429	
	<i>Rs</i>	4,987	5,421	7,074	10,228	8,134	12,719	5,932	4,947	7,430
	<i>He</i>	0,735	0,433	0,745	0,768	0,804	0,867	0,779	0,710	0,730
	<i>Ho</i>	0,711	0,429	0,714	0,660	0,622*	0,848	0,750	0,633*	0,671
	<i>Fis</i>	0,033	0,010	0,041	0,142	0,228	0,023	0,038	0,110	0,082

Anexo B. (continuación)

		CeATC1-22	CeATC1-36	CeATC1-52	CeATC1-54	CeATC2-4	CeATC2-11	CeATC2-34	CeATC2-44	Total loci
SO	<i>N</i>	42	38	39	41	44	43	38	39	45
	<i>N_a</i>	5(0)	6(0)	11(0)	16(0)	11(1)	21(1)	6(0)	5(0)	
	<i>R</i>	172-184	135-152	109-200	145-273	157-293	123-393	157-194	130-143	
	<i>A_C</i>	175	145	139	152	177	186	192	136	
	<i>Frec A_C</i>	0,321	0,737	0,321	0,329	0,375	0,244	0,474	0,372	
	<i>R_s</i>	4,914	4,735	8,701	10,231	8,469	14,453	5,464	4,949	7,740
	<i>H_e</i>	0,744	0,437	0,814	0,783	0,769	0,896	0,715	0,733	0,736
	<i>H_o</i>	0,810	0,447	0,744	0,585**	0,523**	0,721*	0,763	0,769	0,670
	<i>F_{is}</i>	-0,089	-0,024	0,087	0,255	0,322	0,197	-0,069	-0,051	0,091
OS	<i>N</i>	78	77	73	72	73	73	73	75	78
	<i>N_a</i>	9(1)	8(0)	14(1)	20(2)	15(2)	23(3)	9(0)	7(0)	
	<i>R</i>	138-193	135-158	127-179	109-282	154-265	123-382	157-194	127-150	
	<i>A_C</i>	178	145	136	155	174	171	192	136	
	<i>Frec A_C</i>	0,333	0,734	0,342	0,313	0,377	0,233	0,356	0,340	
	<i>R_s</i>	6,432	4,763	7,919	10,436	9,410	13,257	6,415	5,494	8,016
	<i>H_e</i>	0,780	0,438	0,769	0,799	0,806	0,881	0,774	0,720	0,746
	<i>H_o</i>	0,872	0,455	0,699*	0,722*	0,548**	0,822	0,753	0,653	0,691
	<i>F_{is}</i>	-0,119	-0,038	0,093	0,096	0,322	0,067	0,027	0,094	0,075

Anexo B. (continuación)

		CeATC1-22	CeATC1-36	CeATC1-52	CeATC1-54	CeATC2-4	CeATC2-11	CeATC2-34	CeATC2-44	Total loci
LA	<i>N</i>	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	<i>Na</i>	6(0)	8(0)	14(1)	13(0)	10(0)	15(0)	6(0)	7(0)	
	<i>R</i>	169-184	135-152	112-247	109-192	157-256	123-351	157-192	130-150	
	<i>A_C</i>	178	145	139	152	174	186	192	130	
	<i>Frec A_C</i>	0,467	0,667	0,383	0,283	0,333	0,300	0,500	0,333	
	<i>Rs</i>	5,519	6,088	10,562	10,810	8,525	12,515	5,589	6,133	8,218
	<i>He</i>	0,702	0,521	0,796	0,846	0,816	0,863	0,699	0,758	0,750
	<i>Ho</i>	0,700	0,500	0,667	0,600*	0,633*	0,767	0,700	0,700	0,658
	<i>Fis</i>	0,002	0,041	0,164	0,295	0,227	0,113	-0,002	0,077	0,124
SY	<i>N</i>	30	29	30	29	30	30	30	30	30
	<i>Na</i>	6(0)	7(0)	10(0)	14(0)	11(0)	15(1)	7(0)	6(0)	
	<i>R</i>	172-187	135-152	109-200	109-204	163-256	139-354	157-192	130-146	
	<i>A_C</i>	178	145	136	155	174	171	192	130	
	<i>Frec A_C</i>	0,300	0,655	0,383	0,379	0,283	0,233	0,367	0,467	
	<i>Rs</i>	5,599	5,433	8,080	10,992	9,812	12,108	6,434	5,385	7,980
	<i>He</i>	0,797	0,526	0,773	0,800	0,851	0,874	0,780	0,682	0,761
	<i>Ho</i>	0,833	0,586	0,633	0,655	0,667*	0,767	0,733	0,667	0,693
	<i>Fis</i>	-0,046	-0,117	0,184	0,184	0,220	0,125	0,061	0,023	0,091

Anexo B. (continuación)

		CeATC1-22	CeATC1-36	CeATC1-52	CeATC1-54	CeATC2-4	CeATC2-11	CeATC2-34	CeATC2-44	Total <i>loci</i>
LF	<i>N</i>	30	33	32	30	30	30	30	33	33
	<i>Na</i>	6(0)	6(0)	7(0)	11(0)	8(0)	15(0)	6(0)	6(0)	
	<i>R</i>	172-190	135-148	130-158	109-219	157-256	123-365	157-194	130-150	
	<i>A_C</i>	178	145	136	155	174	186	192	130	
	<i>Frec A_C</i>	0,400	0,652	0,328	0,367	0,367	0,250	0,300	0,485	
	<i>Rs</i>	5,784	4,799	6,338	8,889	7,118	12,222	5,444	5,002	6,950
	<i>He</i>	0,746	0,521	0,768	0,754	0,789	0,872	0,780	0,675	0,738
	<i>Ho</i>	0,767	0,485	0,688	0,500*	0,700	0,800	0,833	0,697	0,684
	<i>F_{is}</i>	-0,028	0,071	0,107	0,340	0,114	0,084	-0,069	-0,033	0,075
NM	<i>N</i>	29	30	30	28	29	28	30	31	31
	<i>Na</i>	5(0)	6(0)	7(0)	8(0)	10(0)	12(0)	5(0)	7(0)	
	<i>R</i>	172-184	135-148	130-158	148-228	163-265	123-418	157-192	127-150	
	<i>A_C</i>	178	145	136	155	174	171	157/192	130	
	<i>Frec A_C</i>	0,483	0,500	0,433	0,393	0,310	0,196	0,283	0,387	
	<i>Rs</i>	4,857	4,792	6,434	6,682	8,670	11,129	4,978	6,405	6,743
	<i>He</i>	0,680	0,618	0,749	0,720	0,834	0,900	0,776	0,778	0,757
	<i>Ho</i>	0,517*	0,667	0,700	0,429*	0,724*	0,821	0,900	0,742	0,688
	<i>F_{is}</i>	0,243	-0,080	0,067	0,409	0,134	0,089	-0,163	0,048	0,093

Anexo B. (continuación)

		CeATC1-22	CeATC1-36	CeATC1-52	CeATC1-54	CeATC2-4	CeATC2-11	CeATC2-34	CeATC2-44	Total loci
FL	<i>N</i>	47	49	49	46	47	46	49	49	49
	<i>Na</i>	6(0)	4(0)	11(0)	15(1)	10(0)	17(1)	8(1)	5(0)	
	<i>R</i>	172-190	135-145	127-200	100-192	163-265	123-418	154-192	130-143	
	<i>A_C</i>	178	145	139	155	174	171	192	130	
	<i>Frec A_C</i>	0,457	0,612	0,347	0,380	0,340	0,250	0,408	0,357	
	<i>Rs</i>	5,286	3,716	7,556	10,525	8,088	12,915	6,096	4,960	7,393
	<i>He</i>	0,702	0,543	0,772	0,808	0,810	0,888	0,761	0,748	0,754
	<i>Ho</i>	0,660	0,531	0,714	0,587*	0,617*	0,674**	0,755*	0,755	0,662
	<i>Fis</i>	0,061	0,023	0,075	0,275	0,240	0,243	0,007	-0,009	0,124
BN	<i>N</i>	50	50	50	50	45	49	50	50	50
	<i>Na</i>	7(0)	6(0)	7(0)	12(0)	7(0)	16(1)	7(0)	5(0)	
	<i>R</i>	172-190	135-152	130-158	109-204	165-177	123-418	157-194	130-143	
	<i>A_C</i>	175/178	145	136	155	177	171	192	130	
	<i>Frec A_C</i>	0,340	0,680	0,440	0,370	0,322	0,255	0,380	0,460	
	<i>Rs</i>	5,684	4,889	5,507	7,860	6,457	11,579	5,695	4,736	6,551
	<i>He</i>	0,745	0,504	0,710	0,746	0,772	0,881	0,765	0,675	0,725
	<i>Ho</i>	0,720	0,480	0,800	0,600*	0,622*	0,755	0,780	0,660	0,677
	<i>Fis</i>	0,034	0,047	-0,128	0,197	0,196	0,145	-0,019	0,023	0,066

Anexo B. (continuación)

		CeATC1-22	CeATC1-36	CeATC1-52	CeATC1-54	CeATC2-4	CeATC2-11	CeATC2-34	CeATC2-44	Total loci
SL	<i>N</i>	39	40	40	39	30	40	40	40	40
	<i>Na</i>	5(0)	5(0)	8(0)	11(0)	11(2)	8(0)	5(0)	6(0)	
	<i>R</i>	172-184	135-148	127-158	148-273	165-265	156-336	157-192	130-150	
	<i>A_C</i>	178	145	136	152	174	171	189	136	
	<i>Frec A_C</i>	0,410	0,813	0,287	0,397	0,317	0,363	0,350	0,375	
	<i>Rs</i>	4,994	4,104	7,367	7,969	9,739	7,345	4,973	5,440	6,491
	<i>He</i>	0,749	0,332	0,832	0,769	0,834	0,803	0,760	0,761	0,730
	<i>Ho</i>	0,872	0,300	0,850	0,615	0,300**	0,775	0,725	0,825	0,658
	<i>Fis</i>	-0,167	0,097	-0,022	0,201	0,644	0,035	0,046	-0,085	0,100
BO	<i>N</i>	48	49	49	47	47	48	49	49	49
	<i>Na</i>	5(0)	5(0)	11(0)	13(1)	9(0)	17(0)	7(0)	5(0)	
	<i>R</i>	172-184	135-148	124-161	148-273	165-265	123-378	157-194	130-143	
	<i>A_C</i>	175/181	145	136	152	174	171	192	136	
	<i>Frec A_C</i>	0,292	0,796	0,306	0,298	0,362	0,250	0,327	0,469	
	<i>Rs</i>	4,961	3,102	7,650	9,075	6,803	12,355	6,405	4,565	6,865
	<i>He</i>	0,764	0,340	0,804	0,812	0,745	0,884	0,786	0,670	0,726
	<i>Ho</i>	0,667	0,367	0,694	0,702	0,702	0,771	0,755	0,653	0,664
	<i>Fis</i>	0,129	-0,083	0,138	0,137	0,058	0,129	0,039	0,025	0,086

Anexo B. (continuación)

		CeATC1-22	CeATC1-36	CeATC1-52	CeATC1-54	CeATC2-4	CeATC2-11	CeATC2-34	CeATC2-44	Total loci
DZ	<i>N</i>	20	20	20	18	19	20	20	20	20
	<i>Na</i>	5(0)	3(0)	9(0)	8(0)	8(0)	11(0)	5(0)	5(0)	
	<i>R</i>	175-187	135-145	124-161	148-276	157-265	123-323	157-194	130-143	
	<i>A_C</i>	175	135	136	152	174	215	192	136	
	<i>Frec A_C</i>	0,525	0,550	0,350	0,361	0,368	0,275	0,400	0,450	
	<i>Rs</i>	4,800	2,900	8,500	8,000	7,893	10,485	4,900	4,800	6,535
	<i>He</i>	0,633	0,530	0,767	0,813	0,797	0,851	0,742	0,668	0,725
	<i>Ho</i>	0,700	0,600	0,650	0,389**	0,579*	0,650*	0,650	0,550	0,596
	<i>Fis</i>	-0,108	-0,137	0,156	0,529	0,279	0,241	0,127	0,180	0,182
Total	<i>Na</i>	12	12	33	49	25	64	15	8	
	<i>R</i>	138-196	132-161	109-301	100-314	154-293	123-452	150-201	127-150	
	<i>Rs</i>	11,910	11,869	32,670	48,633	25,000	63,207	14,922	8,000	27,026
	<i>He</i>	0,764	0,461	0,788	0,795	0,789	0,891	0,768	0,710	0,746
	<i>Ho</i>	0,760	0,430	0,735	0,615	0,557	0,801	0,739	0,685	0,665
	<i>Fis</i>	0,005	0,069	0,066	0,227	0,294	0,101	0,037	0,034	

N: número de individuos; *Na*: número de alelos (alelos privados); *R*: rango de tamaño de los alelos en pares de bases; *A_C*: tamaño en pares de bases del alelo más común; *Frec A_C*: frecuencia del alelo más común; *Rs*: riqueza alélica basada en un tamaño muestral mínimo de 18 individuos; *He*: heterozigosidad esperada insesgada de Nei; *Ho*: heterozigosidad observada; *Fis*: coeficiente de endogamia; Ajuste a equilibrio H-W: (*): significativo para un $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

Anexo C. Sitios variables localizados en los 30 haplotipos definidos para el gen citocromo b

	Posición nucleotídica																																
	1	2	3	3	4	5	5	6	8	8	9	9	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3			
	9	2	1	6	7	8	4	7	4	1	4	0	6	8	4	7	3	4	2	1	1	1	3	0	6	3	7	0	6	8	1	0	
Hap_1	G	C	T	C	T	A	A	T	C	C	C	A	C	G	G	C	A	C	T	C	C	G	T	G	T	T	C	G	C	C	G	C	
Hap_2	T	C	T
Hap_3	G
Hap_4
Hap_5	C	C
Hap_6	C	A
Hap_7	.	T	.	.	G	T
Hap_8	.	.	A
Hap_9	T	.	.	.	A	T
Hap_10	T
Hap_11	.	.	.	T	T	T
Hap_12	.	.	C	T	.	.	T	T
Hap_13	C	G	A
Hap_14	G
Hap_15	T	.	.	.	T	T	.	.	T	
Hap_16	T	.	.	.	T	C	.	.	.	T	.	.	T	
Hap_17	T	T	T	.	.	.	T	
Hap_18	G	.	.	.	T	C	.	T	T	
Hap_19	A	.	.
Hap_20	T
Hap_21	C
Hap_22	C
Hap_23	T	T	T
Hap_24	A	T	T
Hap_25	.	T	T	T	T	T	T
Hap_26	T	T
Hap_27	T	A	T
Hap_28	T	T	T
Hap_29	T
Hap_30	T	C	T

Publicaciones

Development of twelve polymorphic microsatellite markers in the edible cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia: Cardiidae)

Luisa Martínez · Alberto Arias · Josefina Méndez · Ana Insua · Ruth Freire

Received: 13 May 2009 / Accepted: 15 May 2009 / Published online: 30 May 2009
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

Abstract Twelve polymorphic microsatellites were isolated and characterized from a genomic library enriched for ATC in the commercially important cockle *Cerastoderma edule*. The microsatellite loci were analyzed in a sample of 30 individuals collected from Oosterschelde, The Netherlands. The number of alleles ranged from 3 to 17, and the values of observed and expected heterozygosity varied from 0.024 to 0.900 and from 0.399 to 0.885, respectively. No significant linkage disequilibrium was detected between loci and seven conformed to Hardy–Weinberg equilibrium. These microsatellite loci will be useful for assessment of genetic diversity and population structure in *C. edule* and will help in the sustainable management of this resource.

Keywords *Cerastoderma edule* · Edible cockle · Microsatellite markers · Population genetics

The edible cockle *Cerastoderma edule* is a bivalve of the Cardiidae family common in the intertidal areas of the Atlantic coast, occurring from the Barents Sea to western Africa. It is fished commercially in Europe, with captures ranging from 16,136 to 89,611 t according to the FAO statistics in last 10 years. To conserve and manage this resource, information about genetic diversity and population structure is required. To date, population genetic studies on *C. edule* have been based exclusively on allozyme markers and little or no support for the existence of genetically

isolated populations has been provided (Beaumont et al. 1980; Hummel et al. 1994; Beaumont and Pether 1996). Before assuming population homogeneity in this species, additional high polymorphic markers, such as microsatellites, must be used to assess the genetic variation along its geographic distribution. Here, we develop for the first time in *C. edule* 12 microsatellite markers and present estimates of genetic variability at these loci.

Genomic DNA for library construction and genotyping was isolated from a 30 mg-piece of ethanol-preserved adductor muscle according to Fernández-Tajes and Méndez (2007). Microsatellite markers were isolated from an enriched genomic library constructed following the technique described by Billote et al. (1999) with minor modifications. Approximately 2 µg of genomic DNA was digested with *AluI* and the obtained fragments ligated to adaptors (Edwards et al. 1996). Enrichment was achieved using an [ATC]₁₀ biotinylated oligo probe, after carrying out a dot-blot analysis showing that the relative richness of ATC was higher than that of other tri- and tetra-nucleotide motifs. The DNA hybridized to the probe was captured by streptavidin-coated magnetic particles (Promega). The enriched single-stranded DNA was PCR-amplified to obtain double-stranded DNA, and the product yield was cloned using the TOPO TA Cloning Kit[®] (Invitrogen). A total of 800 recombinant clones were identified by blue–white selection, transferred to nylon membranes (Amersham Biosciences) and screened by hybridization using an [ATC]₇ digoxigenin-labelled probe. Plasmid DNA of 98 hybridized clones was extracted using the QUIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Quiagen), and the insert sequenced on an ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) automated sequencer. Similarity between sequences was checked by means of an all-against-all comparison using the local BLAST tool of the program BioEdit v.7.0.9 (Hall 1999),

L. Martínez · A. Arias · J. Méndez · A. Insua · R. Freire (✉)
Departamento de Biología Celular y Molecular, Área de Genética, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña,
Zapateira s/n, 15071 A Coruña, Spain
e-mail: rfreire@udc.es

Table 1 Characterization of 12 microsatellite loci in the cockle *C. edule*

Locus	Repeat motif	Primer sequences	T _a (°C)	MgCl ₂ (mM)	N _a	Size range (bp)	H _o	H _e	Accession no.
CeATC1-5	(ATC) ₂ GTC(ATC) ₆ (AGC) ₈	F:cgctaccggcatatgcaac R:caccctccaccactagaagaaaa	60	1.5	15	195–252	0.400	0.843*	FN392214
CeATC1-22	(GAT) ₇	F:caaacctgaccgggtttatt R:tgactccacttttccagtcca	60	2.5	8	135–187	0.900	0.786	FN392215
CeATC1-36	(GAT) ₃ GTT(GAT) ₂	F:gacatgacaacacagcccca R:tgccctgctctattccac	57	1.5	6	135–151	0.367	0.404	FN392216
CeATC1-52	(ATC) ₃ (AGC) ₂ ATGGTATA(ATC) ₆ ACCATA(ATC) ₄ ATT(ATC)ATT(ATC)	F:aatctgattttgccacctct R:agctcatagaggtgtatcacgtaag	56	1.5	10	130–178	0.633	0.788	FN392217
CeATC1-54	(ATC) ₅	F:tacaagccgagaaactgct R:caatgactgcccataatgagga	60	2.5	13	108–282	0.733	0.807	FN392218
CeATC2-4	(GAT) ₄ AATGAA(GAT) ₂ N _{1,5} (GAT) ₆	F:tggaatgcatcattatgagc R:ccgattgcgttcttgaict	60	1.5	14	155–263	0.633	0.885*	FN392219
CeATC2-11	(ATG) ₂ AC(ATG) ₂ AG(ATG) ₄	F:tggtgcaattagatgctfg R:taggctcgcagaaagatggt	60	1.5	17	122–366	0.767	0.877	FN392220
CeATC2-12	(GAT) ₈	F:ggctctgactagacaacc R:cattggactcgtctcceaag	60	2.5	6	114–141	0.133	0.743*	FN392221
CeATC2-34	(TCA) ₂ ATAATTCTA(TCA) ₇	F:gccatagagccacctatt R:ggctgacaagattfgacatt	60	1.5	7	156–191	0.667	0.729	FN392222
CeATC2-44	(TGA) ₇	F:ccggagaaatctctctct R:cgcagaagaagcaaggggta	60	1.5	6	125–141	0.667	0.704	FN392223
CeATC2-46	(TGA)TGGTAA(TGA) ₃ TGGTAA(TGA) ₃ TGGTAA(TGA)	F:accaggagatgatgacc R:tcagtttaaaagcactctga	60	1.5	3	179–387	0.024	0.399*	FN392224
CeATC2-51	AACAAT(AAC) ₃ AAA(AAC) ₉ (ATC) ₅ CTC(AAC) ₂	F:gggatctgtttatcccaaa R:ctcatcattatgctcttaccctg	60	2.5	7	130–160	0.433	0.749*	FN392225

T_a annealing temperature, N_a number of alleles, H_o observed heterozygosity, H_e expected heterozygosity

* Significant Hardy–Weinberg disequilibrium after sequential Bonferroni correction

and to identify microsatellites in the genomic inserts, sequences were screened with the program Tandem repeats finder (Benson 1999). A total of 72 sequences were unique and contained at least one microsatellite. Using the software Primer 3 (Rozen and Skaletsky 2000), 56 primer pairs were designed and tested in PCR. Forty-four of these failed to produce a product or generated monomorphic or complex patterns, but 12 primer pairs yielded polymorphic scorable PCR products, and the corresponding microsatellite loci were characterized on a 30-cockle sample from a wild population at Oosterschelde (The Netherlands). Approximately 5 ng of template DNA was used in a reaction volume of 12.5 μ l containing 0.3 U of *Taq* DNA polymerase in 1 \times reaction buffer (Roche Molecular Biochemicals), 0.2 mM of each dNTP, 0.24 μ M of each primer and MgCl₂ ranging from 1.5 to 2.5 mM. The thermal cycler protocol consisted of an initial denaturation of 5 min at 95°C, followed by 34 cycles of 95°C for 30 s, 56–60°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and a final extension of 72°C for 10 min. In all PCR, one of the primers was labelled using the conventional fluorescent dye HEX or 6-FAM. Amplification products were separated on an automated sequencer and analyzed using GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems). Allele number and observed and expected heterozygosities were determined using the software Genetix v.4.03 (Belkhir et al. 2004), and tests for agreement with Hardy–Weinberg equilibrium as well as genotypic linkage disequilibrium were carried out using Genepop v.3.4 (Raymond and Rousset 1995). When multiple tests were performed the significance values were adjusted by sequential Bonferroni correction (Rice 1989). The program MicroChecker (Van Oosterhout et al. 2004) was used to examine the microsatellite data for evidence of null alleles whose frequency was estimated following Brookfield (1996).

Table 1 shows the results obtained for the 12 microsatellite loci characterized. The number of alleles ranged from 3 to 17. The observed and expected heterozygosities varied between 0.024–0.900 and 0.399–0.885, respectively. After Bonferroni correction, seven loci conformed to Hardy–Weinberg equilibrium, whereas the other five (CeATC1-5, CeATC2-4, CeATC2-12, CeATC2-46, CeATC2-51) showed significant heterozygote deficiency. The analysis with the program MicroChecker showed evidence of null alleles in the five loci, with frequencies ranging from 0.127 to 0.345, which may explain at least in part the deviations from Hardy–Weinberg equilibrium. No significant linkage disequilibrium was detected between loci. The isolated

microsatellite loci will be useful to increase the resolution of population analyses in the cockle *C. edule*.

Acknowledgements We thank Dr. H. Hummel and Dr. O. van Hoesel for supplying the cockle samples and J. García Gil for the technical assistance. This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia of the Spanish Government through project RZ2006-00005-00-00 and by Ministerio de Ciencia e Innovación through a predoctoral FPU fellowship awarded to Luisa Martínez.

References

- Beaumont AR, Pether SMJ (1996) Allozyme variation and gene flow between cockle *Cerastoderma edule* populations in southern United Kingdom. *Fish Res* 28:263–275
- Beaumont AR, Day TR, Gade G (1980) Genetic variation at the octopine dehydrogenase locus in the adductor muscle of *Cerastoderma edule* (L) and 6 other bivalve species. *Mar Biol Lett* 1:137–148
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171. Université de Montpellier II, Montpellier (France)
- Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27:573–580
- Billote N, Lagoda PJJ, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277–288
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol Ecol* 5:453–455
- Edwards KJ, Barker JHA, Daly A, Jones C, Karp A (1996) Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques* 20:758
- Fernández-Tajes J, Méndez J (2007) Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. *J Agric Food Chem* 55:7278–7282
- Hall TA (1999) BioEdit a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hummel H, Wolowicz M, Bogaards RH (1994) Genetic variability and relationships for populations of *Cerastoderma edule* and of the *C. glaucum* complex. *Neth J Sea Res* 33:81–89
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Hered* 86:248–249
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365–386
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538

Genetic diversity and population differentiation in the cockle *Cerastoderma edule* estimated by microsatellite markers

L. Martínez · J. Méndez · A. Insua ·
A. Arias-Pérez · R. Freire

Received: 3 October 2011 / Revised: 21 May 2012 / Accepted: 9 June 2012 / Published online: 23 June 2012
© Springer-Verlag and AWI 2012

Abstract The edible cockle *Cerastoderma edule* is a marine bivalve commercially fished in several European countries that have lately suffered a significant decrease in production. Despite its commercial importance, genetic studies in this species are scarce. In this work, genetic diversity and population differentiation of *C. edule* has been assessed using 11 microsatellite markers in eight locations from the European Atlantic coast. All localities showed similar observed and expected heterozygosity values, but displayed differences in allelic richness, with lowest values obtained for localities situated farther north. Global *F*_{st} value revealed the existence of significant genetic structure; all but one locality from the Iberian Peninsula were genetically homogeneous, while more remote localities from France, The Netherlands, and Scotland were significantly different from all other localities. A combined effect of isolation by distance and the existence of barriers that limit gene flow may explain the differentiation observed.

Keywords Microsatellite markers · *Cerastoderma* · Genetic variability · Population structure

Introduction

Many bivalve fisheries are currently being overexploited due to the increasing demand for seafood on a global scale. To avoid compromising the survival of these fisheries, management strategies comprising a better understanding of bivalve biology are necessary. In particular, the characterization of genetic diversity and a good understanding of population structure are important for delineating management units and maintaining the evolutionary potential. Even though low or no genetic structure is expected for most marine organisms, given their high dispersal potential and the absence of evident barriers in most of the marine environment, there are increasing reports of differentiation of bivalve populations over large and small scales (Reeb and Avise 1990; Ridgway 2001; Luttikhuisen et al. 2003; Arias et al. 2011). Exploitation without taking into account the genetic background can cause alterations of the genetic subdivision of populations and loss of genetic variation (Allendorf et al. 2008), decreasing their fitness and adaptive potential.

The cockle *Cerastoderma edule* (Bivalvia: Cardiidae) is a filter-feeding bivalve that inhabits the marine soft-bottom intertidal and shallow subtidal along the European coast. Its distribution comprises the eastern Atlantic coast, from Senegal in western Africa to the Barents Sea, reaching into marginal seas like the Baltic and the Mediterranean (Hayward and Ryland 1995). Cockles are relatively short lived, mature quickly, and have a high fecundity (Honkoop and van der Meer 1998) with very variable recruitment and population size. Cockle larvae are exposed to tidal currents and drift for approximately 30 days before metamorphosing and settling to the seabed as postlarvae (Dare et al. 2004). *Cerastoderma edule* plays a key role in coastal food webs of the northeast Atlantic and is commercially fished

Communicated by Heinz-Dieter Franke.

L. Martínez · J. Méndez · A. Insua · A. Arias-Pérez ·
R. Freire (✉)
Departamento de Biología Celular y Molecular,
Área de Genética, Facultad de Ciencias,
Universidade da Coruña, A Zapateira s/n,
15071 A Coruña, Spain
e-mail: rfreire@udc.es

in several countries including United Kingdom, Spain, France, and Portugal. According to FAO statistics, European production of this species has suffered a sharp decrease, going from 107,794 tons in 1987 to 24,799 tons in 2008. Its overexploitation is especially evident in The Netherlands, being the main producing country during the 80 and 90s, with a maximum of 76,349 tons in 1989, but with no registered production nowadays.

Despite its commercial importance, few studies regarding population genetics in *C. edule* have been carried out. Most of them are based on allozyme markers. Beaumont et al. (1980) analyzed genetic variation at the Octopine dehydrogenase (*Odh*) locus in four localities coming from Wales, France, and The Netherlands, and they found significant differences between localities situated east and west of the English Channel. By contrast, Hummel et al. (1994) studied seven allozyme loci and found high gene flow among localities from Denmark, The Netherlands, and France. Beaumont and Pether (1996), by means of nine loci, concluded that there was little differentiation of cockle beds around southern UK, without any clear separation between western and eastern localities. In a recent study, Krakau et al. (2012) used mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*COI*) to assess the genetic variability in 19 sampling sites. They found two dominant central haplotypes separated by low divergence.

This study aims to assess the genetic diversity and population differentiation of eight European localities using microsatellites as molecular markers. Being more polymorphic than allozymes and mitochondrial markers, microsatellites should be more powerful to detect genetic structure and outcrossing rates.

Materials and methods

Sample collection and DNA extraction

Samples of *C. edule* were collected from eight locations (Fig. 1): Aveiro (Portugal), San Simón, Boiro, Corcubiión and Ferrol (northwest Spain), Brest (France), Oosterschelde (The Netherlands), and Isle of Lewis (Scotland). Total genomic DNA was extracted from the adductor muscle according to Fernández-Tajes and Méndez (2007). For samples collected from Spain, DNA extraction was carried out from fresh tissue, while for the rest of localities, cockle tissue was preserved in ethanol until extraction.

Genetic variation

Individual genotypes were determined for 11 polymorphic microsatellites according to Martínez et al. (2009). Allele frequencies, observed number of alleles per locus (N_A),

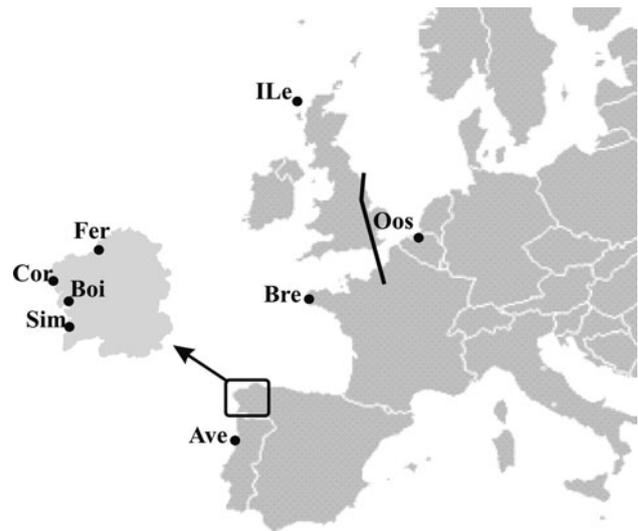


Fig. 1 Sampling sites location: Aveiro (Ave); San Simón (Sim); Boiro (Boi); Corcubiión (Cor); Ferrol (Fer); Brest (Bre); Oosterschelde (Oos); Isle of Lewis (ILe). Continuous line indicates a potential barrier to gene flow as identified by Barrier software

observed heterozygosity (H_o), and unbiased expected heterozygosity (H_e) of Nei (1978) were obtained with the Genetix v.4.03 software (Belkhir et al. 2004). Allelic richness (R_s) per locus and per locus-locality combination was computed with Fstat v. 2.9.3.2 (Goudet 2002). A Friedman test was carried out to compare allelic richness between localities with the statistical package SPSS 16.0 (SPSS Inc.). A post hoc analysis on the Friedman test was carried out as described in Bortz et al. (2000).

Tests for agreement with Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and linkage disequilibrium between pairs of loci within each locality were carried out with Genepop v.4.0 software (Rousset 2008). The significance was determined by a Markov chain method using 10,000 dememorizations, 1,000 batches, and 5,000 iterations per batch. MicroChecker software (Van Oosterhout et al. 2004) was used to examine microsatellite data for evidence of null alleles and their frequency was estimated following Brookfield (1996). The frequency of private alleles in each locality was tested for correlation with sample size. Should multiple tests be carried out, P values were adjusted using the sequential Bonferroni correction (Rice 1989).

Both the Ewens–Watterson homozygosity test (Watterson 1978; Watterson 1986) and the Ewens–Watterson–Slatkin exact test (Slatkin 1994; Slatkin 1996) were carried out to check for departures from selective neutrality using Arlequin 3.11 software (Excoffier et al. 2005).

Population differentiation

Tests for genic and genotypic differentiation for all pairs of localities were performed using Genepop v.4.0 software.

Weir and Cockerham's F statistics (1984) computed over all localities, over all loci, and on a pair-wise basis between localities were obtained using Genetix v.4.03 software, which was also used to determine probability of significance of F_{st} values by a nonparametric permutation approach (10,000 permutations). Since the F_{st} value is highly dependent on the level of genetic variation, making the interpretation and comparison of the level of genetic differentiation between loci and studies difficult, a standardized measure (F_{st}') was calculated in an analogous way to Hedrick's approach (2005). That is, the observed value of F_{st} was divided by the maximum level of genetic differentiation that can be obtained for the observed amount of genetic variation. This maximum value was calculated by recoding the data such that all populations only contain unique alleles. The standardized measure was interpreted as equal to zero when negative values of F_{st} were obtained. When multiple tests were performed, significance values were adjusted using the sequential Bonferroni correction.

A hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) locus by locus was conducted using Arlequin 3.11 software to assess the component of genetic diversity attributable to variance among groups (different regional groupings were tested), variance among localities within groups, and variance within localities.

A Mantel test with 10,000 randomizations, as implemented in software IBDWS v.3.16 (Jensen et al. 2005), was also carried out to check for linear correlation between genetic differentiation ($F_{st}/(1-F_{st})$) and the natural log of geographical distance between sample pairs (measured as the coastline distance (km) between sampling locations). Latitude and longitude coordinates were obtained for each sampling location and used along with the genetic data collected from the microsatellite analysis to generate a connectivity network of genetic distances based on Delaunay triangulation using Barrier v.2.2 software (Manni et al. 2004). Monmonier's maximum difference algorithm was then used to identify the main putative genetic boundary across the oceanographic landscapes. Significance was established by bootstrap (100 replicates used).

Results

Genetic variation statistics by locus, locality, and overall are shown in Table 1. All loci analyzed were polymorphic in all localities; number of alleles per locus ranging from eight (CeATC2-44) to 48 (CeATC2-11). Allelic richness across localities per locus varied between 5.052 (CeATC1-36) and 19.627 (CeATC1-5). Expected heterozygosity per locus ranged from 0.384 (CeATC1-36) to 0.929 (CeATC1-5), and observed heterozygosity from 0.229 (CeATC2-12)

to 0.821 (CeATC1-22). For each locus-locality pair, allelic richness ranged from 4.235 (CeATC1-36 in Aveiro) to 21.348 (CeATC1-5 in Ferrol).

Regarding localities, Friedman test ($P = 0.016$) detected significant differences in allelic richness, and post hoc analysis showed that Isle of Lewis' allelic richness was significantly different from those of Ferrol and Brest ($P = 0.004$ and $P = 0.037$, respectively). Sixty-three out of the 248 alleles detected across loci were private, although their frequency was always lower than 0.05. The number of private alleles was strongly correlated with sample size ($F_{[1,6]} = 22.992$, $P = 0.003$, $R_{adj}^2 = 0.793$). All localities showed similar values of expected and observed heterozygosity, ranging from 0.729 (Corcubión) to 0.756 (Oosterschelde) and from 0.535 (Brest) to 0.602 (Boiro), respectively, and for all of them, values of expected heterozygosity were higher than those of observed heterozygosity.

Linkage disequilibrium tests performed for all pair of loci across localities gave no significant values ($P > 0.05$) for the 440 comparisons analyzed. Fifty-five out of the 88 locality-locus combinations showed no significant deviations from HWE after sequential Bonferroni correction. Four out of the 11 loci conformed to HWE in all localities (CeATC1-22, CeATC1-36, CeATC1-52, and CeATC2-34), while three (CeATC1-5, CeATC2-12, and CeATC2-51) showed significant departures from HWE in almost all localities. All combinations departing from HWE expectations but one showed positive F_{is} values, which indicates the existence of a heterozygote deficit. The exception comprises locus CeATC2-44 in Aveiro, which shows significant departure from HWE, although F_{is} value for the combination is very close to zero. This is due to the fact that even though global homozygote and heterozygote frequencies do not differ from expected values, distribution of heterozygote genotypes is not consistent with predicted values. Deviations from HWE were also detected for all localities across loci, all of which display positive F_{is} values ranging from 0.200 (Boiro) to 0.272 (Brest).

According to Microchecker software, eight loci showed evidence of the presence of null alleles, three (CeATC1-5, CeATC2-12, and CeATC2-51) at high frequencies (>0.2) for several localities. Allele frequencies were corrected for putative null alleles using FreeNa software (Chapuis and Estoup 2007). Nevertheless, the estimated allele frequencies and the outcome of the statistical tests of differentiation were very similar to the original ones and only these are presented. Moreover, taking into account that the presence of null alleles at frequencies above 0.2 leads to a considerable overestimation of F_{st} estimators and genetic distance (Chapuis and Estoup 2007), these three loci were removed from subsequent analyses.

Ewens–Watterson homozygosity test reported deviations from neutrality at locus CeATC1-5 in Aveiro, San

Table 1 Summary statistics of genetic diversity within *C. edule*

	Ave	Sim	Boi	Cor	Fer	Bre	Oos	ILe	Total
<i>CeATC1-5</i>									
<i>N</i>	57	49	45	40	56	39	73	38	397
<i>N_A</i>	22 (1)	21 (1)	19 (1)	21 (0)	26 (5)	22 (2)	20 (1)	12 (0)	36
<i>R</i>	195–261	195–290	184–258	192–258	171–380	192–380	192–397	192–243	171–397
<i>R_S</i>	19.486	19.089	17.513	19.248	21.348	20.984	17.146	11.367	19.627
<i>A_C</i>	207	243	240	207	198	195	207	207	207
<i>A_C freq</i>	0.123	0.112	0.133	0.150	0.134	0.115	0.288	0.382	
<i>H_e</i>	0.937	0.942	0.934	0.930	0.936	0.950	0.880	0.785	0.929
<i>H_o</i>	0.667**	0.612**	0.711**	0.550**	0.607**	0.308**	0.329**	0.237**	0.506**
<i>F_{is}</i>	0.290	0.353	0.241	0.412	0.353	0.679	0.628	0.701	0.455
<i>CeATC1-22</i>									
<i>N</i>	56	52	54	41	51	47	78	45	424
<i>N_A</i>	8 (0)	9 (1)	8 (0)	7 (0)	8 (0)	8 (0)	9 (1)	7 (0)	11
<i>R</i>	166–190	163–187	166–190	166–184	166–187	169–190	135–190	166–184	135–190
<i>R_S</i>	7.159	8.348	7.389	6.940	7.676	7.278	7.296	6.378	7.346
<i>A_C</i>	175	175	175	175	172/175	175	175	175	175
<i>A_C freq</i>	0.429	0.298	0.370	0.329	0.265	0.0436	0.333	0.356	
<i>H_e</i>	0.742	0.821	0.764	0.787	0.812	0.739	0.780	0.781	0.781
<i>H_o</i>	0.750	0.885	0.704	0.756	0.902	0.787	0.872	0.889	0.821**
<i>F_{is}</i>	−0.011	−0.078	0.079	0.040	−0.113	−0.066	−0.119	−0.140	−0.052
<i>CeATC1-36</i>									
<i>N</i>	63	51	49	37	52	46	77	43	418
<i>N_A</i>	5 (0)	5 (0)	6 (0)	5 (0)	7 (0)	6 (0)	6 (0)	6 (0)	9
<i>R</i>	135–57	135–147	132–157	135–147	129–147	135–151	135–157	129–151	129–157
<i>R_S</i>	4.235	4.542	4.898	4.834	5.869	5.021	4.966	5.163	5.052
<i>A_C</i>	144	144	144	144	144	144	144	144	144
<i>A_C freq</i>	0.786	0.833	0.704	0.797	0.788	0.826	0.740	0.733	
<i>H_e</i>	0.367	0.299	0.473	0.355	0.369	0.311	0.428	0.441	0.384
<i>H_o</i>	0.333	0.255	0.367	0.378	0.308*	0.304	0.442	0.395	0.352**
<i>F_{is}</i>	0.091	0.149	0.225	−0.066	0.167	0.020	−0.032	0.105	0.085
<i>CeATC1-52</i>									
<i>N</i>	52	46	49	41	48	45	73	37	391
<i>N_A</i>	17 (4)	11 (0)	16 (3)	9 (0)	17 (2)	15 (1)	14 (0)	10 (0)	28
<i>R</i>	112–260	123–181	120–247	130–181	123–275	109–181	126–181	109–181	109–275
<i>R_S</i>	13.602	10.191	13.655	8.673	14.563	12.406	9.983	9.326	11.822
<i>A_C</i>	136	136	136	136	136	136	136	139	136
<i>A_C freq</i>	0.346	0.348	0.276	0.463	0.354	0.433	0.342	0.257	
<i>H_e</i>	0.823	0.800	0.854	0.740	0.827	0.770	0.769	0.822	0.805
<i>H_o</i>	0.808	0.761	0.816	0.756	0.729	0.756	0.699*	0.838	0.765**
<i>F_{is}</i>	0.019	0.050	0.044	−0.023	0.119	0.019	0.093	−0.031	0.050
<i>CeATC1-54</i>									
<i>N</i>	61	53	57	41	60	47	72	45	436
<i>N_A</i>	18 (1)	17 (1)	17 (2)	13 (1)	18 (0)	19 (1)	21 (4)	15 (3)	40
<i>R</i>	141–215	108–209	108–282	108–185	108–203	108–212	108–282	148–288	108–288
<i>R_S</i>	14.260	13.409	13.915	11.495	14.144	15.837	13.920	12.226	14.673
<i>A_C</i>	154	154	151	154	154	151	154	151	154
<i>A_C freq</i>	0.320	0.396	0.342	0.427	0.325	0.287	0.313	0.367	
<i>H_e</i>	0.811	0.771	0.818	0.759	0.835	0.836	0.799	0.749	0.804

Table 1 continued

	Ave	Sim	Boi	Cor	Fer	Bre	Oos	ILe	Total
H_o	0.557**	0.566*	0.684	0.537*	0.683**	0.575**	0.722*	0.533	0.617**
F_{is}	0.314	0.268	0.164	0.295	0.183	0.316	0.097	0.291	0.233
<i>CeATC2-4</i>									
N	55	57	61	34	56	38	73	38	412
N_A	13 (1)	10 (0)	9 (0)	7 (0)	10 (0)	11 (0)	14 (3)	6 (0)	19
R	161–190	155–190	155–184	161–178	155–190	155–255	152–264	164–255	152–264
R_S	10.205	8.253	7.251	6.817	8.630	10.346	10.878	5.968	10.206
A_C	172	172	172	172	172	172	172	175	172
$A_C \text{ freq}$	0.518	0.526	0.623	0.559	0.625	0.382	0.377	0.474	
H_e	0.694	0.670	0.579	0.637	0.581	0.787	0.804	0.710	0.722
H_o	0.400**	0.439**	0.426*	0.412**	0.464*	0.684	0.548**	0.605*	0.490**
F_{is}	0.426	0.347	0.26	0.357	0.203	0.132	0.320	0.149	0.321
<i>CeATC2-11</i>									
N	60	57	61	38	61	47	73	41	438
N_A	26 (3)	25 (2)	23 (4)	20 (1)	23 (2)	21 (0)	22 (3)	14 (0)	48
R	122–378	122–372	122–392	122–335	122–350	122–378	122–367	122–274	122–392
R_S	18.279	18.584	17.708	18.361	17.159	17.486	16.435	12.980	17.659
A_C	214	214	214	214	170	170	170	170	170
$A_C \text{ freq}$	0.217	0.175	0.221	0.197	0.189	0.245	0.240	0.232	
H_e	0.890	0.903	0.887	0.903	0.899	0.878	0.878	0.873	0.890
H_o	0.767*	0.842	0.853	0.763*	0.902	0.723*	0.808	0.561**	0.790**
F_{is}	0.140	0.067	0.039	0.157	–0.003	0.177	0.080	0.360	0.113
<i>CeATC2-12</i>									
N	53	52	50	31	52	40	70	32	380
N_A	11 (0)	9 (0)	9 (1)	11 (1)	13 (1)	9 (1)	7 (1)	6 (0)	19
R	84–152	84–152	117–152	84–167	84–164	84–164	84–145	84–142	84–167
R_S	9.534	7.782	8.033	11.000	11.229	8.218	5.550	5.968	9.287
A_C	123	123	129	123	123	123	123	123	123
$A_C \text{ freq}$	0.396	0.481	0.400	0.387	0.462	0.538	0.407	0.391	
H_e	0.765	0.661	0.691	0.784	0.736	0.657	0.690	0.711	0.717
H_o	0.245**	0.250**	0.180**	0.258**	0.308**	0.250**	0.143**	0.250**	0.229**
F_{is}	0.682	0.624	0.742	0.674	0.584	0.623	0.794	0.652	0.681
<i>CeATC2-34</i>									
N	59	57	58	37	57	46	73	46	433
N_A	9 (2)	10 (0)	9 (0)	8 (1)	8 (0)	8 (0)	9 (0)	5 (0)	14
R	157–200	154–194	157–194	157–197	154–194	157–194	157–194	157–191	154–200
R_S	7.342	7.970	7.810	7.786	6.874	7.022	7.418	4.999	7.154
A_C	191	191	191	191	191	191	191	191	191
$A_C \text{ freq}$	0.492	0.430	0.397	0.432	0.342	0.446	0.356	0.424	
H_e	0.697	0.751	0.769	0.747	0.763	0.735	0.774	0.731	0.750
H_o	0.661*	0.684	0.724	0.703	0.737	0.609	0.753	0.652	0.695**
F_{is}	0.052	0.090	0.059	0.060	0.034	0.173	0.027	0.109	0.074
<i>CeATC2-44</i>									
N	60	54	55	40	61	42	75	42	429
N_A	5 (0)	5 (0)	7 (0)	7 (0)	6 (0)	6 (0)	7 (1)	5 (0)	8
R	129–141	129–141	129–148	129–148	129–145	129–145	126–148	129–141	126–148
R_S	4.285	4.499	5.933	6.492	5.815	5.926	6.236	4.672	5.604
A_C	129	129	135	135	135	129	129	135	135

Table 1 continued

	Ave	Sim	Boi	Cor	Fer	Bre	Oos	ILe	Total
<i>A_C freq</i>	0.425	0.463	0.427	0.475	0.607	0.607	0.360	0.405	
<i>H_e</i>	0.633	0.610	0.669	0.643	0.582	0.587	0.720	0.684	0.665
<i>H_o</i>	0.633**	0.519	0.709	0.625	0.557	0.500	0.653	0.405**	0.585**
<i>F_{is}</i>	−0.0007	0.151	−0.060	0.028	0.042	0.150	0.094	0.411	0.120
<i>CeATC2-51</i>									
<i>N</i>	53	45	61	37	59	41	67	40	403
<i>N_A</i>	9 (0)	11 (0)	11 (1)	8 (0)	13 (0)	11 (0)	11 (0)	9 (1)	16
<i>R</i>	133–160	133–164	130–166	137–160	130–164	133–160	130–160	130–169	130–169
<i>R_S</i>	8.217	10.765	9.163	7.785	11.653	10.270	9.232	8.492	9.913
<i>A_C</i>	151	147	151	151	151	151	151	137	151
<i>A_C freq</i>	0.283	0.289	0.303	0.432	0.305	0.293	0.306	0.300	
<i>H_e</i>	0.808	0.829	0.821	0.733	0.834	0.812	0.798	0.820	0.821
<i>H_o</i>	0.547**	0.422**	0.443**	0.297**	0.339**	0.390**	0.478**	0.625	0.444**
<i>F_{is}</i>	0.325	0.493	0.463	0.598	0.596	0.522	0.404	0.240	0.459
<i>All loci</i>									
<i>N</i>	63	60	64	41	62	48	78	46	462
<i>N_{AA}</i>	13	12.091	12.182	10.545	13.545	12.364	12.727	8.636	22.545
<i>R_{SA}</i>	10.6	10.312	10.297	9.948	11.36	10.981	9.915	7.958	10.758
<i>H_e</i>	0.742	0.732	0.751	0.729	0.743	0.733	0.756	0.736	0.752
<i>H_o</i>	0.579**	0.567**	0.602**	0.549**	0.594**	0.535**	0.586**	0.545**	0.572**
<i>F_{is}</i>	0.222	0.228	0.200	0.250	0.202	0.272	0.226	0.263	0.230

N number of individuals; *N_A* observed number of alleles (private alleles), *R* size range of alleles in base pairs, *R_S* allelic richness based on a minimum sample size of 31 diploid individuals, *A_C* size in base pairs, *A_C freq* frequency of the most common allele, *H_e* expected heterozygosity, *H_o* observed heterozygosity, *F_{is}* inbreeding coefficient estimated following Weir and Cockerham (1984); *N_{AA}* average allele number, *R_{SA}* average allelic richness; * significant at 5 % level; ** significant after sequential Bonferroni correction

Simón, Boiro, and Brest, while Ewens–Watterson–Slatkin exact test did so for the same locus-locality combinations and also for Oosterschelde at locus CeATC1-54 and for Isle of Lewis at loci CeATC2-34 and CeATC1-54 (data not shown).

Global multilocus *F_{st}* value was 0.015, significantly different from zero ($P < 0.001$), and the standardized value was $F_{st}' = 0.056$. Estimates of *F_{st}* per locus ranged from 0.001 (CeATC2-11) to 0.059 (CeATC2-4), three of them (CeATC1-52, CeATC2-4, and CeATC2-44) being significant at the 5 % level (Table 2). These results fit in with those obtained when analyzing genic and genotypic differentiation using Genepop software, which detected significant differences ($P < 0.05$) for these three loci (data not shown). Of the 28 pair-wise *F_{st}* tests performed between localities, 20 were significant after Bonferroni correction (Table 3). Maximum differentiation was observed between Isle of Lewis and Ferrol ($F_{st} = 0.049$). Aveiro, San Simón, Boiro, and Corcubión localities were not significantly different from one another, while Ferrol was significantly different from all other localities except Corcubión. Brest, Oosterschelde, and Isle of Lewis were significantly differentiated from each other and from all other localities analyzed.

Table 2 *F_{st}* values per locus and overall

Locus	<i>F_{st}</i>	<i>P</i> value
CeATC1-22	0.004	0.052
CeATC1-36	0.004	0.145
CeATC1-52	0.008	0.004*
CeATC1-54	0.004	0.072
CeATC2-4	0.059	<0.001*
CeATC2-11	0.001	0.292
CeATC2-34	0.004	0.069
CeATC2-44	0.034	<0.001*
Total	0.015	<0.001*

* Significant at 5 % level

Global analysis of molecular variance (AMOVA) detected a 1.55 % variation among populations, while the percentage of variation within populations amounted to 98.44 %. Furthermore, based on the pair-wise *F_{st}* analysis results, a hierarchical analysis of molecular variance was carried out to test for the component of genetic diversity attributable to variance among different regional groups. When Aveiro, San Simón, Boiro, and Corcubión localities

Table 3 Pair-wise *Fst* values (Weir and Cockerham 1984)

	Sim	Boi	Cor	Fer	Bre	Oos	ILe
Ave	−0.001	0.000	−0.002	0.008**	0.007*	0.009**	0.031**
Sim		0.005*	−0.003	0.008**	0.010**	0.012**	0.034**
Boi			0.005	0.008**	0.016**	0.012**	0.036**
Cor				0.001	0.013**	0.015**	0.042**
Fer					0.036**	0.019**	0.049**
Bre						0.013**	0.035**
Oos							0.017**

* Significant at 5 % level;

** significant after sequential Bonferroni correction

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) performed for five groups inferred from pair-wise analysis; group 1 = Ferrol; group 2 = Corcubi3n, Boiro, San Sim3n, Aveiro; group 3 = Oosterschelde; group 4 = Isle of Lewis; group 5 = Brest

Source of variation	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation	<i>P</i> value
Among groups	42.679	0.050	1.725	<0.001*
Among populations within groups	10.239	0.006	0.190	0.265
Within populations	2,398.546	2.861	98.085	<0.001*
Total	2,451.464	2.917		

Fixation indices: *Fct* = 0.017, *Fsc* = 0.002, *Fst* = 0.019; * significant at 5 % level

were grouped, AMOVA analysis identified an among groups significant component, explaining 1.73 % of the total variance. Most of the variance was distributed within localities (98.09 %) and variance component among localities within groups was nonsignificant (Table 4). When Corcubi3n was excluded from this group and moved to form a group with Ferrol, variance component among groups kept significant ($P < 0.001$), explaining 1.59 % of the total variance, but the variance component among localities within groups, although not significant, became slightly higher (data not shown).

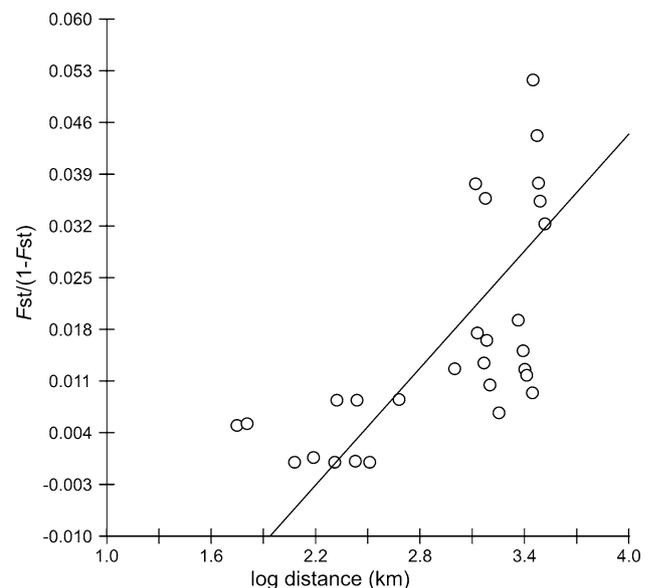
Using *Fst* pair-wise estimates and based on combined data from the eight loci, Barrier software identified a barrier to gene flow in the English Channel (Fig. 1). Mantel test revealed a significant correlation between *Fst* and geographic distance ($R^2 = 0.441$, $P = 0.005$) when all eight localities were analyzed (Fig. 2).

Discussion

This study uses, for the first time in *C. edule*, microsatellite markers to analyze genetic variation and differentiation in samples collected along the European Atlantic coast. High levels of polymorphism and heterozygosity values were detected, with allele number per locus ranging from eight to 48 and global expected and observed heterozygosity values of 0.752 and 0.572, respectively. This contrasts with values obtained for the same species using allozyme loci that showed lower number of alleles (8, Beaumont et al. 1980; 3–11, Beaumont and Pether 1996), and lower

expected (0.28, Hummel et al. 1994; 0.322, Beaumont and Pether 1996) and observed (0.436, Beaumont et al. 1980; 0.24, Hummel et al. 1994; 0.278, Beaumont and Pether 1996) heterozygosity values. Thus, microsatellite markers were, as expected, more variable than allozyme markers.

All localities showed similar values of observed and expected heterozygosity, but significant differences between them were detected for allelic richness, with the lowest values obtained for localities sampled farther north; Isle of Lewis (7.958) and Oosterschelde (9.915), the latter

**Fig. 2** Bivariate plot of log-transformed geographic distance against $Fst/(1-Fst)$ values

being no significantly different from any other locality analyzed. This contrasts with what was detected by Krakau et al. (2012), who analyzed a fragment of the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene and found higher genetic diversity values in samples of *C. edule* from the north of Europe than in those collected in the south. Indeed, within the southwestern group of their study, where almost all our localities are included, diversity values tend to increase as they move north. Even though our results do not agree with the existence of a northern refuge as postulated by the authors, differences might be caused by the use of nuclear markers against mitochondrial ones. Still, more sampling would be required to settle those differences.

However, our results are in line with the expectation that genetic diversity has an inverse relation with latitude due to the effect caused by Pleistocene glaciations, when marine fauna took shelter in the south (Hewitt 2004).

Compared to other bivalves, the mean number of alleles (22.545) in *C. edule* is in the range obtained with the same type of markers for oysters (18.533, Launey et al. 2002), clams (29.044, Vadopalas et al. 2004), and scallops (35.167, Kenchington et al. 2006). Overall expected and observed heterozygosity values obtained for *C. edule* were similar to those obtained for the other species of the genus (0.742 and 0.653 for *C. glaucum*, Tarnowska et al. 2010) but lower than those observed for other bivalve species (0.839 and 0.914, Launey et al. 2002; 0.937 and 0.596, Vadopalas et al. 2004; 0.797 and 0.731, Kenchington et al. 2006).

All but one locus-locality combinations that departed from HW expectations and all localities analyzed reported heterozygote deficits as showed by positive F_{is} values. Heterozygote deficits relative to HWE are common in marine bivalves and have been well documented not only for allozyme loci (Zouros and Foltz 1984; Gaffney 1990; Fairbrother and Beaumont 1993; Beaumont and Pether 1996) but for microsatellite markers as well (Launey et al. 2002; Hedgecock et al. 2004; Astanei et al. 2005; Carlsson and Reece 2007). Several biological and technical factors could account for the observed heterozygote deficit, such as inbreeding, Wahlund effect, selection and the presence of null alleles. The latter are the most likely cause for the heterozygote deficiencies detected here, as eight of the loci analyzed showed evidence for the presence of null alleles, three of them at frequencies above 0.2. Null alleles are a frequent feature in bivalves, a taxa often beset by amplification problems (Selkoe and Toonen 2006), and have been reported as the cause of heterozygosity deficit in many bivalve species such as geoduck clams (Vadopalas et al. 2004), oysters (Galindo-Sánchez et al. 2008), and mussels (Gardeström et al. 2008).

Although marine species' high potential for dispersal, along with the continuity of the marine habitat, tends to

oppose isolation and divergence of populations, results obtained in this survey support the existence of genetic differentiation among *C. edule* localities along the European Atlantic coast. A significant genetic structure was revealed at the level of the whole study ($F_{st} = 0.015$, $P < 0.001$). This F_{st} value is similar to those obtained in other studies that used microsatellite markers to assess genetic differentiation in other bivalve species such as oysters (Launey et al. 2002; Galindo-Sánchez et al. 2008). Morton et al. (1993) suggested that measures of differentiation for highly variable loci may be as much as an order of magnitude lower than that of traditional markers, such as allozymes. Therefore, estimates of differentiation were expected to be low because of the high variability of microsatellite loci, as the practical upper limit for F_{st} is actually the level of expected homozygosity, which is low for this type of markers, implying a reduction in their maximum F_{st} value (Charlesworth 1998; Hedrick 1999). Nevertheless, despite the effect of polymorphism on deflating F_{st} expectations, highly variable markers are valuable in exact tests of differentiation not only because of their sensitivity to gene flow (Ross et al. 1999) but also because their high variability gives them greater statistical power (Estoup et al. 1998). This has indeed been shown for several studies on aquatic species where microsatellites revealed a finer resolution of genetic structuring than allozymes (Ruzzante et al. 1999; Lundy et al. 2000; Lage et al. 2001; Mattiangeli et al. 2002; Knutsen et al. 2003; Taylor et al. 2003; Carlsson et al. 2004; Jorgensen et al. 2005). Considering the differences relative to F_{st} values depend on the marker used, a standardized value of F_{st} was computed ($F_{st}' = 0.056$), indicating moderate genetic differentiation according to Wright's (1978) guidelines. This value is higher than those obtained with allozyme loci in the same species; Hummel et al. (1994) obtained an overall F_{st} value of 0.04, detecting no significant differentiation between locations analyzed, while Beaumont and Pether (1996), with an average F_{st} of 0.015, detected little differentiation between samples coming from the UK southern coast.

F_{st} pair-wise values showed no differentiation between four localities situated northwest of the Iberian Peninsula (Aveiro, San Simón, Boiro, and Corcubión), which is supported by the AMOVA analysis, with a nonsignificant variance component among localities within groups that comprise 0.19 % of the total variance (Table 4). This indicates the existence of high gene flow rates between them. Despite the distance between Aveiro and the Spanish localities, which doubles that between San Simón, Boiro, and Corcubión, all four localities were genetically similar. Aveiro is a shallow lagoon system with high tidal flow that allows a large water renovation. This may promote larval drift to the coastal waters (Joaquim et al. 2010) and be

responsible for larvae dispersal, preventing genetic differentiation. Although Ferrol is also located northwest of the Iberian Peninsula, it showed significant differences to all other four Iberian localities analyzed but Corcubi3n. This may be due to their geographic position with respect to Cape Finisterre, where a major oceanographic boundary has been described (L3pez-Jamar et al. 1992). Another possible explanation calls on the hypothesis of “Sweepstakes Reproductive Success”, which suggests that the extremely large variance in individual reproductive success could produce, among other effects, the presence of genetic heterogeneity at reduced spatial scales (see review in Hedgecock and Pudovkin 2011).

Localities of Brest, Oosterschelde, and Isle of Lewis resulted in differences not only between them, but from all other localities analyzed. This could be a product of their geographical location, as gene flow modulates over greater distances and eventually reaches a level where the exchange of migrants is not strong enough to counter the effects of random genetic drift (Lind et al. 2007). The Mantel test revealed the existence of a significant correlation between pair-wise *F*_{st} estimates and geographical distance when all localities were analyzed. However, even though the analysis was statistically significant, graphic representation (Fig. 2) did not adjust well to a linear model; from a certain geographic distance onwards, genetic distance tends to increase sharply, more consistent with an exponential shape than a linear one. Therefore, samples at intermediate distances should be analyzed to confirm that genetic divergence between localities is a result of isolation by distance. It is important to note that geographical distance measures may not reflect real dispersal pathways, which are likely to be more complex. Isolation by distance may explain just part of the genetic differentiation observed. Nearshore circulation patterns may be affected by shoreline irregularities such as estuaries or bays, resulting in eddies and fronts that may retain larvae over time scales comparable with dispersal duration, and thus may account for enhanced local recruitment at specific locations (McShane et al. 1988; Dupont et al. 2007). This could be the case for the locality of Brest, where genetic isolation could also be influenced by the characteristics of the bay: a semi-enclosed marine ecosystem (Richard et al. 2006) favorable to the isolation of the larval pool and, in the long term, genetic isolation. Genetic isolation of this bay has already been observed for the molluscan species *Crepidula fornicata* (Dupont et al. 2007).

Barrier software suggested the presence of a barrier to gene flow situated in the English Channel. The precise situation of this barrier cannot be determined since no locations along the English Channel were analyzed. Other studies have found gene flow restrictions in this region, although the exact boundary location varied. Thus, Roman and Palumbi (2004)

in their analysis of population structure in *Carcinus maenas* by means of mitochondrial cytochrome c oxidase I DNA found a significant break between western and northern Europe located between The Netherlands and Germany. In *C. edule*, the existence of such genetic discontinuity has also been described by Krakau et al. (2012) using a fragment of the same mitochondrial sequence. Other authors situate the genetic break further south; Jolly et al. (2005) found a phylogeographic break for the polychaete *Pectinaria koreni* that separates populations coming from Brittany and the English Channel. Also, Dupont et al. (2007) found a strong hierarchical structure for the molluscan species *C. fornicata* with two groups located on both sides of the Cotentin Peninsula. In spite of the still undefined location of the genetic barrier, it is clear that the English Channel currents play an important role in gene flow, with restrictions that may promote population differentiation.

Although microsatellite markers detected genetic differentiation among localities surveyed, the level of differentiation detected in *C. edule* is lower than in the other species of the genus, *C. glaucum*. In the latter, microsatellite markers detected a high level of genetic structure between localities along the coast of Europe (Tarnowska et al. 2010). Allozyme markers also showed a higher level of differentiation in *C. glaucum* with respect to *C. edule* (Hummel et al. 1994; Mariani et al. 2002; Nikula and V3in3l3 2003). Hummel et al. (1994) pointed out that these differences could be explained by the different character of the species habitat, with *C. glaucum* individuals found in smaller, more or less limited water bodies, thus resulting in a more limited gene flow.

In conclusion, this work makes novel use of microsatellite markers to provide estimates of genetic diversity and population differentiation in *C. edule* from the Iberian Peninsula and other European locations. All localities displayed similar heterozygosity levels, but significant differences in allelic richness were observed, with the lowest values found in localities situated farther north. Localities from the Iberian Peninsula were genetically homogeneous, except for the one located farther north, and were different from those of other European sites, which may be partially explained by an isolation by distance process. Scottish, French, and Dutch localities displayed contrasting results, likely due to a combined effect of isolation by distance and the existence of barriers limiting gene flow between them. More localities should be analyzed by means of microsatellite markers in order to achieve complete knowledge of population structure and to establish the mechanisms that determine genetic differentiation in the cockle *C. edule*.

Acknowledgments We thank Jose Garc3a Gil and Rosa Garc3a D3az for their technical assistance. This work was supported by Ministerio

de Educación y Ciencia of the Spanish Government through project RZ2006-00005-00-00 and by Ministerio de Educación through a predoctoral FPU fellowship awarded to Luisa Martínez. We would also like to thank Dr. H. Hummel and Dr. O. van Hoesel for providing us with Oosterschelde cockle samples, and Dr. Rodrigo González Romero and Dr. Brad Williamson for their revision of English grammar and style.

References

- Allendorf FW, England PR, Luikart G, Ritchie PA, Ryman N (2008) Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends Ecol Evol* 23:327–337
- Arias A, Fernández-Moreno M, Fernández-Tajes J, Gaspar MB, Méndez J (2011) Strong genetic differentiation among east Atlantic populations of the sword razor shell (*Ensis siliqua*) assessed with mtDNA and RAPD markers. *Helgol Mar Res* 65:81–89
- Astaneï I, Gosling E, Wilson J, Powell E (2005) Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Mol Ecol* 14:1655–1666
- Beaumont AR, Pether SMJ (1996) Allozyme variation and gene flow between cockle *Cerastoderma edule* populations in southern United Kingdom. *Fish Res* 28:263–275
- Beaumont AR, Day TR, Gade G (1980) Genetic-variation at the octopine dehydrogenase locus in the adductor muscle of *Cerastoderma edule* (L.) and six other bivalve species. *Mar Biol Lett* 1:137–148
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier
- Bortz J, Lienert G, Boehnke K (2000) Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik. Springer, Berlin
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol Ecol* 5:453–455
- Carlsson J, Reece KS (2007) Eight PCR primers to amplify EST-linked microsatellites in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* genome. *Mol Ecol Notes* 7:257–259
- Carlsson J, McDowell JR, Diaz-Jaimes P, Carlsson JEL, Boles SB, Gold JR, Graves JE (2004) Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) population structure in the Mediterranean Sea. *Mol Ecol* 13:3345–3356
- Chapuis MP, Estoup A (2007) Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol* 24:621–631
- Charlesworth B (1998) Measures of divergence between populations and the effect of forces that reduce variability. *Mol Biol Evol* 15:538–543
- Dare PJ, Bell MC, Walker P, Bannister RCA (2004) Historical and current status of cockle and mussel stocks in The Wash. CEFAS, Lowestoft
- Dupont L, Ellien C, Viard F (2007) Limits to gene flow in the slipper limpet *Crepidula fornicata* as revealed by microsatellite data and a larval dispersal model. *Mar Ecol Prog Ser* 349:125–138
- Estoup A, Rousset F, Michalakis Y, Cornuet JM, Adriamanga M, Guyomard R (1998) Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Mol Ecol* 7:339–353
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1:47–50
- Fairbrother JE, Beaumont AR (1993) Heterozygote deficiencies in a cohort of newly settled *Mytilus edulis* spat. *J Mar Biol Assoc UK* 73:647–653
- Fernández-Tajes J, Méndez J (2007) Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. *J Agric Food Chem* 55:7278–7282
- Gaffney PM (1990) Enzyme heterozygosity, growth-rate, and viability in *Mytilus edulis*—another look. *Evolution* 44:204–210
- Galindo-Sánchez CE, Gaffney PM, Pérez-Rostro CI, 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
- Gardeström J, Pereyra RT, Andre C (2008) Characterization of six microsatellite loci in the Baltic blue mussel *Mytilus trossulus* and cross-species amplification in North Sea *Mytilus edulis*. *Conserv Genet* 9:1003–1005
- Goudet J (2002) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Hayward PJ, Ryland JS (1995) Handbook of the marine fauna of north-west Europe. Oxford University Press, Oxford
- Hedgecock D, Pudovkin AI (2011) Sweepstakes reproductive success in highly fecund marine fish and shellfish: a review and commentary. *B Mar Sci* 84:971–1002
- 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
- Hedrick PW (1999) Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53:313–318
- Hedrick PW (2005) A standardized genetic differentiation measure. *Evolution* 59:1633–1638
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the quaternary. *Philos Trans R Soc of Lond B Biol Sci* 359:183–195
- Honkoop PJC, van der Meer J (1998) Experimentally induced effects of water temperature and immersion time on reproductive output of bivalves in the Wadden Sea. *J Exp Mar Biol Ecol* 220:227–246
- Hummel H, Wolowicz M, Bogaards RH (1994) Genetic-variability and relationships for populations of *Cerastoderma edule* and of the *C. glaucum* complex. *Neth J Sea Res* 33:81–89
- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. *BMC Genet* 6:13
- Joaquim S, Pereira J, Leitao A, Matias D, Chaves R, Guedes-Pinto H, Chicharo L, Gaspar M (2010) Genetic diversity of two Portuguese populations of the pullet carpet shell *Venerupis senegalensis*, based on RAPD markers: contribution to a sustainable restocking program. *Helgol Mar Res* 64:289–295
- Jolly MT, Jollivet D, Gentil F, Thiebaut E, Viard F (2005) Sharp genetic break between Atlantic and English Channel populations of the polychaete *Pectinaria koreni*, along the North coast of France. *Heredity* 94:23–32
- Jorgensen HBH, Hansen MM, Bekkevold D, Ruzzante DE, Loeschcke V (2005) Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Mol Ecol* 14:3219–3234
- Kenchington EL, Patwary MU, Zouros E, Bird CJ (2006) Genetic differentiation in relation to marine landscape in a broadcast-spawning bivalve mollusc (*Placopecten magellanicus*). *Mol Ecol* 15:1781–1796
- Knutsen H, Jorde PE, Andre C, Stenseth NC (2003) Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. *Mol Ecol* 12:385–394

- Krakau M, Jacobsen S, Jensen KT, Reise K (2012) The cockle *Cerastoderma edule* at Northeast Atlantic shores: genetic signatures of glacial refugia. *Mar Biol* 159:221–230
- Lage C, Purcell M, Fogarty M, Kornfield I (2001) Microsatellite evaluation of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) stocks in the northwest Atlantic Ocean. *Can J Fish Aquat Sci* 58:982–990
- Launey S, Ledu C, Boudry P, Bonhomme F, Naciri-Graven Y (2002) Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *J Hered* 93:331–338
- Lind CE, Evans BS, Taylor JJU, Jerry DR (2007) Population genetics of a marine bivalve, *Pinctada maxima*, throughout the Indo-Australian Archipelago shows differentiation and decreased diversity at range limits. *Mol Ecol* 16:5193–5203
- López-Jamar E, Cal RM, González G, Hanson RB, Rey J, Santiago G, Tenore KR (1992) Upwelling and out welling effects on the benthic regime of the continental shelf off Galicia, NW Spain. *J Mar Res* 50:465–488
- Lundy CJ, Rico C, Hewitt GM (2000) Temporal and spatial genetic variation in spawning grounds of European hake (*Merluccius merluccius*) in the Bay of Biscay. *Mol Ecol* 9:2067–2079
- Luttikhuisen PC, Drent J, van Delden W, Piersma T (2003) Spatially structured genetic variation in a broadcast spawning bivalve: quantitative vs. Molecular traits. *J Evol Biol* 16:260–272
- Manni F, Guérard E, Heyer E (2004) Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by “Monmonier’s algorithm”. *Hum Biol* 76:173–190
- Mariani S, Ketmaier V, de Matthaes E (2002) Genetic structuring and gene flow in *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia: Cardiidae): evidence from allozyme variation at different geographic scales. *Mar Biol* 140:687–697
- Martínez L, Arias A, Méndez J, Insua A, Freire R (2009) Development of twelve polymorphic microsatellite markers in the edible cockle *Cerastoderma edule* (bivalvia: Cardiidae). *Conserv Genet Resour* 1:107–109
- Mattiangeli V, Galvin P, Ryan AW, Mork J, Cross TF (2002) VNTR variability in Atlantic poor cod (*Trisopterus minutus minutus*) throughout its range: single locus minisatellite data suggest reproductive isolation for the Faroe Bank population. *Fish Res* 58:185–191
- McShane PE, Black KP, Smith MG (1988) Recruitment processes in *Haliotis rubra* (Mollusca, Gastropoda) and regional hydrodynamics in south eastern Australia imply localized dispersal of larvae. *J Exp Mar Biol Ecol* 124:175–203
- Morton NE, Collins A, Balazs I (1993) Kinship bioassay on hypervariable loci in blacks and caucasians. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1892–1896
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583–590
- Nikula R, Väinölä R (2003) Phylogeography of *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia: Cardiidae) across Europe: a major break in the Eastern Mediterranean. *Mar Biol* 143:339–350
- Reeb CA, Avise JC (1990) A genetic discontinuity in a continuously distributed species - mitochondrial-DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics* 124:397–406
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223–225
- Richard J, Huet M, Thouzeau G, Paulet YM (2006) Reproduction of the invasive slipper limpet, *Crepidula fornicata*, in the Bay of Brest, France. *Mar Biol* 149:789–801
- Ridgway G (2001) Interpopulation variation in blue mussels, *Mytilus edulis* L., over short distances. *Sarsia* 86:157–161
- Roman J, Palumbi SR (2004) A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. *Mol Ecol* 13:2891–2898
- Ross KG, Shoemaker DD, Krieger MJB, DeHeer CJ, Keller L (1999) Assessing genetic structure with multiple classes of molecular markers: a case study involving the introduced fire ant *Solenopsis invicta*. *Mol Biol Evol* 16:525–543
- Rousset F (2008) Genepop’007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Notes* 8:103–106
- Ruzzante DE, Taggart CT, Cook D (1999) A review of the evidence for genetic structure of cod (*Gadus morhua*) populations in the NW Atlantic and population affinities of larval cod off Newfoundland and the Gulf of St. Lawrence. *Fish Res* 43:79–97
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol Lett* 9:615–629
- Slatkin M (1994) An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. *Genet Res* 64:71–74
- Slatkin M (1996) A correction to the exact test based on the Ewens sampling distribution. *Genet Res* 68:259–260
- Tarnowska K, Chenuil A, Nikula R, Féral JP, Wolowicz M (2010) Complex genetic population structure of the bivalve *Cerastoderma glaucum* in a highly fragmented lagoon habitat. *Mar Ecol Prog Ser* 406:173–184
- Taylor EB, Stamford MD, Baxter JS (2003) Population subdivision in westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) at the northern periphery of its range: evolutionary inferences and conservation implications. *Mol Ecol* 12:2609–2622
- Vadopalas B, Leclair LL, 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
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538
- Watterson GA (1978) Homozygosity test of neutrality. *Genetics* 88:405–417
- Watterson GA (1986) The homozygosity test after a change in population-size. *Genetics* 112:899–907
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution* 38:1358–1370
- Wright S (1978) Evolution and the genetics of populations. variability within and among natural populations, vol 4. University of Chicago Press, Chicago
- Zouros E, Foltz DW (1984) Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. *Malacologia* 25:583–591

FE DE ERRATAS

Al final del apartado 4.3.1.2. (página 81) debe añadirse el siguiente párrafo:

El test de Mantel reveló una correlación significativa entre la distancia genética y la distancia geográfica al incluir todas las localidades ($R^2=0,300$; $P=0,0001$). Sin embargo, al analizar conjuntamente las localidades de la región sur con las de Irlanda y GB, el porcentaje de variación explicado por la distancia fue ligeramente mayor ($R^2=0,323$; $P=0,003$) y aún más alto al agrupar las localidades del sur del Mar del Norte con las de la región norte ($R^2=0,536$; $P=0,006$).

