



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

ÁREA DE GENÉTICA

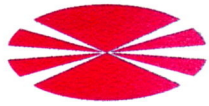
**Estudio genético poblacional en la almeja babosa**  
*Venerupis pullastra*

Memoria que para optar al Título de Doctora presenta

**Sandra María Pereira Fernández**

**2013**





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

ANA INSUA POMBO, Doctora en Biología y Profesora Contratada Doctora, RUTH FREIRE ÁLVAREZ, Doctora en Biología e Investigadora del Programa Isabel Barreto de la Xunta de Galicia y JOSEFINA MÉNDEZ FELPETO, Doctora en Biología y Catedrática de Universidad, del Área de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidade da Coruña

INFORMAN:

Que el trabajo titulado “Estudio genético poblacional en la almeja babosa *Venerupis pullastra*”, presentado por Dña. Sandra María Pereira Fernández para optar al Título de Doctora en Biología, ha sido realizado bajo nuestra dirección. Considerándolo finalizado, autorizamos su presentación y defensa.

A Coruña, 2 de mayo de 2013

Fdo. Ana Insua Pombo

Fdo. Ruth Freire Alvarez

Fdo. Josefina Méndez Felpeto



## **Financiación de la investigación**

Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto de investigación **ALBA: Identificación de marcadores de ADN en la almeja babosa *Venerupis pullastra* y su aplicación al análisis de la variabilidad genética y estructura poblacional** (PGIDIT06RMA50101PR), siendo investigadora principal la Dra. Ana Insua Pombo. Dicho proyecto se encuadra en uno más amplio **ALBA: Mejora de la producción de almeja babosa *Venerupis pullastra*** (06RMA50801PR), coordinado por la Dra Dorotea Martínez Patiño del Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo (CIMA) y financiado tres años (2006-2009) por la Consellería de Innovación e Industria de la Xunta de Galicia.

Durante la realización del presente trabajo la autora ha disfrutado de dos contratos asociados a los proyectos:

- **Desarrollo de biomarcadores citogenéticos y moleculares en al almeja fina (*Ruditapes decussatus*) en condiciones ambientales adversas.** (07MMA013103PR), financiado tres años (2007-2010) por la Consellería de Innovación e Industria de la Xunta de Galicia. Investigadora principal: Josefina Méndez Felpeto. Duración del contrato: 1 de mayo 2009-27 de julio 2010.

- **Cultivo en criadero, preengorde en batea y análisis de la diversidad genética de la coquina *Donax trunculus* de Galicia** (10MMA103013PR), financiado tres años (2007-2010) por la Consellería de Economía e Industria de la Xunta de Galicia. Investigadora principal: Josefina Méndez Felpeto. Duración del contrato: 1 de mayo 2012-20 de julio 2012.

## **Publicaciones**

**Pereira, S.M., Árias, A., Méndez, Insua, A. y Freire, R.** 2010. Isolation of twelve microsatellite markers in the pullet carpet shell *Venerupis pullastra*. Conservation Genetics Resources, 2: 201-203.



*“Queda prohibido no sonreír a los problemas, no luchar por lo que quieres, abandonarlo todo por miedo, no convertir en realidad tus sueños” Pablo Neruda*





## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento más sincero a la Dra. Josefina Méndez Felpeto por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y permitirme llevar a cabo este trabajo, además de su apoyo e innumerables consejos. A la Dra. Ruth Freire Álvarez por haber depositado su confianza en mí desde el primer momento, dedicarme tantas horas, por toda su paciencia y por conseguir que esta Tesis sea una realidad, además de una directora has sido una amiga. A la Dra. Ana Insua Pombo, por su infatigable esfuerzo en la corrección de este manuscrito, por todo el tiempo invertido y por su extraordinaria dedicación intentando llegar siempre más allá.

A la Dra. Dorotea Martínez Patiño del Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo y a su equipo, Justa Ojea Martínez, Susana Nóvoa Vázquez y Ana Cerviño Otero, por suministrar la semilla y todas las muestras de Galicia. Sin su ayuda y asesoramiento la realización de este trabajo no hubiese sido posible.

A los doctores Miguel Gaspar y Juan Fernández Tajés por proporcionar las almejas de Portugal.

A mis compañeros de laboratorio, por el buen ambiente de trabajo y la ayuda que me habéis prestado, por las sonrisas que me habéis sacado en los malos momentos y todas las que hemos compartido en los buenos. Por todos esos breaks con canciones (hits mundiales), subvenciones, clases de idiomas..., sé que a donde vaya no encontraré un grupo igual que consiga hacer amenas las largas horas que se pasan en el laboratorio. Quiero agradecer de forma especial a Luisa, más que una compañera, todas las horas de explicaciones y debates, el haberme soportado con tanta paciencia (ya sabes "te toqué en la tómbola"), el haber podido confiar en ti en todo momento y el haber estado **siempre** ahí para contarte cualquier cosa. A Jose, por toda tu ayuda, por todas tus explicaciones, por tu buen humor y por la portada de esta Tesis. Al Dr. Arias, al que no se me ocurren palabras de agradecimiento para las toneladas de paciencia que ha tenido con este trabajo y conmigo, por estar siempre dispuesto a ayudar, por ser nuestro gurú, y por resolvernó cualquier duda desde cualquier lugar del mundo. A Ana, gracias por todos los momentos que me has escuchado y por ayudarme siempre que lo he necesitado.

A mi hija Lena, gracias por tu cariño incondicional, por tu sonrisa, por todo lo que me das día a día, gracias a ti he conseguido sacar fuerzas en los malos momentos. A mi marido, por todo tu apoyo, por tus palabras, por tu cariño, por estar a mi lado y entenderme mejor que nadie, por tus

*consejos, por toda la paciencia que has tenido este último año, y sobre todo por ayudarme a cumplir mis sueños. A mis padres, sin ellos nunca podría haber llegado hasta aquí, aunque en ocasiones os ha resultado difícil comprenderme, siempre habéis estado ahí, soy lo que soy gracias a vosotros, así que este trabajo también es vuestro. A toda mi familia, que no sois pocos, a todos y cada uno de vosotros que de una forma u otra me habéis dado fuerza. En especial a Cris, cuando mis cajones comienzan a estar vacíos tú siempre encuentras alguno donde aún queda algo de paciencia, por tus palabras de ánimo y por compartir conmigo tu forma de ver la vida. A mis primosas, Cori y Bilvi, por decirme verdades como puños en los momentos adecuados, por todos los momentos que compartimos, en fin por estar siempre ahí, pase lo que pase.*

*A todos mis amigos, en especial a mis niñas, por todos los buenos momentos, los kilos de risas liberadoras de estrés que me hacen cargar las pilas. En especial a mi Pitufina, por haber dado uno de los pasos más importantes en nuestra amistad, por comprenderme y animarme como muy pocos lo hacen. A Saúl, ese pitufo pequeñín al que quiero tanto. A las girly girls, por todos los ánimos que me habéis dado estos últimos dos años.*

*A Carlos, padrino y madrina, allí donde estéis, siempre conmigo, deciros que lo conseguí.*

*A todos, sinceramente, GRACIAS.*

*A mi hija*

*A mi marido*

*A mis padres*



## Resumen

La almeja babosa *Venerupis pullastra* constituye un importante recurso en la costa atlántica de la Península Ibérica. Se explota directamente de bancos naturales pero también se cultiva para aumentar la producción y responder a la demanda del mercado. Sin embargo, los marcadores moleculares descritos y los estudios genéticos de poblaciones en esta especie son escasos. Este trabajo planteó desarrollar herramientas para la caracterización y evaluación genética del recurso y aportar datos que contribuyan a mejorar la gestión y conservación de las poblaciones naturales y los procedimientos de cultivo. Se desarrolló un panel de marcadores microsatélite (24 *loci*) y se optimizaron tres PCRs *multiplex* que amplifican cinco u ocho *loci* simultáneamente. También se desarrollaron cebadores para la amplificación de un fragmento del gen del citocromo *b* (CitB), ampliando las regiones mitocondriales dónde explorar la variación genética. Se analizó la diversidad genética de cinco localidades gallegas de diferentes rías (O Barqueiro, Barallobre, Camariñas, O Grove y Cangas) y una del sur de Portugal (Faro) en 18 *loci* microsatélite y en tres regiones mitocondriales, CitB y parte de los genes del ARN ribosómico 16S y la subunidad I de la citocromo *c* oxidasa (COI). La diversidad genética revelada por microsatélites fue similar en todas las localidades, pero los marcadores mitocondriales reflejaron oscilaciones destacables. Globalmente el nivel de diversidad genética es moderado, encontrándose en el rango o por debajo del descrito en otras especies de almeja. El análisis de 13 *loci* microsatélite indicó una alta diferenciación genética entre Faro y las localidades gallegas. La presencia de alelos privados en dos *loci* permite identificar las almejas de la localidad portuguesa. De los marcadores mitocondriales, sólo el CitB reveló diferenciación genética significativa entre algunas localidades (Barallobre-O Grove y Faro-O Grove). Los microsatélites se utilizaron también para realizar análisis de paternidades y evaluar los cambios genéticos que puede producir la obtención de semilla en criadero. Se estimó el tamaño efectivo de reproductores, que fue inferior al tamaño censal (reducción del 40%). El valor estimado predice un incremento de endogamia bajo (0,6) pero es insuficiente para evitar la pérdida de alelos a baja frecuencia ( $\leq 0,01$ ). La reducción observada puede atribuirse en gran medida a la ausencia de contribución y a una contribución desigual de los reproductores, siendo las hembras las que mostraron mayor sesgo. La semilla de criadero se analizó tanto globalmente como segregada en grupos de tamaño (pequeña, mediana y grande) para evaluar los efectos de ésta práctica. Tanto el lote de reproductores como los progenitores identificados y el conjunto de la semilla presentaron valores de diversidad genética equivalentes a los de la localidad de origen de los reproductores. Pero la semilla pequeña mostró diferencias con la mediana y grande en varios parámetros genéticos, indicando que su uso individualizado en repoblación incrementaría el riesgo de impacto genético. En términos de estructura poblacional, la semilla producida mostró una diferenciación genética significativa pero baja respecto a las localidades analizadas. En general, la calidad genética de la semilla analizada es superior a la descrita en otros bivalvos. La adopción de estrategias que aumenten el número de reproductores y equilibren su contribución, especialmente de las hembras, hace prever que se pueda obtener semilla de calidad óptima para programas de repoblación con mínimo impacto genético.



## Resumo

A ameixa babosa *Venerupis pullastra* constitúe un importante recurso na costa atlántica da Península Ibérica. Explótase directamente de bancos naturais pero tamén se cultiva para aumentar a produción e responder á demanda do mercado. Non obstante, os marcadores moleculares descritos e os estudos xenéticos de poboacións nesta especie son escasos. Este traballo tivo por obxectivo desenvolver ferramentas para a caracterización e avaliación xenética do recurso e achegar datos que contribúan a mellorar a xestión e conservación das poboacións naturais e os procedementos de cultivo. Desenvolveuse un panel de marcadores microsatélite (24 *loci*) e optimizáronse tres PCRs *multiplex* que amplifican cinco ou oito *loci* simultaneamente. Tamén se desenvolveron cebadores para a amplificación dun fragmento do xene do citocromo *b* (CitB), ampliando as rexións mitocondriais onde explorar a variación xenética. Analizouse a diversidade xenética de cinco localidades galegas de diferentes rías (O Barqueiro, Barallobre, Camariñas, O Grove e Cangas) e unha do sur de Portugal (Faro) en 18 *loci* microsatélite e en tres rexións mitocondriais, CitB e parte dos xenes do ARN ribosómico 16S e da subunidade I da citocromo *c* oxidasa (COI). A diversidade xenética revelada por microsatélites foi similar en todas as localidades pero os marcadores mitocondriais reflectiron oscilacións destacables. Globalmente o nivel de diversidade xenética é moderado encontrándose no rango ou por debaixo do descrito noutras especies de ameixa. A análise de 13 *loci* microsatélite indicou unha alta diferenciación xenética entre Faro e as localidades galegas. A presenza de alelos privados en dous *loci* permite identificar as ameixas da localidade portuguesa. Dos marcadores mitocondriais, só o CitB revelou diferenciación xenética significativa entre algunhas localidades (Barallobre-O Grove e Faro-O Grove). Os microsatélites utilizáronse tamén para realizar análise de paternidades e avaliar os cambios xenéticos que pode producir a obtención de semente no criadeiro. Estimouse o tamaño efectivo de reprodutores que foi inferior ao tamaño censual (redución do 40%). O valor estimado predí un incremento de endogamia baixo (0,6) pero é insuficiente para evitar a perda de alelos a baixa frecuencia ( $\leq 0,01$ ). A redución observada pode atribuírse en boa medida á ausencia de contribución e a unha contribución desigual dos reprodutores, sendo as femias as que mostraron maior nesgo. A semente do criadeiro analizouse tanto globalmente como segregada en grupos de tamaño (pequena, mediana e grande) para avaliar os efectos desta práctica. Tanto o lote de reprodutores coma os proxenitores identificados e o conxunto da semente presentaron valores de diversidade xenética equivalentes aos da localidade de orixe dos reprodutores. Pero a semente pequena mostrou diferencias xenéticas coa mediana e grande en varios parámetros xenéticos, indicando que o seu uso individualizado en repoboación incrementaría o risco de impacto xenético. En termos de estrutura poboacional, a semente producida mostrou unha diferenciación xenética significativa pero baixa respecto as localidades analizadas. En xeral, a calidade xenética da semente analizada é superior á descrita noutros bivalvos. A adopción de estratexias que aumenten o número de reprodutores e equilibren a súa contribución, especialmente das femias, fai prever que se poida obter semente de calidade óptima para programas de repoboación con mínimo impacto xenético.





## Abstract

The pullet carpet shell *Venerupis pullastra* is a commercially important clam in the Atlantic coast of the Iberian Peninsula. It is harvested directly in natural beds and also cultivated to increase production and respond to market demand. However, molecular markers and population genetics studies on this species are scarce. This work aimed to develop tools for genetic characterization and evaluation of this resource and to provide data that may improve the management and conservation of wild populations and culture procedures. A panel of microsatellite markers (24 *loci*) was developed and three multiplex PCRs were optimized for simultaneous amplification of five or eight *loci*. Moreover, primers for a fragment of the cytochrome *b* gene (CytB) were developed increasing the mitochondrial regions where genetic variation can be studied. The genetic diversity of five localities from different Galician *rías* (O Barqueiro, Barallobre, Camariñas, O Grove and Cangas) and one from the South of Portugal (Faro) was analyzed using 18 microsatellite *loci* and three mitochondrial regions, CytB and part of the 16S ribosomal RNA and cytochrome *c* oxidase I (COI) genes. The genetic diversity estimated using microsatellites was similar among localities but the mitochondrial markers denoted differences. Overall, the level of genetic diversity was moderate, within the range described in other clam species or lower. The analysis of 13 microsatellite *loci* showed a high genetic differentiation between Faro and the Galician localities. The presence of private alleles at two *loci* allows the identification of clams from the Portuguese locality. Of the mitochondrial markers, only the CytB displayed significant genetic differentiation between some localities (Barallobre-O Grove and Faro-O Grove). Microsatellites were also used in parentage analysis and in the assessment of genetic changes caused by hatchery seed production. The estimated effective number of breeders was lower than the census size (40% reduction). The estimated number predicts a low increase of inbreeding (0.6) but is insufficient to prevent the loss of alleles at low frequencies ( $\leq 0.01$ ). Lack of and an uneven contribution of breeders, especially females, can explain the observed reduction in the effective number of breeders. Hatchery-produced seed was analyzed globally and also by size groups (small, medium and large) to assess the effects of size grading. Breeders, identified parents and the whole seed showed genetic diversity values equivalent to that of the locality from which breeders were collected. Nevertheless, small size seed showed genetic differences with respect to the other size class, indicating that their individualized use in restocking would increase the risk of genetic impact. In relation to population structure, the seed displayed significant but low differentiation with all the localities analyzed. Globally, the genetic quality of the analyzed seed is higher than that described in other bivalves. Strategies that increase the number of breeders and balance their contribution, mainly that of females, should allow the production of optimum quality seed for restocking programs with minimal genetic impact.



## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Características generales de <i>Venerupis pullastra</i> .....	3
1.2. Importancia de la variación genética intra- e interpoblacional en las poblaciones naturales .....	5
1.3. Aspectos genéticos del cultivo en criadero .....	7
1.4. Marcadores moleculares .....	10
1.5. Estudios genéticos en <i>V. pullastra</i> .....	19
2. OBJETIVOS .....	21
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
3.1. Material de estudio.....	27
3.2. Extracción de ADN.....	28
3.3. Desarrollo de marcadores microsatélite.....	29
3.3.1. Construcción de genotecas enriquecidas .....	29
3.3.2. Rastreo de secuencias microsatélite en las genotecas.....	31
3.3.2.1. Transferencia a membrana e hibridación.....	31
3.3.2.2. Rastreo por secuenciación directa.....	33
3.3.3. Selección de secuencias microsatélite .....	33
3.3.4. PCR <i>monocus</i> de <i>loci</i> microsatélite .....	34
3.4. Diseño y optimización de PCRs <i>multiplex</i> .....	34
3.5. Análisis poblacional de marcadores microsatélite.....	35
3.5.1. Diversidad genética.....	36
3.5.2. Equilibrio Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento .....	36
3.5.3. Diferenciación poblacional .....	38
3.6. Amplificación y secuenciación de marcadores mitocondriales.....	40
3.7. Análisis poblacional de marcadores mitocondriales.....	42
3.7.1. Diversidad genética.....	42
3.7.2. Diferenciación poblacional .....	44
3.8. Análisis de relaciones genéticas entre individuos.....	44
3.8.1. Asignación de paternidades .....	44
3.8.2. Estimaciones de parentesco .....	46
3.9. Análisis de la contribución de los progenitores a la semilla.....	47
3.10. Tamaño efectivo y tasa de endogamia .....	47

4. RESULTADOS.....	49
4.1. Desarrollo de marcadores moleculares .....	51
4.1.1. Microsatélites .....	51
4.1.1.1. Desarrollo de PCRs multiplex.....	52
4.1.2. ADN mitocondrial.....	57
4.1.2.1. Análisis del modo de herencia .....	57
4.2. Análisis de poblaciones naturales mediante microsatélites.....	57
4.2.1. Diversidad genética.....	57
4.2.2. Diferenciación poblacional .....	63
4.3. Análisis de poblaciones naturales mediante marcadores mitocondriales.....	68
4.3.1. Diversidad genética.....	68
4.3.2. Diferenciación poblacional .....	77
4.4. Análisis genético del proceso de obtención de semilla en criadero .....	82
4.4.1. Asignación de paternidades y estimas de parentesco.....	82
4.4.2. Tamaño efectivo de reproductores y tasa de endogamia.....	86
4.4.3. Diversidad y diferenciación genética de la semilla vs reproductores/ progenitores vs poblaciones naturales .....	86
5. DISCUSIÓN.....	91
5.1. Marcadores microsatélite y mitocondriales.....	93
5.2. Diversidad genética de poblaciones naturales.....	98
5.3. Diferenciación genética de poblaciones naturales .....	103
5.4. Consecuencias genéticas de la producción de semilla en criadero .....	107
6. CONCLUSIONES .....	115
7. BIBLIOGRAFÍA.....	119
ANEXOS.....	143

# 1. Introducción



### 1.1. Características generales de *Venerupis pullastra*

La almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) -*Venerupis senegalensis* (Gmelin, 1791) syn., *Venerupis corrugata* (Gmelin 1791) syn.- es un molusco bivalvo perteneciente a la familia Veneridae de la clase Bivalvia (figura 1.1). Su concha es sólida, equivalva, claramente inequilateral, de perfil oval pero con aspecto rectangular debido a que los márgenes posterior y dorsal son rectos, de coloración variable y escultura de líneas concéntricas y radiales menos perceptibles (Rolan y col., 1989).



Figura 1.1. Almeja babosa *V. pullastra* (Imagen: F. Nuyttens, publicada en <http://www.marinespecies.org>).

*V. pullastra* vive enterrada en la arena, grava o fondos lodosos desde la región intermareal hasta los 40 m de profundidad y se encuentra distribuida por la costa europea, desde Noruega y el Mar Báltico hasta la Península Ibérica, el Mar Mediterráneo y a lo largo del costa atlántica de Marruecos (Tebble, 1966). En la Península Ibérica se extiende fundamentalmente por la costa atlántica y puede ocupar nichos ecológicos con otras almejas autóctonas, como la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), la almeja rubia (*V. rhomboides*) y la almeja dorada (*V. aurea*), e introducidas como la almeja japonesa (*R. philippinarum*) (Nóvoa, 2007). La capacidad de dispersión de los adultos se estima en 100-1000 m y la de las larvas en más de 10 km (Rayment, 2007).

Se trata de una especie dioica sin dimorfismo sexual en la que es necesaria la observación de las gónadas para determinar el sexo y el estado de madurez sexual, con una proporción de machos y hembras próxima al 50% (Pérez-Camacho, 1980). Las características reproductivas de *V. pullastra* varían con el ambiente. En Galicia, alcanza la madurez sexual en su primer año de vida (Pérez-Camacho, 1980), presenta gametos maduros durante todo el año y la puesta tiene lugar entre los meses de febrero y julio (Cerviño Otero, 2011). La fecundación es externa y como la mayoría de los bivalvos

pasa por un estado larvario planctónico hasta que sufre la metamorfosis, momento en el que se fija al sustrato y comienza la vida bentónica. La duración del estado larvario es de 11-30 días y el ciclo de vida abarca 6-10 años (Rayment, 2007).

Según la información proporcionada por la FAO (<http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/es>), la almeja babosa se extrae con fines comerciales principalmente en España, Portugal, Francia e Italia aunque este organismo no facilita datos estadísticos de la producción en la costa italiana. De los tres países con capturas registradas, España ocupa el primer lugar con un 54% del total (figura 1.2).

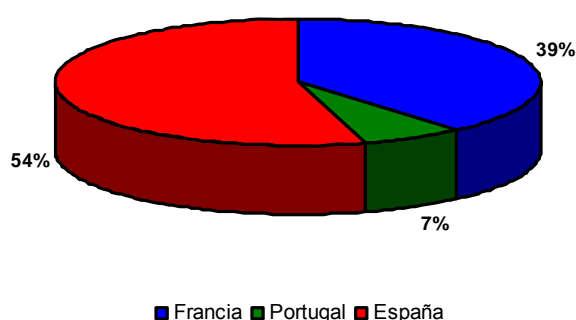


Figura 1.2. Datos de extracción relativa de *V. pullastra* desde el año 2000 hasta el 2010 en los principales países productores.

La producción en España tiene lugar mayoritariamente en Galicia (Guerra Díaz, 2012) donde la actividad del marisqueo y cultivo de moluscos tiene una larga tradición. Atendiendo a las estadísticas de la Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia (<http://www.pescadegalicia.com>), la producción en esta comunidad osciló entre 2710 t registradas en 1998 y 821 t registradas en 2006 (figura 1.3), manteniéndose en ~ 1000 t en la última década. Las capturas de *V. pullastra* superaron a las de las demás almejas hasta 2006, año en que la almeja japonesa pasó a ocupar el primer lugar. La producción anual de *V. pullastra* tiene un valor de más de 10 millones de euros, representando un importante recurso económico con amplias repercusiones sociales. La extracción se realiza a pie en la zona intermareal y a flote desde embarcaciones en la zona submareal, siendo esta modalidad la que proporciona la mayor parte de las capturas (Guerra Díaz, 2012). La explotación está sujeta a normas establecidas por la Xunta de Galicia que regulan diferentes aspectos, incluyendo las zonas y períodos de explotación, el número de mariscadores y embarcaciones, la cuota de captura y la comercialización.



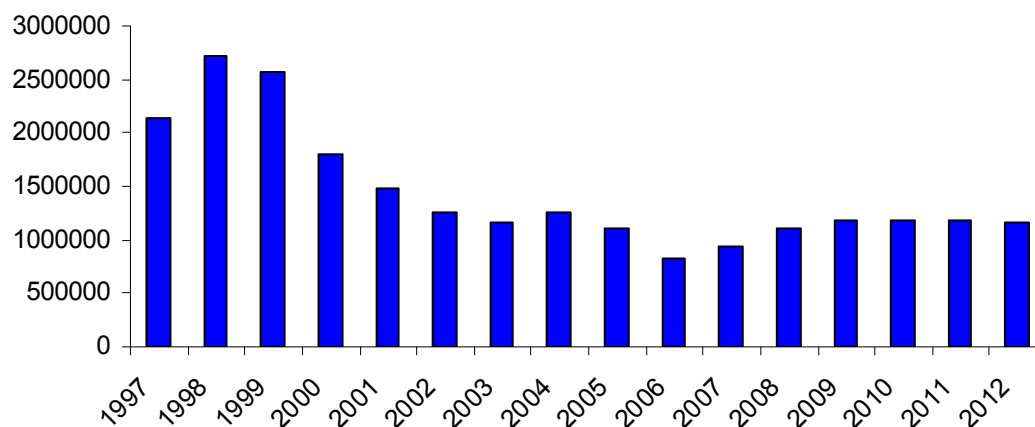


Figura 1.3. Capturas de *V. pullastra* en kg según los datos de primera venta registrados por la Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia.

La producción de *V. pullastra* es inferior a la demanda y ello ha estimulado la aplicación de estrategias que contribuyan a incrementar la producción. Éstas incluyen la recuperación de zonas improductivas y la repoblación de bancos naturales con almejas juveniles/adultas y más frecuentemente con semilla producida en criaderos. Las primeras experiencias de cultivo de *V. pullastra* datan de los años setenta (Pérez Camacho y col., 1977), realizándose innovaciones desde entonces, de forma que actualmente todas las fases del cultivo (criadero, preengorde y engorde) se realizan con éxito. El cultivo integral, desde la obtención del desove hasta la talla comercial, puede completarse en 26 meses realizando el preengorde y engorde en un sistema intermareal, y acortarse a 18 meses cuando el preengorde se inicia en primavera y preengorde y engorde se realizan en suspensión (Cerviño Otero, 2011). Datos del año 2005 indican que el cultivo proporcionó 269 t, un valor por debajo de su potencial (Pérez-Camacho, 2007).

## 1.2. Importancia de la variación genética intra- e interpoblacional en las poblaciones naturales

La diversidad genética permite a las poblaciones adaptarse a los cambios del medio ambiente, siendo necesaria para la continua evolución de las especies. Por ello, la conservación y uso de los recursos acuáticos requiere conocer su diversidad genética y los factores que le afectan.

La diversidad genética se refleja en diferencias entre individuos para muchos caracteres incluyendo caracteres morfológicos, proteínas y secuencias de ADN y ha

sido evaluada en muchas especies de bivalvos explotadas comercialmente (Saavedra, 2007). En las almejas Veneridae que más se explotan en la costa europea se dispone de estimas de diversidad genética para *R. decussatus* (Jarne y col., 1988; Borsa y col., 1994; Passamonti y col., 1997; Jordaens y col., 2000; Cordero y col., 2008; Gharbi y col., 2010; 2011) y *R. philippinarum* (Moraga, 1986; Passamonti y col., 1997; Park y col., 2002; Liu y col., 2007; Cordero y col., 2008; Vargas y col., 2008; Yasuda y col., 2007; An y col., 2009; Chiesa y col., 2011; Mura y col., 2012) de varias localidades pero en *V. pullastra* tan solo se ha estimado en dos localidades de la costa portuguesa (Joaquim y col., 2010).

Además de la diversidad genética presente en las poblaciones interesa conocer las diferencias genéticas entre poblaciones ya que la existencia de diferenciación indicaría una evolución independiente. La ausencia de barreras geográficas en los océanos, la existencia a menudo de tamaños poblacionales elevados y una fase larvaria planctónica que facilita una alta dispersión ha llevado a considerar que las especies marinas muestran una diferenciación genética interpoblacional baja (Ward, 2000; Launey y col., 2002). Sin embargo, cada vez son más numerosos los casos en que se detecta una diferenciación genética significativa a mayor o menor escala (Saavedra, 2007). En el contexto de la costa atlántica de la Península Ibérica el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Diz y Presa, 2008), el bereberecho *Cerastoderma edule* (Martínez y col., 2013) y el longueirón *Ensis siliqua* (Arias y col., 2011) presentan diferenciación genética entre al menos algunas de las localidades examinadas.

En términos generales, la diferenciación genética de poblaciones se debe a una interacción histórica entre el medio ambiente y las fuerzas de dispersión, deriva genética, adaptación y mutación (Beaumont y Hoare, 2003; Saavedra, 2007). Por ejemplo las condiciones climáticas del Pleistoceno (sucesión de glaciaciones separadas por periodos interglaciares) provocaron que las especies acuáticas de regiones templadas del hemisferio norte quedaran aisladas en refugios por largos periodos de tiempo. Factores físicos como corrientes marinas, temperatura y salinidad pueden igualmente favorecer la diferenciación local al influir en la capacidad de dispersión y en consecuencia en el flujo génico. Tamaños poblacionales pequeños sostenidos, reducciones temporales del tamaño poblacional (cuellos de botella) y establecimiento de una población con un número reducido de fundadores pueden producir cambios

aleatorios en las frecuencias alélicas (deriva genética) que conducen a la divergencia genética de las poblaciones. El efecto de la deriva depende del tamaño efectivo de población, el cual corresponde al tamaño de una población ideal (apareamiento aleatorio, tamaño constante, igual número de machos y hembras y ausencia de diferencias individuales en fecundidad) que experimenta la misma tasa de cambio que la población real (Kliman y col., 2008). En especies marinas con alta fecundidad y mortalidades elevadas en las primeras fases de la vida, el tamaño efectivo de población puede ser sustancialmente menor que el tamaño censal (Hedgecock, 1994), referido éste al número de individuos de una población, por lo que el efecto de la deriva no puede desestimarse incluso en poblaciones grandes. Además de la deriva, la adaptación local debida a la selección, y mutaciones aleatorias acumuladas y sumadas a los fenómenos adaptativos y estocásticos conducen a la diferenciación poblacional.

Dado que las especies marinas pueden estar divididas en poblaciones locales que difieren genéticamente (stocks), el desarrollo de una estrategia óptima de gestión no puede ignorar la estructura genética (Ward, 2000). Los análisis de crecimiento, supervivencia y éxito reproductivo asumen que el objeto de estudio es una población, por lo que de existir mezcla de poblaciones los resultados no serían válidos (Coyle, 1998). Por otra parte, como los diferentes stocks también reflejan la variabilidad genética, la sobreexplotación o extinción de un stock particular conllevaría pérdida de variabilidad y en consecuencia el uso sostenible de cada stock requeriría una gestión separada (Cochrane, 2002). La evaluación de la estructura genética también desempeña un papel básico en la toma de decisiones sobre el riesgo genético del traslado de especímenes de unas áreas a otras (Johnson, 2000) y de programas de repoblación (Ward, 2006).

### **1.3. Aspectos genéticos del cultivo en criadero**

Para satisfacer la demanda creciente de productos del mar, entre ellos bivalvos, se requiere incrementar la producción. Dado que la oferta de las pesquerías tradicionales es improbable que aumente significativamente debido a que los stocks naturales están sobreexplotados o se están explotando a niveles máximos o cerca de niveles máximos, cualquier incremento productivo importante debe venir de la acuicultura (Helm y Bourne, 2006).

Una estrategia habitual para incrementar la producción es repoblar los bancos naturales con semilla producida en criadero por desove masivo de reproductores recogidos en el medio natural. Las ventajas de producir semilla en criadero incluyen la fiabilidad, la capacidad de satisfacer la demanda y la posibilidad de llevar a cabo programas de selección genética (Helm y Bourne, 2006). No obstante, debe tenerse en cuenta que tanto los reproductores utilizados como fenómenos que pueden tener lugar en el criadero (deriva genética, incremento de la tasa de endogamia y selección) tienen el riesgo de provocar cambios significativos de forma que la semilla producida difiera genéticamente de los progenitores y de la población natural (Taniguchi, 2003; Ward, 2006; Bert y col., 2007; Roodt-Wilding, 2007; Camara y Vadopalas, 2009).

Los reproductores utilizados en el criadero deben proceder de la población a repoblar o, en su defecto, de una población genéticamente similar para mantener su diversidad genética (Ward, 2006; Bert y col., 2007). Si los reproductores no son genéticamente representativos de la población a repoblar, obviamente tampoco lo será la semilla producida. Además, la alta fecundidad de muchas especies, incluyendo almejas, hace que un pequeño número de reproductores resulte suficiente para producir un elevado número de descendientes. Incluso la utilización de un número elevado de reproductores en desoves masivos puede provocar cambios genéticos por un desequilibrio en la proporción de sexos o un desequilibrio en la contribución de los parentales. En estas circunstancias el tamaño efectivo de los reproductores será menor que el tamaño censal (Hedgecock, 1994; Gaffney, 2006; Hedgecock y Coykendall, 2007).

El tamaño efectivo de reproductores es un parámetro clave por estar inversamente relacionado con la tasa de endogamia y la deriva genética (Frankham y col., 2002). Genéticamente, la endogamia provoca un descenso de la heterocigosidad lo cual puede llevar a disminuir la eficacia biológica (depresión endogámica). La deriva genética al provocar fluctuaciones en las frecuencias alélicas puede conducir a una pérdida de alelos y también a una disminución de la heterocigosidad. En consecuencia, el efecto último de un tamaño efectivo de reproductores reducido es una disminución de la eficacia biológica y de la diversidad genética.

Otro factor que puede afectar a la composición genética de la semilla es la selección (Pampoulié y col., 2006; Roodt-Wilding, 2007; Camara y Vadopalas, 2009).

Las condiciones de cultivo al diferir de las del medio natural inevitablemente ejercen una presión selectiva diferente pudiendo dar lugar a cambios en caracteres que son selectivamente más ventajosos en el medio del criadero.

Por otro lado, debido a que las larvas y semilla de bivalvos muestran una gran variación fenotípica, particularmente en crecimiento y supervivencia, es habitual en los criaderos separar los individuos de menor y mayor tamaño para mejorar el crecimiento, la supervivencia y la eficacia de la alimentación. Esta práctica reduce los efectos negativos de la dominancia al evitar que competidores de mayor tamaño interfieran en el crecimiento y la supervivencia de los más pequeños. También es común descartar los ejemplares más pequeños para acortar la permanencia en el criadero y reducir la variabilidad de tamaño. Sin embargo, estas prácticas pueden tener un impacto significativo en la retención de la diversidad genética debido a que las clases de tamaño pueden ser genéticamente heterogéneas (Taris y col., 2006; Frost y col., 2006; Borrell y col., 2011).

El mantenimiento de la diversidad genética y la prevención de endogamia en la semilla producida en criadero pueden verse facilitados por el análisis de paternidades. La estrategia habitual de desove en masa y mantenimiento de las familias en el mismo tanque ha supuesto un obstáculo para el análisis de paternidades. Tradicionalmente, la identificación de familias individuales resultaba laboriosa al tener que mantener a cada familia en tanques separados hasta que los descendientes alcanzaran un tamaño suficiente para realizar un marcado físico. Actualmente, en diversas especies de interés en acuicultura incluyendo bivalvos (ej. MacAvoy y col., 2008; Petersen y col., 2008; Li y col., 2009; Lind y col., 2009; Lallias y col., 2010; Lu y col., 2012) se han desarrollado pruebas de paternidad que permiten asignar retrospectivamente el origen familiar a individuos de familias mezcladas en el mismo tanque sin necesidad de marcas físicas. Las pruebas de paternidad asignan los padres a un individuo o grupo de individuos combinando información genética con métodos estadísticos. El método más utilizado es el de la asignación categórica que, mediante verosimilitud o aproximaciones bayesianas, elige el progenitor más probable en un grupo de progenitores potenciales, basándose en que los diferentes genotipos parentales pueden diferir en la probabilidad de haber producido el genotipo de un descendiente dado (Jones y col., 2010). Al identificar cada uno de los parentales, los análisis de paternidades permiten cuantificar

su contribución a la semilla (incluyendo las clases de tamaño) y conocer el sistema real de apareamiento, lo cual, combinado con una determinación previa del sexo de los reproductores, permite evaluar la incidencia de ausencia de desove, sesgos en la contribución individual y familiar, sesgos en la proporción de sexos y, en consecuencia, la relación entre tamaño efectivo de reproductores y tamaño censal. El conocimiento de estos aspectos es esencial no sólo para estimar la pérdida de diversidad e incremento de endogamia sino también para determinar las causas involucradas y proponer pautas de manejo que minimicen su incidencia. A pesar de la importancia de los análisis de paternidades en el criadero, todavía no se han realizado en *V. pullastra*.

#### **1.4. Marcadores moleculares**

Para estimar la variabilidad genética se emplean marcadores genéticos los cuales corresponden a caracteres heredables con variación (polimórficos). Los primeros marcadores genéticos empleados se basaron en las diferencias más evidentes del fenotipo, los caracteres morfológicos. Estos marcadores pueden ser fáciles de detectar y medir pero a veces los criterios empleados para definirlos son subjetivos y además pueden verse influenciados por el ambiente. Posteriormente se desarrollaron marcadores moleculares, los cuales incluyen proteínas y ADN.

Los marcadores proteicos más utilizados son las alozimas y su análisis surge del desarrollo de la electroforesis en geles de almidón y tinciones histoquímicas (Lewontin y Hubby, 1966; Harris, 1966). Las alozimas son productos proteicos codificados por diferentes alelos de un *locus*. La variación detectada con las alozimas resulta de mutaciones que alteran su carga, tamaño o configuración. Son marcadores codominantes cuya función es conocida y su análisis conlleva un bajo coste. Sin embargo, tienen la desventaja de que el número observado de alelos suele ser bajo (2-6), al no detectarse los cambios en el ADN que no afectan a la movilidad electroforética de la proteína, algunos *loci* están sujetos a una selección significativa y su análisis requiere tejido fresco o recién congelado (Ferguson y col., 1995; Liu y Cordes, 2004).

El descubrimiento de enzimas de restricción, la reacción en cadena de la polimerasa y técnicas de secuenciación ha llevado al desarrollo de marcadores moleculares basados en el ADN. En comparación con los marcadores alozímicos, su análisis requiere menor cantidad de tejido, el cual puede ser fresco, congelado o

conservado en etanol, el número potencial de marcadores es mucho mayor al encontrarse tanto en regiones codificantes como no codificantes, los *loci* pueden ser multialélicos y la mayoría no están sujetos directamente a la selección (Ferguson y col., 1995; Sunnucks, 2000). Actualmente existen distintos tipos de marcadores moleculares de ADN, los más utilizados en organismos marinos se detallan a continuación.

Los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs: *Restriction Fragment Length Polymorphisms*; Botstein y col., 1980) reflejan la variación en el patrón de fragmentos de ADN producido por una enzima de restricción. La variación observada se debe a mutaciones puntuales en los sitios de restricción e inserciones/deleciones o reordenaciones en o entre los sitios de restricción. Tradicionalmente, los RFLPS se analizaron mediante *Southern blot* pero esta técnica ha sido reemplazada por la amplificación del *locus* de interés vía PCR, digestión con una enzima de restricción (si el polimorfismo es causado por una mutación puntual) y posterior separación y visualización de fragmentos. Los RFLPs son marcadores codominantes pero muestran bajo polimorfismo y requieren tener conocimiento de la secuencia a analizar para el diseño de cebadores o sondas de hibridación (Liu y Cordes, 2004).

Los ADN polimórficos amplificados al azar (RAPDs: *Random Amplified Polymorphic DNAs*) están basados en la amplificación de fragmentos aleatorios del genoma con un solo cebador de pequeño tamaño (~10 pb) y secuencia aleatoria (Williams y col., 1990). Normalmente se amplifican simultáneamente múltiples fragmentos representando cada uno un *locus*. La variación observada se debe a inserciones/deleciones y mutaciones puntuales que modifican la secuencia/distancia de los sitios de hibridación del cebador pero se analiza en base a la presencia/ausencia de producto (marcadores bialélicos). Teniendo en cuenta que en los genomas la fracción no codificante suele ser más abundante que la codificante, se asume que la mayoría de *loci* amplificados son selectivamente neutros.

Los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLPs: *Amplified fragment length polymorphisms*; Vos y col., 1995), al igual que los RAPDs, son marcadores multi-*locus*. Se obtienen al amplificar fragmentos de ADN generados por digestión con dos enzimas de restricción y ligados a adaptadores específicos de las enzimas utilizadas. Los cebadores empleados son complementarios a los adaptadores,

pero llevan de uno a tres nucleótidos arbitrarios en el extremo 3' para reducir el número de fragmentos amplificados. La variación observada corresponde a la revelada por los RFLPs, además de la debida a sustituciones de bases en los sitios de hibridación selectivos de los cebadores.

Tanto los RAPDs como los AFLPs presentan la ventaja de que no precisan conocer la secuencia nucleotídica que se amplifica, de modo que se pueden emplear en cualquier especie de forma rápida y económica. Ambos marcadores, pero sobre todo los AFLPs, revelan un número elevado de polimorfismos (ej. más de 100). Su principal desventaja es que los marcadores identificados son dominantes y no se distingue entre homocigotos y heterocigotos. Además, la reproducibilidad de los RAPDs es discutida.

Los polimorfismos del ADN mitocondrial (ADNmt) incluyen inserciones/deleciones y más frecuentemente mutaciones puntuales (Awise, 2004). La variación en el ADNmt se analizó tradicionalmente mediante análisis de restricción pero actualmente se impone la secuenciación directa. En animales, el ADNmt generalmente consta de una molécula circular de 15-20 kb con 37 genes, dos que codifican para los ARNs de los ribosomas mitocondriales (12S y 16S), 22 para ARNs transferentes y 13 para proteínas, y una región no codificante hipervariable con elementos de control de la replicación y transcripción (Boore, 1999). Las proteínas codificadas corresponden a subunidades de diferentes complejos multienzimáticos implicados en la cadena de transporte de electrones y en la fosforilación oxidativa (ej. subunidades I, II y III de la citocromo *c* oxidasa o el citocromo *b*). El ADNmt evoluciona alrededor de un orden de magnitud más rápido que el ADN nuclear de copia única debido en parte a que los mecanismos de reparación de daños del ADN son poco eficientes en las mitocondrias (Wilson, 1985). Otras características generalmente atribuidas al ADNmt incluyen: (i) herencia clonal y materna, sin recombinación genética, lo cual significa que el genoma completo se comporta como un solo *locus*, reteniendo la información filogenética de las mutaciones acumuladas, y que el tamaño efectivo de población es un cuarto del de los genes nucleares diploides, acentuando los efectos de la deriva genética; y (ii) los genes se comportan como selectivamente neutros y el grado de divergencia está en consonancia con el tiempo de divergencia (Johnson, 2000; Awise, 2004; Galtier y col., 2009). No obstante, estas supuestas características no siempre se cumplen (Galtier y col., 2009).



Es de destacar que en algunas especies de varias familias de bivalvos, Donacidae, Hyriidae, Solenidae, Mytilidae, Unionidae, Veneridae, Margaritiferidae (Theologidis y col., 2008) y probablemente Nuculanidae (Boyle y Etter, 2013), el ADNmt muestra un particular modo de herencia denominado herencia doblemente uniparental (DUI: *Doubly Uniparental Inheritance*). En este caso existen dos tipos de ADNmt, uno que se transmite a través del huevo a machos y hembras de la descendencia (tipo F) y otro que se transmite por el esperma a la descendencia masculina (tipo M). Aunque existen excepciones ocasionales, las hembras adultas son homoplásmicas para el tipo F y los machos son mosaicos heteroplásmicos con el tipo F dominando en el tejido somático y el tipo M en el gonadal. DUI se ha descrito en especies de diferentes familias pero su detección es esporádica y se debate sobre un origen único o múltiple (Theologidis y col., 2008). Otra particularidad de las especies con DUI es que los genomas F y M pueden presentar recombinación (Ladoukakis y Zouros, 2001; Rokas y col., 2003).

A pesar de que las propiedades evolutivas del ADNmt puedan diferir de lo que tradicionalmente se ha supuesto, su utilización como marcador en el análisis de la diversidad genética está ampliamente extendida. La existencia de múltiples copias de ADNmt en cada célula y la existencia de regiones variables flanqueadas por regiones conservadas apropiadas para el diseño de cebadores de PCR hacen que el análisis del ADNmt constituya una de las formas más sencillas y baratas de caracterizar especies no estudiadas genéticamente (Galtier y col., 2009).

Otro tipo de marcadores moleculares son los microsatélites, secuencias cortas de ADN (menos de unos cientos de pares de bases) constituidas por motivos de 2 a 6 pb repetidos en tándem (Chambers y MacAvoy, 2000). Se han encontrado en todos los organismos eucariotas y procariotas estudiados en regiones codificantes y sobre todo en no codificantes, no obstante, la riqueza, distribución y frecuencia de los distintos tipos de repeticiones varía dentro de un genoma y entre genomas, incluso de especies cercanamente emparentadas (Hancock, 1999; Tóth y col., 2000; Neff y Gross, 2001; Chistiakov y col., 2006). El origen de los microsatélites se atribuye generalmente a secuencias anónimas que sufren cambios de bases e inserciones/delecciones pero también a la extensión del extremo 3' de transcritos de retrotransposones (Schlötterer, 2000; Balaesque, 2007).

La característica clave de los microsatélites como marcadores moleculares es su hipermutabilidad, siendo hipervariables en especies y poblaciones (Chistiakov y col., 2006). La tasa de mutación,  $10^{-2}$ - $10^{-6}$  por *locus* y generación (Ellegren, 2000), es varios órdenes de magnitud superior a la del ADN no repetitivo,  $10^{-9}$  (Li, 1997). El polimorfismo de estos marcadores se debe predominantemente a diferencias de tamaño debidas a variaciones en el número de repeticiones presentes en los alelos de un *locus* dado. Los mecanismos mutacionales implicados en la variación del número de repeticiones son el deslizamiento de cadenas durante la replicación y la recombinación (Schlötterer, 2000; Balaresque, 2007; Li y col., 2002; Chistiakov y col., 2006). El deslizamiento de cadenas durante la replicación hace que la cadena molde y su copia cambien sus posiciones relativas, de manera que se forma un bucle en la cadena molde o en la copia, que de no repararse conduce a la pérdida o a la ganancia de unidades de repetición del microsatélite. La recombinación cambia el tamaño del microsatélite por entrecruzamiento desigual, donde el apareamiento de repeticiones no alélicas provoca pérdida de unidades en una cadena de ADN y ganancia en la otra, y también por conversión génica mediante intercambio no recíproco. Los modelos más relevantes para explicar la evolución de los microsatélites son: el modelo de infinitos alelos (*Infinite Allele Model*), según el cual una mutación produce sólo nuevos alelos por pérdida o ganancia de un número variable de repeticiones por lo que el resultado no depende del estado alélico previo de la población (Kimura y Crow, 1964); el modelo de k alelos (*K-Allele Model*) que asume k posibles estados alélicos en una población y cada alelo tiene una probabilidad constante de mutar de entre los k-1 estados alélicos restantes (Crow y Kimura, 1970); y el modelo de mutación paso a paso (*Stepwise Mutation Model*) que supone que las mutaciones provocan la pérdida o ganancia de una sola unidad de repetición y por tanto las mutaciones tienen lugar sobre alelos ya presentes en la población (Kimura y Otha, 1978). La importancia de determinar el modelo mutacional más idóneo radica en que numerosos parámetros en genética de poblaciones (ej. distancias genéticas entre poblaciones, tamaño efectivo de población y número de migrantes por generación) dependen del modelo utilizado. Sin embargo, no existe consenso sobre qué modelo es el más apropiado.

Generalmente, los marcadores microsatélite se consideran selectivamente neutros. No obstante, se ha demostrado la importancia funcional de algunos microsatélites en procesos biológicos (Kashi y col., 1997; Li y col., 2002). Repeticiones

trinucleotídicas están implicadas en trastornos humanos neurodegenerativos como la enfermedad de Huntington (Schlötterer, 2000) y algunos microsatélites se han relacionado con la regulación de procesos metabólicos del ADN (replicación, recombinación, mecanismos de reparación y ciclo celular), la organización de la cromatina (organización cromosómica, estructura del ADN, centrómero y telómero) y la regulación de la actividad de los genes (transcripción, traducción, proteínas de unión al ADN).

Los microsatélites son marcadores codominantes que se amplifican fácilmente por PCR y presentan elevada reproducibilidad (Schlötterer, 1998). Aunque en algunos casos se han podido realizar amplificaciones interespecíficas (ej. Primmer y Ellegren, 1998; An y col., 2009; Hoffman, 2009), el hecho de que estos marcadores se suelen encontrar en regiones no codificantes, donde la tasa de sustitución nucleotídica es elevada, hace que la mayoría de las veces haya que aislarlos *de novo* cuando se comienza el estudio en una nueva especie (Zane y col., 2002). El método tradicional para el aislamiento de marcadores microsatélite se basa en la construcción de librerías genómicas parciales y el rastreo de las mismas con una sonda que contiene la repetición microsatélite. Este método es tedioso y presenta un bajo rendimiento, por lo que se han buscado estrategias alternativas sobre todo en especies donde la abundancia de microsatélites no es muy elevada (Zane y col., 2002). Algunos métodos construyen genotecas enriquecidas en secuencias microsatélite partiendo de genotecas de ADN de cadena simple que sirven de molde en una reacción de extensión de un oligonucleótido con motivos microsatélite, de forma que solo se formará ADN de doble cadena en los clones que contengan el motivo buscado (Ostrander y col., 1992; Paetkau, 1999). En otros casos, las genotecas enriquecidas se generan clonando fragmentos de ADN genómico seleccionados mediante hibridación con sondas microsatélite (Karagyozov y col., 1993; Kijas y col., 1994; Billote y col., 1999). También existen estrategias que evitan la construcción y rastreo de una genoteca, como los métodos basados en la hibridación y clonación de bandas generadas a partir de otros marcadores moleculares como RAPDs, AFLPs o ISSRs (Morgante y Vogel, 1996; Lunt y col., 1999; Lian y col., 2001) o los métodos basados en búsqueda de microsatélites en bases de datos de secuencias (Westgaard y col., 2007; Jones y col., 2011; Wang y col., 2011). La desventaja de estos métodos es que en el primer caso el rendimiento suele ser bajo y en el segundo no pueden aplicarse a especies poco estudiadas a nivel genómico.

Una vez aisladas las secuencias microsatélite se examina su polimorfismo mediante PCR con cebadores que hibridan en las regiones flanqueantes y las variantes alélicas se separan por electroforesis en geles de poliacrilamida o secuenciadores automáticos. Al tratarse de marcadores basados en la PCR el análisis de microsatélites es relativamente sencillo pero el genotipado de múltiples *loci* en muestras amplias de individuos necesarias en estudios poblacionales es costoso en tiempo y dinero. Para minimizar este inconveniente pueden desarrollarse PCRs *multiplex*, técnica que consiste en amplificar simultáneamente múltiples *loci* en una única reacción. El uso de PCRs *multiplex* en diferentes organismos marinos (ej. Taris y col., 2005; Wang y col., 2010; Mura y col., 2012) ha demostrado que esta técnica reduce significativamente tanto el coste como el tiempo invertido en el genotipado de múltiples *loci*.

A diferencia de los demás marcadores moleculares, los microsatélites reúnen una combinación de características como herencia mendeliana, codominancia y elevado polimorfismo que los hacen especialmente idóneos para la identificación individual y análisis de paternidad y parentesco. Con muy pocos *loci* es posible encontrar combinaciones genotípicas únicas para cada individuo y familia (Estoup y Angers, 1998).

Aunque los microsatélites presentan muchas características ventajosas también presentan limitaciones. Además de una dinámica evolutiva compleja, ausencia de neutralidad en algunos casos y aislamiento laborioso, un problema frecuente son los alelos nulos, alelos que no amplifican por la existencia de mutaciones en los sitios de hibridación de los cebadores. Debido a que los alelos nulos crean falsos homocigotos pueden alterar los resultados de los análisis genéticos (Chapuis y Estoup, 2007; Carlsson, 2008).

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*) son un tipo de marcadores en los que la variación se debe al cambio de una base por otra en un lugar específico del genoma. Aunque en teoría para cada SNP podrían existir cuatro alelos, suelen ser bialélicos por la baja frecuencia de sustituciones nucleotídicas y la existencia de sesgo en las mutaciones (Vignal y col., 2002). Son marcadores codominantes que se encuentran tanto en regiones codificantes como no codificantes y la característica más relevante es su abundancia en los genomas (ej.  $10^6$  SNPs en el genoma humano según las estadísticas de la base de datos dbSNP). Para el

descubrimiento de SNPs existen diferentes estrategias que incluyen la secuenciación directa de productos de PCR de diferentes individuos, búsqueda *in silico*, y comparación de secuencias de fragmentos clonados obtenidos de proyectos de secuenciación de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), clones BACs (*Bacterial Artificial Chromosomes*) solapantes de proyectos genómicos de secuenciación o genotecas plasmídicas con una representación reducida del genoma (Vignal y col., 2002). También existe una amplia variedad de métodos de genotipado basados en la espectrometría de masas, la pirosecuenciación, la PCR en tiempo real o la tecnología de micromatrices (Vignal y col., 2002; Liu y Cordes, 2004; Sobrino y col., 2005). Por otra parte, las nuevas técnicas de secuenciación de alto rendimiento permiten realizar el descubrimiento y genotipado en un solo paso (Davey y col., 2011). Al ser marcadores bialélicos, el contenido en información de los SNPs es bajo y, aunque esta limitación se supera aumentando el número de SNPs examinados, tienen el inconveniente de que el análisis de SNPs a media-gran escala requiere un equipamiento caro y avanzado fuera del alcance de laboratorios con limitados presupuestos.

La elección del tipo de marcador molecular depende de los objetivos perseguidos, de la información genómica existente para la especie de interés y de los medios económicos y técnicos disponibles. En la tabla 1.I se indican los tipos de marcadores moleculares descritos anteriormente con sus propiedades básicas y principales aplicaciones. En organismos marinos, la tendencia en la utilización de marcadores moleculares indica que el uso de alozimas, RFLPs y RAPDs está en declive, el ADNmt se mantiene y los AFLPs, microsatélites y SNPs están en fase de expansión.

Tabla 1.I. Tipos de marcadores moleculares, características generales y principales aplicaciones.

Marcador	Requiere información de secuencia	Modo de herencia	Loci investigados	Nº probable de alelos	Polimorfismo (abundancia)	Aplicaciones
Alozimas	No	Mendeliana, codominante	1	2-6	Bajo	Estudios poblacionales
RFLPs	Si	Mendeliana, codominante	1	2	Bajo	Diferenciación de especies Estudios poblacionales
RAPDs	No	Mendeliana, dominante	Múltiples	2	Intermedio	Estudios poblacionales Mapas genéticos
AFLPs	No	Mendeliana, dominante	Múltiples	2	Alto	Estudios poblacionales Mapas genéticos
ADNmt	No*	Materna/DUI		Múltiples haplotipos		Estudios poblacionales
Microsatélites	Si	Mendeliana, codominante	1	Múltiples	Alto	Estudios poblacionales Mapas genéticos Pruebas de paternidad
SNPs	Si	Mendeliana, codominante	1	2	Muy alto	Estudios poblacionales Mapas genéticos Pruebas de paternidad

\*Uso de cebadores universales o de especies próximas.

### 1.5. Estudios genéticos en *V. pullastra*

A pesar de la importancia económica de *V. pullastra* los estudios genéticos en esta almeja son muy escasos y resultan insuficientes para asesorar la gestión de las poblaciones naturales y cultivadas. La mayor parte de los estudios se han centrado en la diferenciación molecular de *V. pullastra* de otras almejas comerciales, *V. rhomboides*, *R. decussatus* y *R. philippinarum*, mediante PCR-RFLPs del gen mitocondrial 16S (Fernández y col., 2002a), región transcrita interna (ITS: *Internal Transcribed Spacer*) del ADN ribosómico nuclear (Fernández y col., 2001) y gen de la  $\alpha$ -actina (Fernández y col., 2000), y análisis de polimorfismos de conformación de cadena simple (SSCPs: *Single Strand Conformation Polymorphisms*) del gen de la  $\alpha$ -actina (Fernández y col., 2002b). Por otra parte, se ha descrito el número cromosómico de la especie ( $2n=38$ ) y su cariotipo (Insua y Thiriot-Quévieux, 1992) y se ha incluido en análisis filogenéticos de la familia Veneridae basados en el gen mitocondrial 16S (Canapa y col., 2003). A nivel poblacional sólo Joaquim y col. (2010) evaluaron la diversidad genética y estructura de población de dos localidades portuguesas mediante marcadores RAPDs.





## 2. Objetivos



Dada la importancia comercial de *V. pullastra* y la escasez de estudios genéticos poblacionales en esta especie, el objetivo general de este trabajo es aportar herramientas moleculares para la caracterización y evaluación genética del recurso y proporcionar datos genéticos que contribuyan a mejorar su gestión y conservación y también a incrementar su producción. Por tratarse de una especie que se explota directamente del medio natural pero también a través de prácticas de cultivo, este trabajo contempla el análisis tanto de bancos naturales como de reproductores y semilla para estudiar el impacto genético del proceso de obtención de semilla en criadero.

Los objetivos específicos comprenden:

1. Desarrollar marcadores moleculares nucleares tipo microsatélite, incluyendo PCR *multiplex* para su análisis, y marcadores mitocondriales.
2. Estimar la diversidad genética en localidades atlánticas de la Península Ibérica, especialmente las del noroeste español, mediante marcadores microsatélite y mitocondriales.
3. Evaluar la diferenciación genética en el área geográfica indicada mediante ambos tipos de marcadores.
4. Evaluar los cambios genéticos que pueden producirse en el proceso de obtención de semilla en criadero, apoyándose en análisis de paternidades.



## 3. Material y Métodos



### 3.1. Material de estudio

Los individuos empleados en este estudio se recogieron entre 2007 y 2010 en bancos naturales de cinco localidades de la costa gallega (O Barqueiro, 2008; Barallobre, 2008; Camariñas, 2007; O Grove, 2008; Cangas, 2008) y una de la costa portuguesa (Faro, 2010). La figura 3.1 muestra la situación geográfica de las localidades muestreadas. También se analizó esperma y semilla procedente del Centro de Cultivos Mariños de Ribadeo. La semilla se obtuvo por desove masivo de un lote de reproductores recogido en la localidad de Barallobre en 2012 y fue separada en grupos de tamaño (grande:  $\geq 4,5$  mm; mediana: 2,5-4,5 mm; pequeña  $\leq 2,5$  mm).



Figura 3.1. Situación geográfica de las seis localidades muestreadas. Bq: O Barqueiro; Ba: Barallobre; Cm: Camariñas; Gr: O Grove; Ca: Cangas y Fa: Faro.

Una vez en el laboratorio, los ejemplares del medio natural y los reproductores utilizados en el criadero se sexaron mediante observación al microscopio del tejido gonadal y se diseccionaron guardando de cada uno el músculo aductor, el pie y la masa visceral (sin glándula digestiva) en etanol 96% para su conservación. La semilla se guardó igualmente en etanol 96% de forma individualizada con las valvas abiertas. Para recoger el esperma, las almejas se mantuvieron desovando durante media hora en un recipiente con agua de mar. Se centrifugó el agua con esperma 10 min a 20000 rpm, se eliminó el sobrenadante y el concentrado se resuspendió en formidato amónico al 3%. Tras una centrifugación de 3 min a 40000 rpm el concentrado de esperma se guardó en etanol al 96% hasta su utilización.

### 3.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de muestras frescas o conservadas en etanol siguiendo una de las tres metodologías que se describen a continuación dependiendo del tipo de muestra o del uso asignado al ADN extraído.

El ADN utilizado para la construcción de genotecas se extrajo según Fernández-Tajes y Méndez (2007) por proporcionar mayor cantidad de ADN purificado. Se introdujo un fragmento de ~20 mg de músculo aductor en un tubo eppendorf con 400 µl de tampón de lisis (Tris 1 M, EDTA 0,2 M, N-Laurylsarcosin 2,5%) y se homogenizó por fragmentación. Se añadieron 5 µl de proteinasa K (200 mg/ml) y se incubó a 60°C durante una noche. Al día siguiente se añadieron 4 µl de RNasa libre de DNasa (2 mg/ml) para eliminar el ARN y se incubó durante 1 h a 37°C. Transcurrido este tiempo se añadieron 150 µl de tampón de precipitación (acetato amónico 3 M pH 6,0) y se incubó en hielo durante 10 min. La muestra se centrifugó a 15000 rpm durante 10 min, recogiendo el sobrenadante. La precipitación del ADN se realizó añadiendo 400 µl de isopropanol. Se llevó a cabo una nueva centrifugación a 15000 rpm durante 3 min, y se eliminó el sobrenadante por decantación. El ADN se lavó con 1 ml de etanol al 70%. El etanol se eliminó, los tubos se dejaron secar al aire y el ADN se resuspendió en 30 µl de 1xTE (Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8). La cuantificación del ADN extraído se llevó a cabo por comparación con un marcador de concentración conocida en un gel de agarosa al 1% en 1xTAE (Tris-acetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM). Como tampón de carga se empleó una solución de azul de bromofenol al 0,25%, azul de xianol al 0,25% y glicerol al 30% en 1xTAE. El gel se tiñó con bromuro de etidio 0,5 µg/ml en 1xTAE durante 30 min, y se visualizó y fotografió con el sistema de captación de imagen Gel Doc<sup>TM</sup> XR (BioRad).

En los análisis que requerían un número elevado de individuos se utilizó tanto el método de Fernández-Tajes y Méndez (2007) como un método de extracción de ADN rápido y sencillo basado en el desarrollado por Walsh y col. (1991) que emplea la resina CHELEX 100<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich). Se introdujo un fragmento de pie (~1 mm<sup>3</sup>) en un eppendorf con 100 µl de CHELEX 100<sup>TM</sup> al 10% (g/ml) en H<sub>2</sub>O milliQ estéril y se incubó a 100°C durante 20 min. Tras la incubación, los tubos se centrifugaron 2 min a 13000 rpm y se recogió el sobrenadante transfiriéndolo a otro tubo. La cuantificación



del ADN extraído se realizó en un espectrofotómetro nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.).

En el caso del espermatozoides, al tratarse de células individuales, también se utilizó un método de extracción sencillo basado en Taxis y col. (2005). Se resuspendió por agitación  $\sim 8 \text{ mm}^3$  de concentrado de espermatozoides en 200  $\mu\text{l}$  de agua milliQ. Se llevó a ebullición durante 20 min y, después de centrifugar 3 min a 13000 rpm, se recogió y guardó el sobrenadante.

### **3.3. Desarrollo de marcadores microsatélite**

Los marcadores microsatélite se desarrollaron a partir de genotecas enriquecidas en secuencias microsatélite.

#### **3.3.1. Construcción de genotecas enriquecidas**

Se construyeron tres genotecas enriquecidas para los motivos ATC, ACC y CTGT. La elección de dichos motivos se basó en análisis de hibridación *dot-blot* realizados previamente en el laboratorio en los que resultaron los más abundantes.

El protocolo seguido fue el descrito por Billote y col. (1999) con algunas modificaciones. El ADN genómico se digirió con la enzima de restricción *RsaI* (Roche Applied Science) para obtener fragmentos de tamaño comprendido entre 400 y 1500 pb. La mezcla de digestión consistió en 2  $\mu\text{g}$  de ADN genómico, 0,5  $\mu\text{l}$  de seroalbúmina bovina (BSA) 100X, 2  $\mu\text{l}$  de enzima *RsaI* (10 U/ $\mu\text{l}$ ), 5  $\mu\text{l}$  del tampón recomendado por el fabricante y agua milliQ hasta completar un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . Las reacciones se dejaron durante una noche a 37°C, transcurrida la cual se añadieron otros 2  $\mu\text{l}$  de enzima y 0,5  $\mu\text{l}$  de BSA, prolongándose la incubación 3 h más. La reacción se detuvo al meter los tubos en hielo y se verificó la digestión sometiendo una alícuota a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en 1xTAE.

Al producto digerido se ligaron los adaptadores de Edwards y col. (1996), RSA21-5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3' y RSA25- 5'pTAGTCCACGCGTAAG CAAGAGACA-3'. La reacción de ligación se realizó con 1  $\mu\text{g}$  del ADN digerido, 1  $\mu\text{l}$  de cada adaptador (2  $\mu\text{M}$ ), 1,4  $\mu\text{l}$  de ADN ligasa T4 (Promega, 3 U/ $\mu\text{l}$ ), 100  $\mu\text{l}$  del tampón suministrado con la enzima y agua miliQ estéril hasta completar un volumen de

200  $\mu$ l. La mezcla se incubó toda la noche a 4°C y se realizó una PCR para amplificar el número de copias obtenidas y también para comprobar que la ligación transcurrió correctamente. La reacción se realizó con 5 ng de ADN ligado, tampón de la polimerasa 1x (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM pH 8,3), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTPs 0,25 mM cada uno, adaptador RSA21 1  $\mu$ M y 0,625 U de *Taq* polimerasa (Roche Applied Science) en un volumen final de 25  $\mu$ l. El programa de PCR empleado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 1 min; 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 40 s, hibridación de los cebadores a 60°C durante 1 min, y extensión a 72°C durante 2 min; y una extensión final a 72°C durante 5 min. La amplificación se verificó en un gel de agarosa al 2% en 1xTAE.

Para seleccionar fragmentos con motivos microsatélite se llevaron a cabo tres hibridaciones independientes empleando como sonda oligonucleótidos marcados con biotina: [ATC]<sub>10</sub>, [ACC]<sub>10</sub> o [CTGT]<sub>6</sub>. La hibridación se realizó con 100  $\mu$ l de producto de PCR llevados a 500  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O milliQ estéril y sometidos a 95°C durante 15 min. Tras la desnaturalización se añadieron 3  $\mu$ l de la sonda (20  $\mu$ M), junto con 13  $\mu$ l de 20xSSC (NaCl 0,3 M, citrato sódico 0,03 M) y 5  $\mu$ l de SDS (sodio dodecilsulfato) 10% y se mantuvo la mezcla 20 min a temperatura ambiente.

Las secuencias que hibridaron en el paso anterior se capturaron con partículas magnéticas cubiertas de estreptavidina (*Streptavidin MagneSphere<sup>®</sup> Paramagnetic Particles*; Promega). La estreptavidina se une de forma específica a la biotina de la sonda; por otro lado, las propiedades magnéticas de estas partículas hacen que puedan aislarse con un imán, permitiendo así su recuperación junto con el fragmento que contiene la repetición de interés.

Se colocó un vial de partículas magnéticas (0,6 ml) en una gradilla imantada y se eliminó el sobrenadante comercial. Las partículas se lavaron tres veces con 300  $\mu$ l de 0,5xSSC + SDS 0,1% y se resuspendieron en 100  $\mu$ l de la misma solución. A continuación, se añadió el producto de la hibridación, se mezcló bien y se dejó 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, el vial se dejó de nuevo en el soporte imantado para eliminar el sobrenadante. Se lavaron las partículas cuatro veces con 300  $\mu$ l de 0,1xSSC + SDS 0,1% y, para permitir que los fragmentos se separasen de las partículas, se añadieron en dos pasos 100  $\mu$ l y 150  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milliQ, recuperándose el sobrenadante en ambos casos.

Con el fin de generar ADN de doble cadena y aumentar la cantidad de ADN hibridado en cada caso, se realizó una PCR con 2  $\mu$ l de sobrenadante del paso anterior en las condiciones descritas anteriormente excepto el número de ciclos que se redujo a 20.

El producto de PCR obtenido en cada una de las tres amplificaciones se clonó en el vector plásmidico pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO<sup>®</sup> del kit de clonación *TOPO TA* (Invitrogen). Para ello, se añadieron 1  $\mu$ l de solución salina (NaCl 1,2 M, MgCl<sub>2</sub> 0,06 M) y 1  $\mu$ l de vector pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO<sup>®</sup> a 4  $\mu$ l del producto de amplificación y se incubó la mezcla 30 min a temperatura ambiente. A continuación se añadieron 2  $\mu$ l de la mezcla a 50  $\mu$ l de células competentes TOP10F' (Invitrogen) y se incubó en hielo 10 min. La transformación tuvo lugar por choque térmico, manteniendo las células a una temperatura de 42°C durante 30 s e inmediatamente después en hielo. Se añadieron 250  $\mu$ l de medio SOC (bactotripton 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM), dejando crecer las células en posición horizontal con agitación suave durante 1 h a 37°C. Transcurrida esta hora se añadieron 650  $\mu$ l de medio SOC y las células se sembraron en placas Petri con medio 2xYT (bactotripton 1,6%, extracto de levadura 1% y NaCl 0,5%) y ampicilina 100  $\mu$ g/ml e impregnado con 100  $\mu$ l de IPTG (isopropil  $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) 100 mM y 20  $\mu$ l de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-galactósido) 50 mg/ml, incubándose a 37°C 24 h. El IPTG y el X-Gal permiten la selección de las colonias recombinantes; las bacterias que tienen plásmido con inserto forman colonias blancas, mientras que las que llevan plásmido sin inserto forman colonias azules.

### **3.3.2. Rastreo de secuencias microsatélite en las genotecas**

El rastreo de secuencias microsatélite en las genotecas se realizó por secuenciación, incluyendo en las genotecas ATC y ACC un paso previo de transferencia a membrana e hibridación (*Southern-blot*).

#### **3.3.2.1. Transferencia a membrana e hibridación**

Las colonias se sembraron en placas Petri con medio LB (bactotripton 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1%) y ampicilina 100  $\mu$ g/ml, y se dejaron crecer 24 h a 37°C. Al día siguiente se enfriaron en nevera al menos 30 min. Se colocó sobre la placa una membrana de nylon cargada positivamente (GE HealthCare Life Sciences),

dejándola durante 1 min. Se retiró la membrana y, con la cara de contacto con la placa hacia arriba, se dejó durante 15 min sobre papel Whatman saturado con solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) y luego 15 y 10 min en papel Whatman saturado con solución de neutralización (Tris 1 M, NaCl 1,5 M pH 8) y 2xSSC, respectivamente. La fijación del ADN a la membrana se realizó por irradiación con luz ultravioleta ( $4000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ ) durante 5 min. La membrana se incubó durante 1 h a  $50^\circ\text{C}$  en una solución de 2xSSC + SDS 0,1% con proteinasa K 0,1 mg/ml. Tras la incubación se lavó dos veces con 2xSSC + SDS 0,1% a  $50^\circ\text{C}$  durante 15 min y se colocó entre papel de filtro humedecido con agua destilada estéril, presionando para eliminar restos celulares.

A continuación, la membrana se incubó con solución de prehibridación [5xSSC, SDS 0,02%, LSS (N-Lauril sarcosine sal sódica) 0,01%, reactivo bloqueante 0,3% (Roche Applied Science)] a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 min, transcurridos los cuales, se añadió la sonda (10 pmol) marcada con digoxigenina y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 h. Tras la hibridación, se procedió a los lavados post-hibridación. La membrana se lavó dos veces en 2xSSC + SDS 0,1% a temperatura ambiente durante 5 min y dos veces en 0,5xSSC + SDS 0,1% a  $30^\circ\text{C}$  durante 15 min. Después en tampón de lavado [*tween* 20 al 0,3% en tampón 1 (ácido maleico 0,1 M, NaCl 0,15 M pH 7,5)] 5 min y se incubó en tampón 2 (tampón 1 + reactivo bloqueante 1%) durante 30 min.

La sonda hibridada se detectó por quimioluminiscencia. Primero se realizó una incubación de 30 min en una solución del anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (75 mU/ml) (Roche Applied Science) en tampón 2 y se lavó dos veces en tampón de lavado para eliminar el exceso de anticuerpo. Se equilibró la membrana 5 min en tampón 3 (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M,  $\text{MgCl}_2$  50 mM) y se incubó 5 min en una solución 1:100 de sustrato quimioluminiscente CSPD (Roche Applied Science) en tampón 3. A continuación se introdujo en una bolsa de hibridación y se mantuvo a  $37^\circ\text{C}$  15 min en oscuridad, incrementado con ello la reacción de quimioluminiscencia. La película *Medical X-Ray Film* (Fujifilm) se expuso con la membrana a temperatura ambiente durante 15 min, y se reveló en oscuridad introduciéndola en Revelador G 150 (Agfa) durante 5 min, 5 min en  $\text{H}_2\text{O}$  y 5 min en Fijador G 354 (Agfa).

Los clones positivos en la hibridación se cultivaron en 1 ml de medio líquido LB con ampicilina 100 µg/ml y se dejaron crecer a 37°C con agitación durante 24 h para obtener ADN plasmídico. La extracción del ADN se realizó con el kit QUIAprep® Spin Miniprep Kit (Quiagen) basado en una lisis alcalina. Tras cuantificar el ADN en un gel de agarosa por comparación con un marcador de concentración conocida, se secuenció el inserto en la Unidad de Biología Molecular de los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña que dispone de un secuenciador automático ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems).

### ***3.3.2.2. Rastreo por secuenciación directa***

Se amplificó por PCR el inserto de los clones utilizando directamente colonias bacterianas recombinantes recogidas por contacto con una punta de micropipeta y resuspendidas en 25 µl de H<sub>2</sub>O milliQ estéril. La mezcla de la reacción consistió en 5 µl de la suspensión de células, dNTPs 0,2 mM cada uno, cebadores M13 0,6 µM cada uno, 0,3 U de *Taq* polimerasa (Roche Applied Science) y el tampón recomendado para la enzima 1x en un volumen final de 12,5 µl. El programa de amplificación consistió en 94°C 10 min; 30 ciclos de 94°C 1 min, 55°C 1 min y 72°C 1 min; y 72°C 10 min. El producto de la amplificación se visualizó y cuantificó en un gel de agarosa al 2% en 1xTAE y luego se secuenció en el SAI.

### **3.3.3. Selección de secuencias microsatélite**

Las secuencias obtenidas de los clones se editaron con el programa BioEdit v.7.0.5.3. (Hall, 1999), eliminándose la secuencia del plásmido y la de los adaptadores. Después, con el mismo programa se realizó un análisis blast-local en el que se comparó cada secuencia con el resto para identificar y descartar las secuencias idénticas o semejantes.

Se empleó el programa Tandem Repeats Finder (Benson, 1999) para identificar las secuencias microsatélite. Una secuencia se consideró microsatélite cuando reunía las siguientes características: i) presencia de dos (tetra-), tres (tri-) o cuatro (dinucleótidos) repeticiones consecutivas y (ii) repeticiones sin un número importante de interrupciones. Para cada genoteca, se calculó el porcentaje de éxito medido como el número de secuencias con microsatélite x 100/número de secuencias únicas. Una vez

identificadas las secuencias microsatélite, se diseñaron cebadores complementarios a las regiones flanqueantes con el programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky, 2000).

#### **3.3.4. PCR *monolocus* de *loci* microsatélite**

Los cebadores diseñados se emplearon inicialmente para amplificar cada *locus* microsatélite por separado en 15-24 individuos. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 12,5 µl, con 0,4 ng de ADN genómico, 0,3 U de *Taq* polimerasa, tampón de la polimerasa 1x, dNTPs 0,2 mM cada uno, 0,24 µM de cada cebador y concentraciones finales de MgCl<sub>2</sub> de 1,5-3,0 mM según la pareja de cebadores empleados (ver resultados). El programa de PCR consistió en 95°C 5 min; 34 ciclos de 94°C 30 s, 50-60°C 30 s y 72°C 30 s; y 72°C 10 min. Las amplificaciones se optimizaron en un termociclador MyCycler de BioRad, que cuenta con la opción de gradiente de temperatura. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 3% en 0,5xTBE (Tris-Borato 45 mM, EDTA 1 mM).

Para los *loci* que resultaron polimórficos, uno de los cebadores se marcó en el extremo 5' con un fluoróforo (6-FAM o HEX) y se repitió la amplificación en un total de 48 individuos de dos localidades diferentes. Los productos de PCR obtenidos se separaron en un secuenciador automático y se analizaron con el programa GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems) para corroborar el polimorfismo de los *loci* y descartar los que generasen patrones de amplificación complejos.

### **3.4. Diseño y optimización de PCRs *multiplex***

Los *loci* polimórficos con patrones de amplificación interpretables se utilizaron para el diseño de PCRs *multiplex* con el programa Multiplex Manager (Holleley y Geerts, 2009). Este programa utiliza la heterocigosidad esperada, el número y rango de tamaño de los alelos y la temperatura de hibridación y secuencias de los cebadores de cada *locus* para diseñar combinaciones de *loci* que minimizan el número de reacciones, maximizan el espacio entre marcadores que lleven el mismo fluoróforo y minimizan la diferencia en las temperaturas de hibridación de los marcadores dentro de una misma reacción. A los *loci* que presentan alelos de tamaño solapante, el programa les asigna fluoróforos diferentes (6-FAM, VIC, NED o PET). El programa se ejecutó con 21 marcadores, señalando los *loci* que debían de estar marcados con 6-FAM, un número

máximo de 10 *loci* por reacción y una distancia mínima de 50 pb entre *loci* con el mismo fluoróforo. Las combinaciones propuestas por el programa se modificaron manualmente con el fin de minimizar el número de reacciones.

Las PCRs *multiplex* diseñadas se probaron para testar la amplificación de los *loci* incluidos, comparándose el patrón de picos obtenido para cada *locus* en las *multiplex* con el obtenido en la PCR *monocus*. En el proceso de optimización se modificó la concentración inicial de los cebadores (0,2  $\mu$ M) hasta conseguir un patrón de amplificación homogéneo, de modo que todos los marcadores presentasen una señal de intensidad similar.

Las reacciones de las PCRs *multiplex* se realizaron en un volumen de 12,5  $\mu$ l, con 0,4 ng de ADN, 1x *Qiagen Multiplex PCR Master Mix (HotStarTaq*<sup>®</sup>, tampón, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, y mezcla de dNTPs) y la mezcla de cebadores correspondiente (ver resultados). El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min; 35 ciclos de 94°C 30 s, 57°C 90 s, y 72°C 90 s; y extensión final de 10 min a 72°C. El producto de la amplificación se separó inicialmente en geles de agarosa al 2% en 1xTAE y después en un secuenciador automático.

El genotipado de las muestras se realizó con el programa GeneMapper v.3.7, creándose una plantilla (Bin) en la que estaban representados todos los *loci* incluidos en la *multiplex* y los alelos identificados en una muestra de 30 individuos. Los genotipos asignados por el programa se revisaron y editaron manualmente para considerar los alelos no incluidos en la plantilla y rectificar errores en la identificación de los picos. Los datos se exportaron a un archivo Excel y usando Microsatellite Toolkit (Park, 2001) se generó el archivo con el formato adecuado para los análisis estadísticos.

### **3.5. Análisis poblacional de marcadores microsatélite**

Los datos de marcadores microsatélite se analizaron empleando diferentes programas informáticos. En los casos en que se realizaron tests múltiples, los valores de significación se ajustaron mediante la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

### 3.5.1. Diversidad genética

A partir de los genotipos identificados en cada muestra y empleando el programa Genetix v.4.03 (Belkhir y col., 2004) se calculó para cada *locus* el número de alelos, la heterocigosidad observada y la heterocigosidad esperada según Nei (1978):

$$H_e = \frac{2n(1 - \sum x_i^2)}{2n - 1}$$

Donde  $x_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  en un *locus* y  $n$  el tamaño de la muestra.

Igualmente, se calculó el alelo más frecuente en cada *locus* y el valor promedio de los parámetros anteriores tanto globales como por *locus* y muestra.

Dado que el número de alelos observados depende del tamaño muestral, se calculó también la riqueza alélica, una medida del número de alelos por *locus* independiente del tamaño muestral, para realizar comparaciones entre muestras de distinto tamaño. La riqueza alélica se determinó con el programa F-Stat v.2.9.3 (Goudet, 2001) aplicando el método de El Mousadik y Petit (1996) que estima el número de alelos esperado en una submuestra de  $2n$  genes, cuando se han muestreado  $2N$  genes ( $N \geq n$ ); el valor de  $n$  viene determinado por el número más bajo de individuos genotipados por *locus* en una muestra.

Los valores de riqueza alélica y heterocigosidades observadas y esperadas de diferentes muestras se compararon mediante un test de Friedman implementado en el paquete estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc). En los casos en los que el test de Friedman fue significativo se realizó un análisis *post-hoc* mediante el procedimiento de Wilcoxon-Nemenyi-McDonald-Thompson (Hollander y Wolfe, 1999) implementado en una función de R (Galili, 2010). Dos grupos se consideraron significativamente distintos cuando el valor absoluto de su diferencia de rangos fue igual o mayor que un valor  $r_\alpha$  tabulado.

### 3.5.2. Equilibrio Hardy-Weinberg y desequilibrio de ligamiento

La bondad de ajuste de las proporciones genotípicas al equilibrio Hardy-Weinberg se probó mediante un test exacto (Guo y Thompson, 1992) implementado en el programa Genepop v.4.0. (Rousset, 2007). El nivel de significación se determinó con



un método de cadenas de Markov empleando 10000 iteraciones, 100 tandas y 5000 repeticiones por tanda.

El sentido y la magnitud de las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg se evaluaron con el parámetro  $f$  de Weir y Cockerham (1984) empleando Genetix v.4.0.3. El cual, para un *locus* con dos alelos se estima según:

$$\hat{f} = 1 - \frac{c}{b+c}$$

Donde  $c$  es la varianza de las frecuencias alélicas entre gametos dentro de los individuos y  $b$  es la varianza de las frecuencias alélicas entre individuos dentro de las muestras.

El parámetro  $f$  equivale al  $F_{IS}$  de Wright (1951) definido en términos de correlación entre gametos pero también a menudo en términos de desviación de la heterocigosidad esperada (Nei, 1977). Valores positivos de  $F_{IS}$  indican un déficit de genotipos heterocigotos y valores negativos un exceso.

En este estudio se optó por el estimador descrito debido a que no hace asunciones sobre el número de poblaciones, tamaño de muestra o frecuencia de heterocigotos, por lo que resulta útil para colecciones pequeñas de datos y comparación de resultados de diferentes trabajos (Weir y Cockerham, 1984).

Para conocer las causas que alteran el equilibrio Hardy-Weinberg, se evaluó la desviación de neutralidad de los *loci* microsatélite con el test de homocigosidad de Ewens-Watterson (Watterson, 1978) y el test exacto de Ewens-Watterson-Slatkin (Slatkin, 1994; 1996), basados ambos en Ewens (1972). El test de homocigosidad de Ewens-Watterson emplea un estadístico  $F$  que resulta de la suma de los cuadrados de las frecuencias alélicas, equivalente a la homocigosidad muestral en diploides. El valor de  $F$  observado se compara con el  $F$  esperado según neutralidad. En el test exacto de Ewens-Watterson-Slatkin la probabilidad de la muestra observada es comparada con una muestra neutral creada al azar con el mismo tamaño y número de alelos; la probabilidad se obtiene como la proporción de muestras creadas aleatoriamente (10000) que son igual o menos probables que la muestra observada. Ambos test se realizaron con el programa Arlequin 3.11 (Excoffier y col., 2005).

También se analizó la presencia de alelos nulos con Micro-Checker (Van Oosterhout y col., 2004). Este programa indica la existencia de alelos nulos cuando existe un exceso significativo de homocigotos distribuido equitativamente en todas las clases de homocigotos. La frecuencia de alelos nulos se calculó según Brookfield 1 (1996).

La existencia de desequilibrio de ligamiento se testó mediante el test exacto de Guo y Thompson (1992) del programa Genepop v.4.0. (Rousset, 2007). El nivel de significación se determinó con un método de cadenas de Markov empleando los parámetros descritos anteriormente.

### 3.5.3. Diferenciación poblacional

El grado de diferenciación poblacional se evaluó utilizando varios métodos. Se estimó el parámetro  $\theta$  de Weir y Cockerham (1984) empleando Genetix v.4.03, según la ecuación que contempla  $u$  alelos y  $l$  loci:

$$\theta = \frac{\sum_l \sum_u A_{lu}}{\sum_l \sum_u T_{lu}}$$

Donde  $A$  es la varianza de las frecuencias alélicas entre las muestras y  $T$  la varianza total.

El cálculo se realizó considerando cada *locus* por separado y todos los *loci*, entre pares de localidades y en el global de las localidades, determinándose el nivel de significación por un método no paramétrico (10000 permutaciones).

El parámetro  $\theta$  corresponde al  $F_{ST}$  de Wright (1951) y puede ser interpretado de diferentes maneras dependiendo de los términos en que se defina. Según Weir y Cockerham (1984) representa la proporción de la varianza total de las frecuencias alélicas debida a la varianza de las frecuencias alélicas entre poblaciones. Cuando se define en términos de heterocigosidades esperadas se interpreta como la proporción de la heterocigosidad total debida a diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones (Halliburton, 2004). Teóricamente,  $F_{ST}$  tiene un valor mínimo de cero (indicando ausencia de divergencia genética) y un máximo de uno (fijación de alelos alternativos en diferentes localidades) pero el máximo observado generalmente es mucho menor que uno (Hartl y Clark, 2007), por causa del polimorfismo de los

marcadores empleados. De acuerdo con Wright (1978) los valores de  $F_{ST}$  en los rangos de 0-0,05, 0,05-0,15, 0,15-0,25 y valores  $>0,25$  indican baja, moderada, alta y muy alta diferenciación genética, respectivamente.

El valor de  $F_{ST}$  es altamente dependiente del nivel de variación genética y dificulta la comparación de datos de marcadores con tasas de mutación diferente (ej. microsatélites vs alozimas) (Hedrick, 1999). Por ello se calculó una medida estandarizada de  $F_{ST}$  ( $F'_{ST}$ ), cuyo rango va de 0 a 1 para todos los *loci*, de forma análoga a Hedrick (2005). Esta medida se obtiene al dividir el valor de  $F_{ST}$  observado por el valor máximo que podría alcanzar el estadístico  $F_{ST}$  con el nivel de variación observado, lo que se calcula considerando que cada una de las localidades contiene alelos únicos.

Por otra parte, se evaluó la heterogeneidad de las distribuciones génicas entre muestras por medio del test exacto de Guo y Thompson (1992) en el programa Genepop v.4.0. Las distribuciones génicas se calcularon por *locus* y pares de muestras. El nivel de significación se determinó con un método de cadenas de Markov empleando 10000 iteraciones, 100 tandas y 5000 repeticiones por tanda.

La estructura poblacional se evaluó también con el programa Structure v.2.3.1. (Pritchard y col., 2000). Este programa trata de determinar el número de grupos genéticamente homogéneos ( $K$ ) utilizando distintos modelos de ascendencia y frecuencias alélicas. El programa asume la existencia de  $K$  poblaciones, donde cada una de ellas está caracterizada por presentar unas frecuencias alélicas determinadas en cada *locus*. Los individuos muestreados son asignados, por probabilidad, a una población o conjuntamente a dos o más poblaciones en el caso de que sus genotipos indiquen que están mezclados. Para estimar los valores de los parámetros el programa utiliza cadenas de Markov Monte Carlo. Las simulaciones se llevaron a cabo según el modelo mixto (los individuos pueden tener ascendencia mixta), recomendado como punto de partida por los autores. En cuanto al modelo de frecuencias alélicas, se empleó el de frecuencias alélicas independientes a lo largo de las poblaciones, este modelo es el recomendado cuando se espera que las frecuencias alélicas en las diferentes poblaciones sean razonablemente diferentes unas de otras. El número de pasos de la cadena de Markov Monte Carlo fue de 1000000, descartándose las 500000 iniciales. Se corrieron 10 simulaciones para cada valor  $K$  estudiado, realizándose el análisis desde  $K=1$  hasta  $K=6$  por ser el número de localidades estudiadas. La  $K$  más probable se determinó según dos

métodos, Pritchard y col. (2000) y Evanno y col. (2005). Se empleó el programa Structure Harvester (Earl y vonHoldt, 2012) para procesar los resultados.

Igualmente, se evaluó el flujo génico entre localidades estimando el número de migrantes por generación ( $N_m$ ) entre pares de localidades con el programa GenAEx (Peakall y Smouse, 2006) según:

$$N_m = \frac{\left(\frac{1}{F_{ST}}\right) - 1}{4}$$

Por último se estudiaron las relaciones filogenéticas entre muestras mediante un árbol construido a partir de una matriz de distancias empleando el paquete Phylip (Felsenstein, 1993). Se calculó la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) con el programa Gendist según:

$$D^2 = 4 \sum_m \frac{1 - \sum_i p_{1mi}^{1/2} p_{2mi}^{1/2}}{\sum_m (a_m - 1)}$$

Donde  $m$  es el número de *loci*,  $i$  es la suma de alelos del *locus*  $m$ ,  $p_{1mi}$  es la frecuencia del alelo  $i$  en el *locus*  $m$  en la población 1,  $p_{2mi}$  es la frecuencia del alelo  $i$  en el *locus*  $m$  en la población 2 y  $a$  es el número de alelos del *locus*  $m$ .

El árbol se construyó empleando el algoritmo de *Neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987), que parte de un árbol sin enraizar en forma de estrella y combina los pares de muestras con la menor distancia genética. La significación de los nodos se obtuvo por análisis *bootstrap* (Felsenstein, 1985) con el programa Seqboot, empleándose 10000 réplicas.

### 3.6. Amplificación y secuenciación de marcadores mitocondriales

Se amplificó por PCR un fragmento del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S (16S), un fragmento del gen de citocromo b (CitB) y un fragmento del gen que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI). La secuencia de los cebadores empleados se indica en la tabla 3.I.

El fragmento del gen CitB se amplificó inicialmente con los cebadores universales diseñados por Dahlgren y col. (2000). El producto de PCR obtenido se clonó en un vector plasmídico, se secuenció y las secuencias obtenidas se utilizaron para diseñar los cebadores CitBVp, específicos de *V. pullastra*.

Tabla 3.I. Secuencias de los cebadores de genes mitocondriales.

<b>Gen</b>	<b>Cebadores</b>
<b>16S</b> (Palumbi, 1996)	16Sar: 5'CGCCTGTTTATCAAAAACAT3'
	16Sbr: 5'CCGGTCTGAACTCAGATCACGT3'
<b>CitB</b> (Dahlgren y col., 2000)	CytB397F: 5'YWYTRCCTTGGRGGRCARATATC3'
	CytB811R: 5'GCRWAYARAAARTAYCAYTCWGG3'
<b>CitBVp*</b>	CitBF: 5'AGCAACCGTGATTACTAAC 3'
	CitBR: 5'GGTTGGATATGAAGAGGGGT3'
<b>COI</b> (Folmer y col., 1994)	HCO2198: 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3'
	LCO1490: 5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3'

\*Diseñados en este estudio.

En todos los casos, las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 25  $\mu$ l con 0,4 ng de ADN, 0,6 U de *Taq* polimerasa, tampón de la polimerasa 1x, dNTPs 0,2 mM cada uno, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 0,12  $\mu$ M de cada cebador y agua milliQ estéril. Las condiciones de amplificación de cada pareja de cebadores se detallan en la tabla 3.II. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% en 1xTAE.

Tabla 3.II. Condiciones de amplificación para cada pareja de cebadores.

	<b>Nº de ciclos</b>	<b>16S</b>	<b>CitB</b>	<b>CitBVp</b>	<b>COI</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	1	3 min/94°C	5 min/94°C	2 min/95°C	3 min/94°C
<b>Desnaturalización</b>		20 s/94°C	30 s/94°C	45 s/95°C	45 s/94°C
<b>Hibridación</b>	35	20 s/51°C	1 min/50°C	45 s/55°C	45 s/41°C
<b>Extensión</b>		45 s/72°C	30 s/72°C	1 min/72°C	45 s/72°C
<b>Extensión final</b>	1	2 min/72°C	5 min/72°C	10 min/72°C	5 min/72°C

Los productos de PCR contienen restos de cebadores, nucleótidos y otros componentes de la reacción que pueden interferir en el proceso de secuenciación. Por ello, antes de secuenciar los productos de PCR se purificaron con columnas *Microcon-PCR* (Amicon, Merck Millipore) según las instrucciones del fabricante.

Las secuenciación se realizó en el SAI y las secuencias se editaron con el programa BioEdit v.7.0.5.3., eliminando los extremos de las secuencias donde la lectura no era fiable. La identidad de las secuencias se verificó mediante un análisis Blastn (Altschul y col., 1990).

Las secuencias editadas se alinearon con el programa Clustal W (Thompson y col., 1994), implementado en el programa Bioedit. En el caso del COI y del CitB, al tratarse de genes codificantes de proteínas, los alineamientos se realizaron tanto con las secuencias nucleotídicas, respetando la pauta de lectura, como con las secuencias aminoacídicas para calcular las sustituciones sinónimas y no sinónimas. Los análisis se realizaron para cada gen por separado y también combinando la secuencia de los tres genes.

### 3.7. Análisis poblacional de marcadores mitocondriales

#### 3.7.1. Diversidad genética

Los haplotipos se identificaron con el programa DnaSP v5 (Librado y Rozas, 2009) y las frecuencias haplotípicas se calcularon con el programa Arlequín v3.11.

Se estimó la diversidad haplotípica ( $h$ ) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) según Nei (1987) con el programa DnaSP v5. Se entiende por diversidad haplotípica ( $h$ ) la probabilidad de que dos haplotipos escogidos al azar en una muestra sean diferentes.

$$h = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2 \right)$$

Donde  $n$  es el número de individuos analizados,  $m$  es el número de haplotipos y  $x_i$  la frecuencia de cada haplotipo  $i$ .

La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) es el número medio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias.

$$\hat{\pi} = 2 \sum_{i < j} \hat{d}_{ij} / [n(n-1)]$$

Donde  $d_{ij}$  es el número de sustituciones nucleotídicas por sitio entre las secuencias  $i$  y  $j$ , y  $n$  es el número de secuencias de ADN examinadas.

Los valores observados de diversidad genética se compararon mediante un procedimiento de remuestreo implementado en R (R Core Team, 2012). Se utilizó como tamaño muestral el número mínimo de individuos analizados por gen/combinación de los tres genes y 10000 (diversidad haplotípica) y 1000 (diversidad nucleotídica) remuestreos. La comparación se realizó usando los valores medios de diversidad haplotípica y nucleotídica e intervalos de confianza del 95%.

Para analizar si los patrones de diversidad corresponden a los esperados bajo neutralidad, se empleó el test  $F_s$  de Fu (Fu, 1997) implementado en el DnaSP v5. El estadístico  $F_s$  se calcula a partir de la probabilidad ( $S'$ ) de tener una muestra aleatoria con un número de alelos mayor o igual que el observado dado el nivel de diversidad estimado.

$$F_s = \ln\left(\frac{S'}{1 - S'}\right)$$

Un valor negativo de  $F_s$  evidencia un exceso de haplotipos, esperable en una situación de expansión poblacional reciente o arrastre genético. Un valor positivo evidencia un déficit de haplotipos, esperable en una situación de cuello de botella reciente, o sobredominancia. La significación del estadístico se obtuvo por simulación coalescente (1000 réplicas).

También se calculó el estadístico  $R_2$  (Ramos-Onsins y Rozas, 2002) y su intervalo de confianza mediante simulaciones coalescentes con el programa DnaSP v5. Este estadístico se basa en la diferencia entre el número de variantes únicas y el número medio de diferencias entre secuencias. Valores bajos indican un crecimiento poblacional reciente. El estadístico  $R_2$  se define como,

$$R_2 = \frac{\left(\sum_{i=1}^N (U_i - k/2)^2 / n\right)^{1/2}}{S}$$

Donde  $n$  es el tamaño de la muestra,  $S$  es el número total de sitios segregantes,  $k$  el número medio de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias y  $U_i$  el número de mutaciones únicas en una secuencia  $i$ .

### 3.7.2. Diferenciación poblacional

El índice de fijación  $F_{ST}$  global se calculó mediante un análisis AMOVA estándar con el programa Arlequín v3.1. Con el mismo programa se calcularon los valores por pares de localidades, seleccionando en ambos casos la opción de estadísticos  $F$  convencionales. Los valores de significación se obtuvieron mediante un análisis de permutaciones (10000), aplicándose la corrección secuencial de Bonferroni en los casos de comparaciones múltiples (Rice, 1989). La estandarización del  $F_{ST}$  se realizó de forma análoga a la de los microsatélites.

Se construyeron redes de haplotipos con el software Network 4.6.1.0 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>), aplicando el algoritmo *Median-joining* (Bandelt y col., 1999) que establece las redes de haplotipos a partir de todos los árboles filogenéticos posibles más parsimoniosos.

Por otro lado, se analizaron las relaciones filogenéticas de las localidades. Las frecuencias haplotípicas se emplearon para calcular la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) y construir un árbol *Neighbor-joining* con el paquete de programas Phylip (Felsenstein, 1993). La robustez de los árboles se determinó mediante el método de *bootstrap*, realizándose 10000 réplicas. Los árboles se construyeron con las secuencias individuales de cada gen y también con las secuencias combinadas de los tres genes.

## 3.8. Análisis de relaciones genéticas entre individuos

### 3.8.1. Asignación de paternidades

La asignación de paternidades se realizó por el método de máxima verosimilitud implementado en el programa Cervus v3.0.3 (Kalinowski y col., 2007). Este programa analiza datos de marcadores codominantes, asumiendo que son autosómicos, que la especie es diploide y que los *loci* segregan independientemente. En primer lugar, el programa estima las frecuencias alélicas en la población y calcula varios parámetros



para cada *locus*: número de individuos genotipados, número de homocigotos y heterocigotos, número de alelos, heterocigosidad observada y esperada, ajuste al equilibrio Hardy-Weinberg, frecuencia de alelos nulos y el contenido de información del polimorfismo (PIC). El cálculo del PIC para cada *locus* se realiza según Botstein y col. (1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Donde  $p_i$  y  $p_j$  son las frecuencias de los alelos  $i$  y  $j$ , respectivamente, y  $n$  es el número de individuos de la población.

También calcula el potencial de exclusión por *locus* y global que corresponde a la probabilidad de excluir a un falso progenitor de un descendiente dado cuando sólo se conoce el genotipo del descendiente (exclusión 1) o conociendo también el genotipo de uno de los parentales (exclusión 2). El potencial de exclusión 1 para un *locus*  $l$  con  $k$  alelos se calcula según:

$$P_l = a_1 - 4a_2 + 4a_3 - 3a_4 + 2a_5^2$$

Donde  $a_n = \sum_{i=1}^k p_i^n$

El potencial de exclusión 2 para un *locus*  $l$  con  $k$  alelos se calcula según:

$$P_l = a_1 - 2a_2 + a_3 + 3(a_2 a_3 - a_5) - 2(a_2^2 - a_4)$$

La probabilidad media global de exclusión para  $n$  *loci* no ligados se calcula según:

$$P = 1 - \prod_{l=1}^n (1 - p_l)$$

El cálculo de los parámetros señalados sirve para valorar la idoneidad de los *loci* para los análisis posteriores.

En segundo lugar el programa realiza una simulación de análisis de paternidad. Asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg, genera genotipos maternos y paternos a partir

de las frecuencias alélicas observadas en la población de estudio y genotipos de descendientes mediante un muestreo mendeliano de los alelos parentales. También genera aleatoriamente genotipos de progenitores no relacionados. La simulación tiene como objetivo estimar por un lado el poder de resolución de los marcadores empleados a partir de las frecuencias alélicas, así como estimar los valores críticos de LOD o Delta, de manera que se pueda evaluar estadísticamente la fiabilidad de la asignación realizada. El valor LOD se obtiene a partir del logaritmo neperiano de la tasa global de verosimilitud de la asignación (verosimilitud de un individuo de ser un progenitor relativa a la que tiene un individuo escogido al azar). Un valor negativo de LOD indica que la pareja candidata tiene menor probabilidad de ser los padres reales que de no serlo. Mientras que un valor de LOD positivo indica que la pareja candidata tiene mayor probabilidad de ser los progenitores verdaderos que de no serlo. El estadístico Delta deriva del LOD y se define como la diferencia entre los valores LOD de la pareja candidata de mayor probabilidad y los de la segunda con mayor probabilidad. El programa permite seleccionar dos niveles de confianza para la asignación de paternidades: estricto (95%) y relajado (80%). Los parámetros definidos en este estudio para la simulación fueron: 10000 réplicas, 139 progenitores (72 padres y 67 madres), 100% de los padres candidatos muestreados y genotipados y 1% de tasa de error de genotipado.

Finalmente, el programa realiza el análisis de paternidades real de la misma forma que el análisis simulado después de indicar los padres candidatos y las madres candidatas y qué individuos son los hijos. El padre/madre/pareja candidato más probable corresponde al de mayor puntuación LOD. La confianza de la asignación del padre/madre/pareja más probable se evalúa en función del valor crítico de LOD o Delta determinado en la simulación.

### **3.8.2. Estimaciones de parentesco**

El coeficiente de parentesco ( $r$ ) se calculó según Queller y Goodnight (1989) con el programa IDENTIX (Belkhir y col., 2002), que calcula los valores de  $r$  para cada par de individuos. El coeficiente de parentesco infiere la relación entre un par de individuos de una muestra a partir de las frecuencias alélicas.

$$r = \frac{\sum_x \sum_k \sum_l (P_y - P^*)}{\sum_x \sum_k \sum_l (P_x - P^*)}$$

Donde  $x$  es el número de individuos,  $k$  el número de *loci* y  $l$  la posición alélica.  $P_x$  es la frecuencia de un alelo en el individuo  $x$ , *locus*  $k$  y la posición alélica  $l$ ,  $P_y$  es la frecuencia del mismo alelo en los individuos con los que se compara  $x$  y  $P^*$  hace referencia a la frecuencia de ese alelo en toda la población excluyendo a todos los posibles parientes de  $x$ .

Los valores de  $r$  entre individuos o grupos de individuos que comparten ambos parentales es 0,5, entre medios hermanos que comparten el 25% de su genoma es 0,25 y entre individuos que no están relacionados es  $\leq 0$  (Queller y Goodnight, 1989).

### 3.9. Análisis de la contribución de los progenitores a la semilla

Para evaluar si la contribución a la semilla de los machos, por un lado, y de las hembras, por otro, fue similar, tanto globalmente como por grupos de tamaño, se realizó un test  $\chi^2$  con la función *chisq.test* del programa R (R Core Team 2012). El P-valor se calculó mediante simulación Monte Carlo (100000 réplicas).

Además, también se evaluó la existencia de contribución desigual de los progenitores a cada uno de los grupos de tamaño. Para ello se utilizó un método de remuestreo descrito en Borrell y col. (2011). Para machos y hembras se generaron de forma pseudoaleatoria 100000 tablas de contingencia (función *r2dtable* del programa R), en las cuales los totales por fila y columna corresponden al número de descendientes observados. La proporción de tablas en las que el valor obtenido, para un progenitor y clase de tamaño, es mayor o igual al observado indica cuan probable es obtener dicho valor bajo la hipótesis nula de que la contribución es igual a los distintos grupos de tamaño.

### 3.10. Tamaño efectivo y tasa de endogamia

Se estimó el tamaño efectivo ( $N_e$ ) del lote de reproductores teniendo en cuenta tres posibilidades: (i) que participasen todos los reproductores utilizados, lo que

indicaría el nivel mínimo de endogamia que se generaría; (ii) considerando solamente los individuos que realmente dejan descendencia; y (iii) considerando la contribución diferencial de los individuos que intervienen.

El cálculo del tamaño efectivo asumiendo el primer y el segundo supuesto se realizó según Falconer (1989):

$$N_e = \frac{4N_m N_h}{N_m + N_h}$$

Donde  $N_m$  y  $N_h$  son el número de machos y de hembras, respectivamente.

Asumiendo el tercer caso, el tamaño efectivo se calculó según Chevassus (1989):

$$N_e = \frac{4(N-2)}{\left(M_h + \frac{V_h}{M_h}\right) + \left(M_m + \frac{V_m}{M_m}\right) - 2}$$

Donde  $N$  es el número de descendientes,  $M_h$  y  $M_m$  son la media de descendientes por hembra o por macho y  $V_h$  y  $V_m$  son la varianza del número de descendientes por hembras y machos, respectivamente. Las medias y las varianzas se calcularon con el paquete estadístico SPSS 16.0.

Se estimó, también, el incremento de la endogamia ( $\Delta F$ ) por generación según Falconer (1989):

$$\Delta F = \frac{1}{2N_e}$$

## 4. Resultados



## 4.1. Desarrollo de marcadores moleculares

### 4.1.1. Microsatélites

Se construyeron tres genotecas enriquecidas en los motivos ATC, ACC y CTGT, conteniendo todas clones con secuencias microsatélite. La tabla 4.I muestra las características de los clones. Cada genoteca comprendió entre 300 y 400 clones y se secuenció un total de 361. De éstos, 285 contenían secuencias únicas (18-24% de redundancia). Se encontraron motivos microsatélite en 153 clones resultando un porcentaje de éxito por genoteca del 90% (ATC), 28% (ACC) y 49% (CTGT). El número de clones con regiones flanqueantes al microsatélite suficientemente largas para el diseño de cebadores fue de 97.

Tabla 4.I. Genotecas construidas y características de los clones.

Clones	Genoteca		
	ATC	ACC	CTGT
<b>Recombinantes</b>	400	363	300
<b>Secuenciados</b>	95	91	175
<b>Con secuencias únicas (redundancia)</b>	72 (24%)	75 (18%)	138 (21%)
<b>Con motivos microsatélite (éxito)</b>	65 (90%)	21 (28%)	67 (49 %)
<b>Válidos para el diseño de cebadores</b>	50	17	30

Los microsatélites aislados en cada una de las genotecas figuran en el anexo I. Las tres genotecas contenían tanto microsatélites con los motivos para los que se hizo el enriquecimiento como microsatélites con otros motivos. Se encontraron siete con motivos dinucleotídicos, 136 trinucleotídicos, 60 tetranucleotídicos y cuatro pentanucleotídicos. Del total de microsatélites identificados, 80 fueron puros, 46 puros interrumpidos, nueve compuestos, 22 compuestos interrumpidos, uno complejo y seis complejos interrumpidos, atendiendo a Chambers y MacAvoy (2000).

Se diseñaron cebadores para todos los clones posibles y se probaron para seleccionar los que generasen un producto de PCR polimórfico. La tabla 4.II muestra para cada genoteca el número de parejas de cebadores probadas y los resultados de la PCR. De las 97 parejas probadas, 24 produjeron amplificaciones satisfactorias con un patrón polimórfico; con las demás no se obtuvo amplificación o los patrones generados fueron complejos o monomórficos.

Tabla 4.II. Resultados de las amplificaciones realizadas con los cebadores probados.

	<b>Genoteca ATC</b>	<b>Genoteca ACC</b>	<b>Genoteca CTGT</b>
<b>Pares de cebadores probados</b>	50	17	30
<b>Ausencia de producto</b>	15 (30%)	7 (41,18%)	11 (36,66%)
<b>Patrón monomórfico</b>	10 (20%)	6 (35,29%)	11 (36,66%)
<b>Patrón complejo</b>	7 (14%)	1 (5,88%)	5 (16,66%)
<b>Patrón polimórfico</b>	18 (36%)	3 (17,65%)	3 (10%)

La tabla 4.III recopila las características de los 24 microsatélite polimórficos en una muestra de 15-24 individuos de O Grove. En 10 *loci* los microsatélites son puros, en 11 son puros interrumpidos y en los demás compuestos (1) o compuestos interrumpidos (2). Excepto tres *loci* con motivos tetranucleotídicos, todos los marcadores contienen repeticiones de trinucleótidos. El número de alelos identificados osciló entre dos y 20 con una diferencia de tamaño entre los alelos de tres a 184 pb. La heterocigosidad observada y esperada varió entre 0,044-0,789 y 0,044-0,955, respectivamente.

#### **4.1.1.1. Desarrollo de PCRs multiplex**

El desarrollo de PCRs *multiplex* se realizó teniendo en cuenta los datos de diversidad genética de 21 *loci* obtenidos en una muestra de individuos de O Grove (tabla 4.III) y O Barqueiro/Faro (datos no mostrados). El programa Multiplex Manager proporcionó por defecto cuatro combinaciones de *loci* pero se modificaron manualmente, de modo que se consiguieron agrupar los 21 microsatélites en tres: (1) VpAT1-6, VpAT1-36, VpAT2-74, VpAT1-54, VpAT1-67, VpAC2-34b, VpTE-228 y VpTE-139; (2) VpAT1-85, VpAT1-35, VpAT1-31, VpAT2-97, VpAT2-8a, VpAT1-92 y VpAC1-59b; (3) VpAT2-36, VpAT2-4, VpAT2-59, VpAT2-30, VpAC1-23 y VpTE-181 (figura 4.1). Tres de los 21 *loci* (VpAT1-31, VpAT2-97 y VpAT2-59) no amplificaron satisfactoriamente durante el proceso de optimización de las PCRs *multiplex*, por lo que fueron descartados en las amplificaciones posteriores. En la tabla 4.IV se detallan las características de las PCRs *multiplex* optimizadas, incluyendo el cebador marcado y el fluoróforo, la concentración de los cebadores y el rango de tamaño de los alelos detectados en las dos muestras analizadas.



Tabla 4.III. Características de los 24 marcadores microsatélite identificados.

<i>Locus</i>	Motivo microsatélite (Clasificación*)	Cebadores (5'-3')	T <sup>m</sup> (°C)/Mg <sup>2+</sup> (mM)	N	Na	R (pb)	Ho	He
<b>Genoteca ATC</b>								
VpAT1-6	(TGA) <sub>4</sub> ...(TGA) <sub>4</sub> ...(TGA) <sub>9</sub> ...(TGA) <sub>4</sub> (PI)	F: tggcggtagggtaatagtc R: cgctggaataatgccccttg	60/1,5	23	6	264-282	0,609	0,692
VpAT1-12	(TGA) <sub>2</sub> G(TGA) <sub>5</sub> (PI)	F: ttaatgctcagatgggfgatg R: tggacaacagctiagccagaa	56/3	24	14	197-241	0,583	0,934
VpAT1-31	(TCA) <sub>6</sub> (P)	F: ggaaagaatggcgtccata R: acatcaattcccccaacaga	58/3	24	4	167-176	0,292	0,361
VpAT1-35	(TCA) <sub>3</sub> CCA(TCA) <sub>3</sub> (PI)	F: catcaatccacaaccagtcg R: ggacggctttgctgtggtt	60/1,5	23	2	129-132	0,044	0,044
VpAT1-36	(GAT) <sub>6</sub> (P)	F: cagcgtgacaaaacaaga R: accccatttcattccacg	60/3	22	4	166-193	0,455	0,394
VpAT1-53	(TGA) <sub>5</sub> (P)	F: atgcattgaccacagttcct R: ctccatcaaggcacaatcca	59,5/2,5	18	7	131-156	0,222	0,776
VpAT1-54	(CAT) <sub>3</sub> AAAT(CAT) <sub>4</sub> ...(CAT) <sub>9</sub> ...(AATC) <sub>4</sub> GATC (AATC) <sub>2</sub> (CI)	F: aaccgcaacagcagaataaa R: gggattcaaacgcagaacaa	59,5/2,5	24	8	267-285	0,833	0,826
VpAT1-64	(ATC) <sub>2</sub> ATTATA(ATC) <sub>6</sub> ACTGTC (ATC) <sub>2</sub> (PI)	F: ggctgtatagcgaatacaca R: caaaataggctatggctcgtct	58,5/2,5	22	20	126-310	0,409	0,955
VpAT1-67	(TGT) <sub>4</sub> ...(TGT) <sub>2</sub> ...(TGT) <sub>2</sub> ...(TGA) <sub>5</sub> ... (TGT) <sub>3</sub> (CI)	F: tcaagtgagctattgacga R: cgaccactttctacatcttcg	56/2,5	23	6	145-202	0,696	0,630
VpAT1-85	(ATC) <sub>8</sub> ...(ATC) <sub>3</sub> (PI)	F: caaaaccgtctgaaacagca R: cgattccacaagcgtaca	60/1,5	22	13	171-249	0,428	0,866
VpAT1-92	(TGA) <sub>6</sub> TGG(TGA) <sub>3</sub> (PI)	F: ctaacgg'gaccaaaactga R: ctagtgtcgaacataatagc	55,5/1,5	16	6	140-174	0,533	0,547
VpAT2-4	(ATC) <sub>2</sub> ATT(ATC) <sub>8</sub> (PI)	F: ccaagtttggaaaattcga R: ataccagcaggaggacca	58,5/1,5	23	6	143-158	0,789	0,737
VpAT2-8a	(GAT) <sub>7</sub> (P)	F: ttaatcaatgctccggaaga R: caaccaaaggaaatcctgaa	59,5/1,5	15	5	177-189	0,214	0,688
VpAT2-30	(ATC) <sub>2</sub> ...(ATC) <sub>2</sub> ...(ATC) <sub>6</sub> (PI)	F: agctgttccatcatcaccag R: ttttcagagatcatgttgatga	59/2,5	21	7	96-117	0,476	0,763
VpAT2-36	(CAT) <sub>3</sub> ...(CAT) <sub>3</sub> CA(CAT) <sub>3</sub> (PI)	F: gcatctcattgcaaa R: tgrtiagaagaattcgactcc	53/1,5	20	2	190-194	0,053	0,371

\*Clasificación según Chambers y MacAvoy (2000); P: puro interrumpido; C: compuesto interrumpido; N: número de individuos de la localidad de O Grove; Na: número de alelos; R: rango de tamaño de los alelos en pares de bases; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada.

Tabla 4.III. Continuación.

<i>Locus</i>	Motivo microsatélite (Clasificación*)	Cebadores (5'-3')	T <sup>a</sup> (°C)/Mg <sup>2+</sup> (mM)	N	Na	R (pb)	Ho	He
<b>VpAT2-59</b>	(GAT) <sub>5</sub> (P)	F: ctatcatggccctttgtggg R: ccgattccaccagttcttc	56/2,5	24	6	184-229	0,375	0,712
<b>VpAT2-74</b>	(ATC) <sub>8</sub> AAAT(ATC) <sub>2</sub> (PI)	F: gccgctttccatgctcat R: cctcctgfcacttcccttc	59,5/2,5	24	4	129-149	0,417	0,463
<b>VpAT2-97</b>	(TCA) <sub>8</sub> (P)	F: aggggataaagttgacag R: acttaaacacagtttaataca	50/1,5	20	5	94-106	0,500	0,546
<b>Genoteca ACC</b>								
<b>VpAC1-23</b>	TAT CAT (TAT) <sub>3</sub> CAT (PI)	F: accgtgagtggtttcctatca R: gagggatattcaccgtaa	58,5/1,5	22	4	119-135	0,182	0,595
<b>VpAC1-59b</b>	(CCT) <sub>5</sub> (P)	F: gaaagaatagctctgtggtg R: aagtcgggatggtggtagt	55,5/1,5	16	3	113-119	0,562	0,494
<b>VpAC2-34b</b>	(ATG) <sub>4</sub> (GTG) <sub>4</sub> (C)	F: gctgctgttattggtaatgaag R: gccacacctcggattttat	60/1,5	24	6	310-349	0,333	0,485
<b>Genoteca CTGT</b>								
<b>VpTE-139</b>	(GACG) <sub>3</sub> (P)	F: aatttggacggacacaaagt R: ttctagcggacaatgaggtt	60/1,5	18	4	99-111	0,526	0,684
<b>VpTE-181</b>	(GAT) <sub>6</sub> (P)	F: tcgatgfttacctggtgagaa R: ctgtttctgtccacgattg	60/1,5	23	3	127-133	0,349	0,357
<b>VpTE-228</b>	(AGAC) <sub>4</sub> (P)	F: caacagtaatatggcgatca R: gcattttgtcttggagggttc	59,5/1,5	22	5	140-156	0,316	0,703

Figura 4.1. Distribución de 21 marcadores microsatélite en tres PCRs *multiplex*. La longitud de las barras es proporcional al rango de tamaño de los alelos

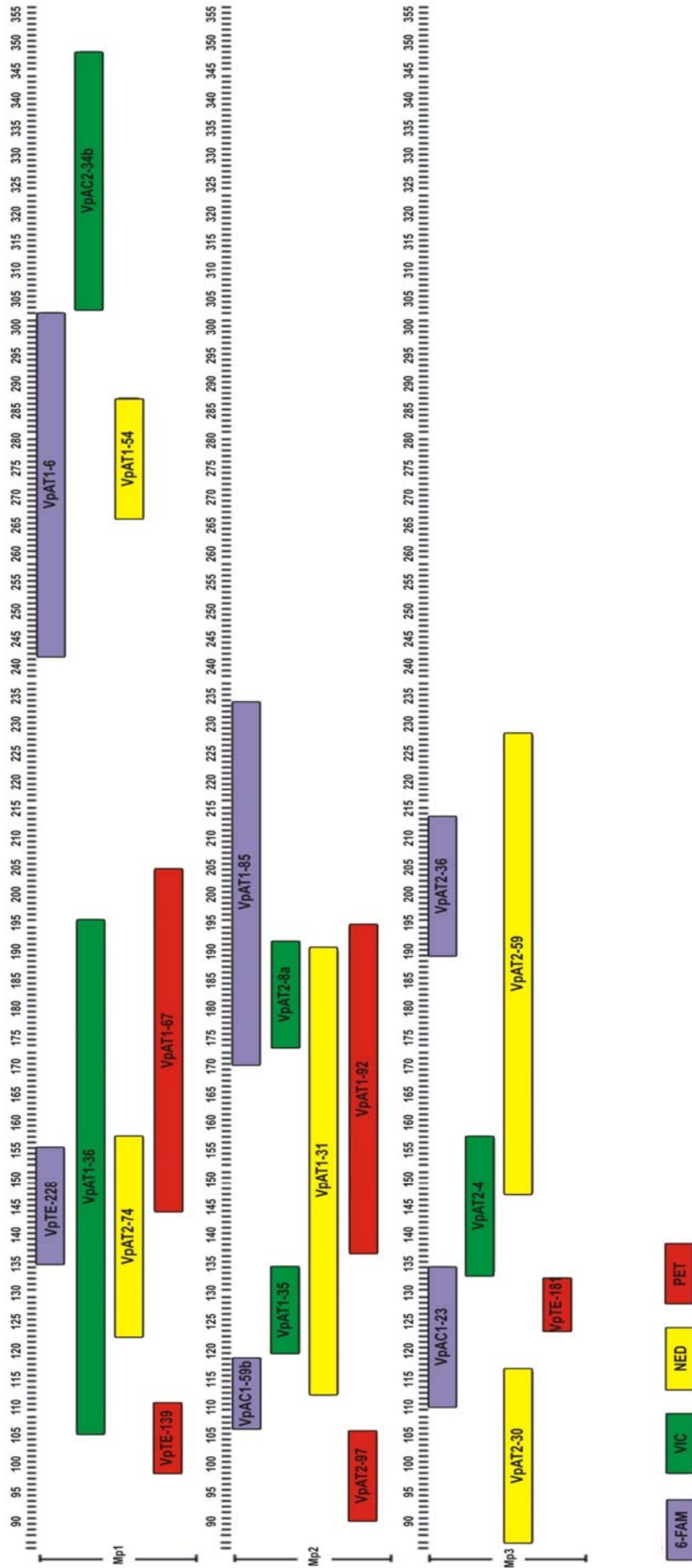


Tabla 4.IV. Características de las PCRs *multiplex* optimizadas.

<i>Multiplex/Locus</i>	<b>Cebador marcado* Fluoróforo</b>	<b>Cebadores [μM]</b>	<b>Rango de tamaño (pb)</b>
<i>Multiplex I</i>			
VpAT1-6	R-FAM	0,48	243-303
VpAT1-36	R-VIC	0,064	106-196
VpAT2-74	R-NED	0,16	123-158
VpAT1-54	R-NED	1,28	267-288
VpAT1-67	R-PET	0,4	145-205
VpAC2-34b	R-VIC	1,28	304-349
VpTE-228	F-FAM	0,48	136-156
VpTE-139	F-PET	0,2	99-111
<i>Multiplex II</i>			
VpAT1-85	F-FAM	0,48	171-249
VpAT1-35	R-VIC	0,24	120-135
VpAT2-8a	F-VIC	0,48	174-192
VpAT1-92	F-PET	0,96	138-195
VpAC1-59b	R-FAM	0,2	107-119
<i>Multiplex III</i>			
VpAT2-36	F-FAM	1,28	106-196
VpAT2-4	F-VIC	0,16	134-158
VpAT2-30	F-NED	0,48	88-117
VpAC1-23	R-FAM	0,2	111-135
VpTE-181	R-PET	0,8	124-133

\*F: cebador directo; R: cebador reverso.

### **4.1.2. ADN mitocondrial**

Los marcadores mitocondriales seleccionados fueron un fragmento de los genes 16S, COI y CitB. Del gen 16S se amplificó un fragmento de 511 pb con los cebadores descritos por Palumbi (1996) y se obtuvo una secuencia de 398 pb. Del gen COI se amplificaron 708 pb con los cebadores de Folmer y col. (1994) y se obtuvo la secuencia de un fragmento de 555 pb. En el caso del gen CitB se probaron cebadores degenerados desarrollados por Dahlgren y col. (2000) a partir de secuencias CitB de moluscos pero las amplificaciones no fueron consistentes. Por ello, se clonó el producto de PCR de cuatro individuos, se obtuvo la secuencia de un clon por cada individuo y se diseñaron nuevos cebadores, específicos de *V. pullastra*. Estos cebadores amplifican un fragmento de 400 pb y se obtuvo una secuencia de 314 pb.

#### **4.1.2.1. Análisis del modo de herencia**

Dado que en *R. philippinarum* se demostró la existencia de DUI, se realizó una prueba preliminar con el gen CitB para averiguar si también existe DUI en *V. pullastra*. Para ello, se amplificó este gen con los cebadores específicos de esta especie y ADN molde obtenido de músculo aductor de dos machos y dos hembras y de esperma. El fragmento amplificado (400 pb) se secuenció directamente, obteniéndose la secuencia para un tramo de 223 pb. Al alinear las secuencias se encontraron sólo dos sitios variables (figura 4.5) asociados a las secuencia de esperma y músculo de uno de los individuos. Aunque no pueda descartarse que estas diferencias sean atribuibles a la presencia de DUI, en análisis posteriores se asumió que *V. pullastra* presenta un solo tipo de ADN mitocondrial por la baja diferenciación detectada.

## **4.2. Análisis de poblaciones naturales mediante microsatélites**

### **4.2.1. Diversidad genética**

La diversidad genética se analizó en muestras de 22-50 individuos procedentes de cinco localidades de la costa gallega (O Barqueiro, Barallobre, Camariñas, O Grove y Cangas) y una de la costa portuguesa (Faro). En la tabla 4.V se detallan las estimas obtenidas.

El número de alelos por *locus* varió entre 3 (VpAT2-36) y 33 (VpAT1-85). La heterocigosidad observada varió entre 0,079 (VpAT1-35) y 0,707 (VpAT2-4), y la heterocigosidad esperada entre 0,084 (VpAT1-35) y 0,908 (VpAT1-85). Los valores de riqueza alélica se encontraron en un rango de 2,32 (VpAT2-36) a 16,167 (VpA1-85). Catorce de los 18 *loci* presentaron alelos privados en al menos una localidad. La frecuencia de estos alelos no fue superior a 0,057, con la excepción de un alelo privado del *locus* VpAT1-36 (170) y dos del VpAT2-74 (143 y 126) de la localidad de Faro, cuyas frecuencias fueron 0,722, 0,711 y 0,133 respectivamente.

M1esperma	TGAGTCTGAGGTGGTATTTGCGTGGGGGACGCTACATTAAAGCGATTTTTTACTACTCCAT	60
M1músculo	.....	60
M2esperma	.....	60
M2músculo	.....	60
H1músculo	.....	60
H2músculo	.....	60
M1esperma	TTTAGGCTTCCTTTTGTGTTAGCGGGATTAGCAGTATTACATATTATTATGATTCATGAG	120
M1músculo	.....	120
M2Esperma	.....	120
M2músculo	.....	120
H1músculo	.....	120
H2músculo	.....	120
M1Esperma	TCTGGGACCAGAAATCCTTTAGGTATTAGAAGAAGTGGAGATATGATCCCCTTTCATTAC	180
M1músculo	.....T	180
M2Esperma	.....T	180
M2músculo	.....T	180
H1músculo	.....T	180
H2músculo	.....T	180
M1Esperma	TACTATACCGTGAAGGATTTAGTGGGGGTGATAGTAACTCTGA	223
M1músculo	.....A.....	223
M2Esperma	.....	223
M2músculo	.....	223
H1músculo	.....	223
H2músculo	.....	223

Figura 4.5. Alineamiento de las secuencias de CitB obtenidas de esperma y músculo de machos (M) y hembras (H). Los puntos representan residuos idénticos; las sustituciones nucleotídicas se indican con la base correspondiente.

Ninguno de los tests de desequilibrio de ligamiento realizados (918 resultantes de la combinación de pares de *loci* y localidad) resultó significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni, por lo que puede considerarse que todos los *loci* segregan independientemente.

En las localidades, el número medio de alelos por *locus* fue 6,500-7,611 y la riqueza alélica de 5,488-6,207, encontrándose los valores extremos en Barallobre y O Grove, respectivamente. La heterocigosidad observada varió entre 0,392 (Barallobre) y 0,424 (O Barqueiro) y la heterocigosidad esperada entre 0,566 (Cangas) y 0,609 (Faro). Al aplicar el test de Friedman no se detectaron diferencias significativas en los valores

de riqueza alélica entre las localidades ni tampoco en los valores de las heterocigosidades observadas y esperadas. Atendiendo a estos dos últimos parámetros, las localidades muestran una diversidad genética moderada.

De los 108 tests realizados para testar el equilibrio Hardy-Weinberg, resultantes de la combinación *locus*-localidad, 55 resultaron significativos para un  $\alpha = 0,05$  y 37 después de la corrección secuencial de Bonferroni. Tras esta corrección, los valores significativos se concentran sobre todo en cinco *loci* (VpTE-228, VpAT1-85, VpAT1-92, VpAT2-8a, VpAC1-23) con desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg en todas las localidades. Todas las combinaciones que no se encontraron en equilibrio tienen valores positivos para el coeficiente de endogamia (0,278 VpAT2-30/O Grove – 0,887 VpTE-228/O Grove) indicando la existencia de un déficit de heterocigotos. Globalmente, todas las localidades presentaron valores de  $F_{IS}$  positivos.

El programa Micro-Checker indicó la presencia de alelos nulos en las 37 combinaciones *locus*-localidad que no se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg (tabla 4.VI). En cinco *loci* (VpTE-228, VpAT1-85, VpAT1-92, VpAT2-8a y VpAC1-23) los alelos nulos se detectaron a una frecuencia superior a 0,2 en todas o la mayoría de las localidades.

Al aplicar los tests de neutralidad a cada una de las 37 combinaciones *locus*/localidad que no se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg, ninguno de ellos resultó significativo.

Tabla 4.V. Diversidad genética en los marcadores microsatélite.

<i>Locus</i>		<b>Bq</b>	<b>Ba</b>	<b>Cm</b>	<b>Gr</b>	<b>Ca</b>	<b>Fa</b>	<b>Total</b>
<b>VpAT1-6</b>	<b>N</b>	46	38	46	48	47	41	225
	<b>Na</b>	6(1)	7(1)	5	9(2)	7	7(1)	12
	<b>Ac</b>	273	273	273	273	273	270	273
	<b>FAc</b>	0,478	0,461	0,511	0,532	0,479	0,439	0,438
	<b>Rs</b>	5,357	6,075	4,891	6,628	5,761	6,064	6,119
	<b>Ho</b>	0,739	0,711	0,500	0,542	0,532	0,634	0,610
	<b>He</b>	0,648	0,683	0,641	0,652	0,637	0,729	0,666
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	-0,142	-0,042	0,222	0,170	0,167	0,132	0,115
<b>VpAC2-34b</b>	<b>N</b>	50	43	43	49	50	44	279
	<b>Na</b>	8	8	8	9	10	8	12
	<b>Ac</b>	325	325	325	325	325	322	325
	<b>Fac</b>	0,660	0,663	0,640	0,650	0,725	0,636	0,591
	<b>Rs</b>	6,028	6,727	6,387	6,769	7,313	5,500	7,056
	<b>Ho</b>	0,560	0,372	0,581	0,347	0,400	0,341	0,434
	<b>He</b>	0,531	0,544	0,561	0,462	0,558	0,552	0,536
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	-0,055	0,318*	-0,037	0,252*	0,285*	0,385*	0,295
<b>VpAT1-54</b>	<b>N</b>	50	35	49	50	43	44	271
	<b>Na</b>	8	6(1)	6	8	8	9(1)	10
	<b>Ac</b>	274	274	274	279	279	270	274
	<b>Fac</b>	0,330	0,371	0,357	0,419	0,300	0,318	0,290
	<b>Rs</b>	6,809	5,489	5,611	7,666	6,670	8,110	7,595
	<b>Ho</b>	0,620	0,457	0,592	0,680	0,558	0,796	0,617
	<b>He</b>	0,765	0,719	0,743	0,809	0,724	0,804	0,762
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	0,191	0,368**	0,205	0,160*	0,231*	0,011*	0,218
<b>VpAT1-36</b>	<b>N</b>	50	44	48	49	40	45	276
	<b>Na</b>	9(2)	4	5	6(1)	5(1)	5(1)	12
	<b>Ac</b>	172	172	172	172	172	170	172
	<b>Fac</b>	0,760	0,773	0,813	0,850	0,806	0,722	0,696
	<b>Rs</b>	5,717	3,750	4,276	4,947	4,389	3,974	5,512
	<b>Ho</b>	0,440	0,455	0,375	0,347	0,300	0,311	0,371
	<b>He</b>	0,405	0,386	0,331	0,343	0,274	0,447	0,364
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	-0,087	-0,181	-0,133	-0,011	-0,095	0,307*	0,242
<b>VpAT2-74</b>	<b>N</b>	49	44	50	50	48	45	286
	<b>Na</b>	4	5	4	4	6(3)	5(2)	10
	<b>Ac</b>	145	145	145	145	145	143	145
	<b>Fac</b>	0,837	0,761	0,800	0,802	0,760	0,711	0,685
	<b>Rs</b>	3,401	4,195	3,346	3,517	4,220	4,482	5,229
	<b>Ho</b>	0,327	0,386	0,280	0,300	0,354	0,178	0,304
	<b>He</b>	0,290	0,397	0,339	0,389	0,341	0,468	0,371
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	-0,129	0,027	0,176	0,230	-0,040	0,623**	0,393

Bq: O Barqueiro; Ba: Barallobre; Cm: Camariñas; Gr: O Grove; Ca: Cangas; Fa: Faro; N: número de individuos; Na: número de alelos, entre paréntesis, número de alelos privados; Ac: alelo más frecuente definido en pares de bases; FAc: frecuencia de Ac; Rs: riqueza alélica en base a 22 individuos; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada; *F<sub>IS</sub>*: coeficiente de endogamia. (\*) Significativo con  $\alpha=0,05$ . (\*\*) Significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni.



Tabla 4.V. Continuación.

<i>Locus</i>		<b>Bq</b>	<b>Ba</b>	<b>Cm</b>	<b>Gr</b>	<b>Ca</b>	<b>Fa</b>	<b>Total</b>
<b>VpAT1-35</b>	<b>N</b>	47	44	48	49	50	50	288
	<b>Na</b>	4	2	3(1)	5	3	3	6
	<b>Ac</b>	129	129	129	129	129	129	129
	<b>FAc</b>	0,957	0,989	0,938	0,970	0,939	0,950	0,957
	<b>Rs</b>	2,656	1,500	2,416	3,296	2,129	2,517	2,495
	<b>Ho</b>	0,085	0,023	0,125	0,122	0,060	0,060	0,079
	<b>He</b>	0,084	0,023	0,120	0,119	0,059	0,097	0,084
	<b>F<sub>IS</sub></b>	-0,019	0	-0,046	-0,030	-0,014	0,385*	0,055
<b>VpAT1-67</b>	<b>N</b>	49	38	44	49	40	45	265
	<b>Na</b>	4	6	7(1)	8(2)	4	7(1)	12
	<b>Ac</b>	184	184	184	184	184	181	184
	<b>FAc</b>	0,776	0,737	0,682	0,750	0,582	0,589	0,626
	<b>Rs</b>	3,790	4,956	5,252	5,749	3,463	5,828	5,693
	<b>Ho</b>	0,408	0,526	0,523	0,674	0,450	0,400	0,497
	<b>He</b>	0,379	0,434	0,504	0,612	0,401	0,588	0,486
	<b>F<sub>IS</sub></b>	-0,079	-0,216	-0,037	-0,102	-0,124	0,322*	0,127
<b>VpTE-139</b>	<b>N</b>	50	48	50	50	48	44	290
	<b>Na</b>	4	4	5	5(1)	3	5(1)	8
	<b>Ac</b>	110	110	110	110	110	110	110
	<b>FAc</b>	0,490	0,458	0,440	0,500	0,460	0,511	0,476
	<b>Rs</b>	3,440	3,709	3,880	4,129	3	4	3,725
	<b>Ho</b>	0,520	0,479	0,620	0,646	0,540	0,614	0,570
	<b>He</b>	0,638	0,653	0,667	0,664	0,628	0,632	0,648
	<b>F<sub>IS</sub></b>	0,186	0,268	0,071	-0,029	0,188	0,029	0,116
<b>VpTE-228</b>	<b>N</b>	27	27	22	23	23	32	154
	<b>Na</b>	6	8	9(1)	8	7	6	11
	<b>Ac</b>	140	140	139	140	144	139	140
	<b>FAc</b>	0,333	0,370	0,341	0,435	0,370	0,453	0,247
	<b>Rs</b>	5,783	7,412	9	7,954	6,955	5,898	9,095
	<b>Ho</b>	0,111	0,222	0,182	0,087	0,130	0,094	0,138
	<b>He</b>	0,771	0,753	0,802	0,756	0,750	0,730	0,773
	<b>F<sub>IS</sub></b>	0,858**	0,709**	0,777**	0,887**	0,829**	0,873**	0,840
<b>VpAC1-59b</b>	<b>N</b>	50	50	49	50	50	50	299
	<b>Na</b>	6	6	6	6	5	6	7
	<b>Ac</b>	119	119	119	119	119	119	119
	<b>FAc</b>	0,530	0,490	0,663	0,520	0,590	0,550	0,557
	<b>Rs</b>	5,067	5,125	4,347	4,320	4,389	5,035	4,746
	<b>Ho</b>	0,700	0,740	0,510	0,660	0,600	0,480	0,615
	<b>He</b>	0,638	0,676	0,518	0,582	0,643	0,630	0,614
	<b>F<sub>IS</sub></b>	-0,099*	-0,096	0,015	-0,136	0,068	0,239	0,001

Tabla 4.V. Continuación.

<i>Locus</i>		<b>Bq</b>	<b>Ba</b>	<b>Cm</b>	<b>Gr</b>	<b>Ca</b>	<b>Fa</b>	<b>Total</b>
<b>VpAT1-85</b>	<b>N</b>	45	49	48	47	50	50	289
	<b>Na</b>	21(1)	15(1)	21(1)	21(1)	18(2)	21(1)	33
	<b>Ac</b>	192/219	197	195	197	192	197	192
	<b>FAc</b>	0,122	0,214	0,167	0,190	0,277	0,150	0,142
	<b>Rs</b>	17,124	10,902	16,104	14,333	13,629	16,547	16,167
	<b>Ho</b>	0,467	0,367	0,438	0,468	0,500	0,420	0,443
	<b>He</b>	0,935	0,864	0,922	0,873	0,900	0,924	0,908
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	0,503**	0,577**	0,528**	0,467**	0,447**	0,548**	0,517
<b>VpAT1-92</b>	<b>N</b>	41	49	49	45	50	49	283
	<b>Na</b>	12(1)	10	12(1)	10	10	13(1)	17
	<b>Ac</b>	161	161	161	161	161	161	161
	<b>FAc</b>	0,439	0,531	0,520	0,490	0,478	0,571	0,507
	<b>Rs</b>	9,612	8,464	9,649	8,747	8,593	10,171	9,962
	<b>Ho</b>	0,293	0,245	0,143	0,356	0,240	0,408	0,281
	<b>He</b>	0,763	0,690	0,702	0,740	0,721	0,657	0,717
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	0,619**	0,647**	0,798**	0,522**	0,669**	0,381**	0,609
<b>VpAT2-8a</b>	<b>N</b>	44	46	47	42	46	41	266
	<b>Na</b>	8	9	13(1)	11	11(1)	10	16
	<b>Ac</b>	184	184	177	184	184	177	184
	<b>FAc</b>	0,341	0,294	0,287	0,272	0,357	0,232	0,278
	<b>Rs</b>	6,85	7,85	10,540	9,979	9,201	8,793	9,954
	<b>Ho</b>	0,364	0,261	0,362	0,238	0,391	0,293	0,318
	<b>He</b>	0,756	0,828	0,829	0,809	0,828	0,848	0,822
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	0,522**	0,687**	0,566**	0,708**	0,530**	0,658**	0,616
<b>VpAC1-23</b>	<b>N</b>	48	47	47	44	48	46	280
	<b>Na</b>	6	7	6	6	7(1)	7	8
	<b>Ac</b>	132	132	132	132	132	132	132
	<b>FAc</b>	0,719	0,660	0,649	0,677	0,557	0,598	0,645
	<b>Rs</b>	4,751	6,384	5,354	5,604	6,335	6,168	5,940
	<b>Ho</b>	0,188	0,128	0,128	0,182	0,229	0,326	0,197
	<b>He</b>	0,457	0,541	0,540	0,636	0,522	0,590	0,551
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	0,592**	0,766**	0,765**	0,717**	0,564**	0,450**	0,642
<b>VpAT2-30</b>	<b>N</b>	49	48	48	50	50	47	292
	<b>Na</b>	8	7	8	9	7	9(1)	10
	<b>Ac</b>	106	106	106	106	106	106	106
	<b>FAc</b>	0,449	0,458	0,448	0,450	0,430	0,404	0,440
	<b>Rs</b>	6,746	5,603	6,079	7,119	5,786	6,902	6,567
	<b>Ho</b>	0,490	0,438	0,583	0,540	0,380	0,553	0,497
	<b>He</b>	0,723	0,675	0,712	0,696	0,746	0,713	0,713
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	0,325*	0,354*	0,182	0,278**	0,456**	0,226*	0,304

Tabla 4.V. Continuación.

<i>Locus</i>		<b>Bq</b>	<b>Ba</b>	<b>Cm</b>	<b>Gr</b>	<b>Ca</b>	<b>Fa</b>	<b>Total</b>
<b>VpAT2-36</b>	<b>N</b>	42	37	39	36	45	41	240
	<b>Na</b>	3	2	3	2	2	2	3
	<b>Ac</b>	191	191	191	191	191	191	191
	<b>FAc</b>	0,893	0,851	0,897	0,789	0,833	0,707	0,827
	<b>Rs</b>	2,772	2	2,808	2	2	2	2,320
	<b>Ho</b>	0,071	0,135	0,103	0,056	0,111	0,244	0,120
	<b>He</b>	0,198	0,257	0,191	0,337	0,282	0,419	0,282
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	0,641**	0,477*	0,465*	0,805**	0,673**	0,421*	0,583
<b>VpAT2-4</b>	<b>N</b>	41	44	42	40	47	43	257
	<b>Na</b>	8(1)	7(1)	7	7	7	8(2)	11
	<b>Ac</b>	146	146	146	146	150	146	146
	<b>FAc</b>	0,439	0,409	0,464	0,372	0,438	0,419	0,399
	<b>Rs</b>	7,132	5,746	6,398	6,511	6,333	6,870	6,519
	<b>Ho</b>	0,707	0,614	0,691	0,725	0,809	0,698	0,707
	<b>He</b>	0,675	0,696	0,691	0,726	0,715	0,718	0,703
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	-0,049	0,120	0	-0,015	-0,116	0,029	-0,006
<b>VpTE-181</b>	<b>N</b>	50	49	46	49	49	50	244
	<b>Na</b>	3	4	3	3	3	3	4
	<b>Ac</b>	127	127	127	127	127	127	127
	<b>FAc</b>	0,570	0,653	0,565	0,684	0,694	0,710	0,647
	<b>Rs</b>	2,986	2,898	2,478	2,449	2,449	2,440	2,724
	<b>Ho</b>	0,540	0,490	0,652	0,449	0,571	0,380	0,514
	<b>He</b>	0,546	0,472	0,506	0,443	0,435	0,422	0,470
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	0,011	-0,039	-0,292	-0,032	0,293*	0,100	-0,084
<b>Global</b>	<b>N</b>	50	50	50	50	50	50	—
	<b>Na</b>	7,111	6,500	7,278	7,611	6,833	7,444	—
	<b>Rs</b>	5,890	5,488	6,045	6,207	5,701	6,183	—
	<b>Ho</b>	0,424	0,392	0,410	0,404	0,406	0,403	0,407
	<b>He</b>	0,567	0,572	0,573	0,590	0,566	0,609	0,580
	<b><i>F<sub>IS</sub></i></b>	0,250	0,273	0,254	0,283	0,288	0,371	—

#### 4.2.2. Diferenciación poblacional

El análisis de la diferenciación poblacional se llevó a cabo con 13 de los 18 *loci* microsatélite incluidos en las PCRs *multiplex*. Se descartaron cinco *loci* con alelos nulos en frecuencias superiores a 0,2 (VpTE-228, VpAT1-85, VpAT1-92, VpAT2-8a y VpAC1-23) ya que este tipo de alelos, a frecuencias elevadas, conducen a sobrestimar tanto  $F_{ST}$  como las distancias genéticas cuando existe estructura de población (Chapuis y Estoup, 2007).

Tabla 4.VI. Frecuencias estimadas de alelos nulos.

<i>Locus</i>	<b>Bq</b>	<b>Ba</b>	<b>Cm</b>	<b>Gr</b>	<b>Ca</b>	<b>Fa</b>
<b>VpAT1-54</b>	—	0,147	—	—	—	—
<b>VpAT2-74</b>	—	—	—	—	—	0,195
<b>VpTE-228</b>	0,367	0,297	0,338	0,375	0,348	0,364
<b>VpAT1-85</b>	0,238	0,263	0,248	0,212	0,207	0,259
<b>VpAT1-92</b>	0,263	0,260	0,326	0,217	0,277	0,147
<b>VpAT2-8a</b>	0,220	0,307	0,252	0,312	0,235	0,296
<b>VpAC1-23</b>	0,182	0,265	0,265	0,275	0,190	0,162
<b>VpAT2-30</b>	—	—	—	0,114	0,183	—
<b>VpAT2-36</b>	0,104	—	—	0,174	0,167	—

El valor global del estadístico  $F_{ST}$  fue de 0,079, significativamente distinto de cero, y el valor del  $F_{ST}$  estandarizado ( $F'_{ST}$ ) de 0,196, un valor alto según la clasificación de Wright (1978). Los valores de  $F_{ST}$  por *locus* (tabla 4.VII) oscilaron entre -0,008 (VpTE-139) y 0,390 (VpAT2-74), siendo significativamente distintos de cero en seis *loci* (VpAT1-6, VpAC2-34b, VpAT1-54, VpAT1-36, VpAT2-74 y VpAT1-67). De éstos, VpAT1-36 y VpAT2-74 son los que más contribuyen a la diferenciación.

 Tabla 4.VII.  $F_{ST}$  por *locus*.

<i>Locus</i>	$F_{ST}$	<b>P-valor</b>
<b>VpAT1-6</b>	0,037	<0,001*
<b>VpAC2-34b</b>	0,174	<0,001*
<b>VpAT1-54</b>	0,051	<0,001*
<b>VpAT1-36</b>	0,378	<0,001*
<b>VpAT2-74</b>	0,390	<0,001*
<b>VpAT1-35</b>	0,000	0,460
<b>VpAT1-67</b>	0,195	<0,001*
<b>VpTE-139</b>	-0,008	1,000
<b>VpAC1-59b</b>	0,003	0,220
<b>VpAT2-30</b>	0,001	0,400
<b>VpAT2-36</b>	0,025	0,100
<b>VpAT2-4</b>	0,001	0,340
<b>VpTE-181</b>	0,006	0,140

(\*) Significativo para  $\alpha=0,05$ .

La tabla 4.VIII muestra los valores de  $F_{ST}$  por pares de localidades. En las 15 comparaciones realizadas, seis tienen un valor de  $F_{ST}$  significativamente distinto de cero y cinco después de la corrección secuencial de Bonferroni. En estas cinco destaca el hecho de que todas incluyen la localidad de Faro. Los valores indican una

diferenciación genética muy alta entre la localidad portuguesa y todas las gallegas ( $F'_{ST}=0,422-0,581$ ) y la ausencia de diferencias genéticas significativas entre las localidades de Galicia.

Tabla 4.VIII. Valores  $F_{ST}$  por pares de localidades. Sobre la diagonal  $F_{ST}$ ; bajo la diagonal  $F'_{ST}$ .

	<b>Bq</b>	<b>Ba</b>	<b>Cm</b>	<b>Gr</b>	<b>Ca</b>	<b>Fa</b>
<b>Bq</b>		-0,002	-0,004	0,005*	-0,00001	0,207**
<b>Ba</b>	0		-0,001	0,001	-0,005	0,200**
<b>Cm</b>	0	0		0,003	0,001	0,207**
<b>Gr</b>	0,013	0,002	0,005		-0,0001	0,194**
<b>Ca</b>	0	0	0,002	0		0,212**
<b>Fa</b>	0,581	0,511	0,454	0,422	0,490	

(\*) Significativo con  $\alpha=0,05$ . (\*\*) Significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni.

La diferenciación poblacional se evaluó también atendiendo a la distribución de frecuencias génicas. La tabla 4.IX indica el P-valor de los tests realizados por *locus*. Las distribuciones génicas de los *loci* VpAT1-6, VpAC2-34b, VpAT1-54, VpAT1-36, VpAT2-74, VpAT1-67 y VpAT2-36 resultaron significativamente heterogéneas tras la corrección secuencial de Bonferroni. Todos los *loci* que presentaron heterogeneidad, excepto VpAT2-36, coincidieron con los que muestran valores de  $F_{ST}$  significativos.

El análisis de las distribuciones génicas se realizó también por pares de localidades y *locus*. Del total de 195 combinaciones, resultaron significativas tras la corrección secuencial de Bonferroni todas las que implicaron a Faro en seis de los *loci* (VpAT1-6, VpAC2-34b, VpAT1-54, VpAT1-36, VpAT2-74 y VpAT1-67), en consonancia de nuevo con los análisis de  $F_{ST}$ .

El programa Structure detectó igualmente la existencia de diferenciación genética. Al considerar que los individuos pueden tener un origen mixto y frecuencias alélicas independientes, se obtuvo el valor máximo para la verosimilitud estimada de  $K$  para  $K=2$  (figura 4.2). Valores de  $K$  mayores mostraron valores de verosimilitud similares aunque más bajos. De igual modo, la distribución de  $\Delta K$  mostró un elevado pico para  $K = 2$ , con el resto de valores mucho más bajos y cercanos a cero (figura 4.2).

Tabla 4.IX. Valores de significación de la diferenciación génica por *locus*.

<i>Locus</i>	<b>P-valor</b>
<b>VpAT1-6</b>	<0,001**
<b>VpAC2-34b</b>	<0,001**
<b>VpAT1-54</b>	<0,001**
<b>VpAT1-36</b>	<0,001**
<b>VpAT2-74</b>	<0,001**
<b>VpAT1-35</b>	0,183
<b>VpAT1-67</b>	<0,001**
<b>VpTE-139</b>	0,747
<b>VpAC1-59b</b>	0,249
<b>VpAT2-30</b>	0,012*
<b>VpAT2-36</b>	0,001**
<b>VpAT2-4</b>	0,349
<b>VpTE-181</b>	0,044*

(\*) Significativo para  $\alpha=0,05$ . (\*\*) Significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni.

La figura 4.3 representa el resultado obtenido en una de las réplicas cuando se consideró la existencia de dos grupos; en ella se observan dos grupos claramente diferenciados, uno muy homogéneo constituido por las cinco localidades gallegas (color verde) y el otro compuesto por la localidad portuguesa (color rojo). Sólo unos pocos individuos de Faro heredaron la mayor parte de su genoma de la misma población que los individuos de las localidades gallegas.

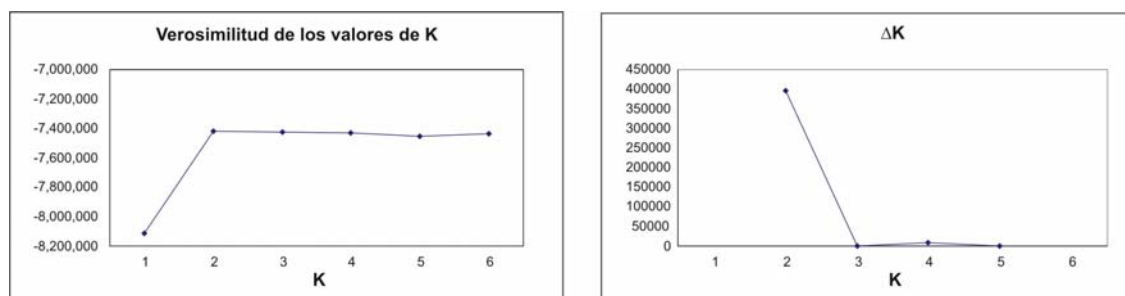


Figura 4.2. Distribución de la verosimilitud estimada de  $K$  y  $\Delta K$ . En el gráfico de  $\Delta K$  no se encuentran representados  $K=1$  ni  $K=6$  al calcularse  $\Delta K$  como la diferencia entre valores consecutivos de  $K$ .

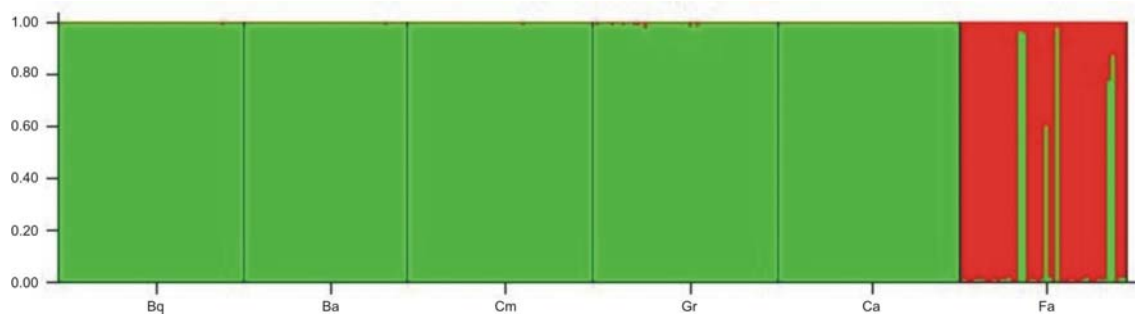


Figura 4.3. Estructura poblacional inferida con el programa Structure. Cada individuo se representa mediante una barra vertical dividida en dos segmentos cada uno proporcional a su coeficiente de pertenencia a cada grupo. Cada color representa un grupo. Las líneas negras separan los individuos de las distintas muestras.

Por otro lado, las estimas del número de migrantes presentaron los valores más elevados en las comparaciones de las cinco localidades gallegas, y los valores más bajos en las comparaciones que incluían la localidad portuguesa (tabla 4.X). Éstos son del orden de 10 veces menores que los hallados entre las localidades gallegas, indicando la existencia de restricciones en el flujo génico con la localidad de Faro.

Tabla 4.X. Número de migrantes entre pares de localidades.

	<b>Bq</b>	<b>Ba</b>	<b>Cm</b>	<b>Gr</b>	<b>Ca</b>
<b>Ba</b>	34,379				
<b>Cm</b>	25,543	18,435			
<b>Gr</b>	22,092	34,001	18,350		
<b>Ca</b>	32,845	57,386	18,337	31,177	
<b>Fa</b>	2,496	2,581	2,746	2,703	2,439

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre las seis localidades, mediante el algoritmo *Neighbor-joining* y la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards (1967), dio lugar a un árbol (figura 4.4) donde Faro es la localidad más diferenciada genéticamente; las localidades gallegas no mostraron una separación clara entre ellas y la significación de las ramas resultó baja.

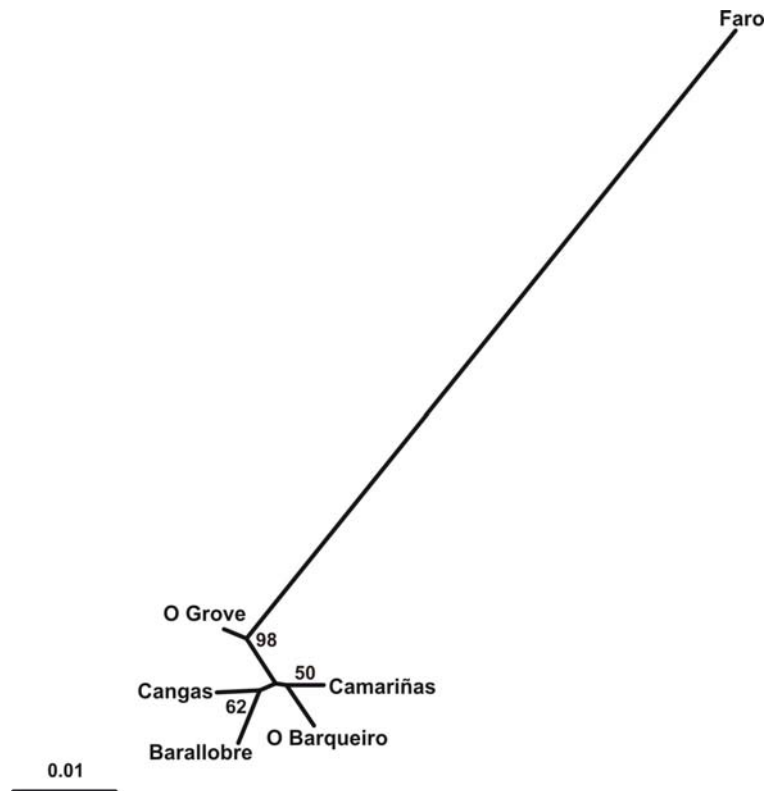


Figura 4.4. Árbol filogenético de las seis localidades de *V. pullastra*, inferido mediante el algoritmo *Neighbour-joining* y la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) calculada a partir de las frecuencias alélicas de 13 *loci* microsatélite. Los números de los nodos indican los valores *bootstrap* obtenidos para 10000 réplicas.

### 4.3. Análisis de poblaciones naturales mediante marcadores mitocondriales

#### 4.3.1. Diversidad genética

El alineamiento de 169 secuencias (24-33 individuos por localidad) del gen 16S mostró 33 sitios variables (26 sustituciones nucleotídicas y siete *gaps*), definiendo un total de 26 haplotipos (anexo II), 17 de los cuales fueron únicos (Tabla 4.XI). Globalmente, el haplotipo 2 fue el más abundante (72%), estando presente en todas las localidades con frecuencias entre 50% y 84,85%. El resto de haplotipos se encontraron en frecuencias inferiores al 6%. La mayoría de los haplotipos (19) fueron privados, en número de dos a seis por localidad, siendo siempre únicos a excepción de los haplotipos 17 y 24 con dos copias en Camariñas y en Faro respectivamente. O Barqueiro y Camariñas fueron las localidades que compartieron un mayor número de haplotipos (7).



Tabla 4.XI. Frecuencia absoluta de los 26 haplotipos del gen 16S en las seis localidades examinadas.

<b>Haplotipo</b>	<b>Bq</b>	<b>Ba</b>	<b>Cm</b>	<b>Gr</b>	<b>Ca</b>	<b>Fa</b>	<b>Global (%)</b>
<b>Hap1</b>	2		1				3 (1,78)
<b>Hap2</b>	19	23	12	28	17	22	121 (72)
<b>Hap3</b>	1		2	2	2	3	10 (5,92)
<b>Hap4</b>	1						1 (0,59)
<b>Hap5</b>	1		2	1			4 (2,37)
<b>Hap6</b>	1		1				2 (1,18)
<b>Hap7</b>	1						1 (0,59)
<b>Hap8</b>	1	2	1		2		6 (3,55)
<b>Hap9</b>	1		1				2 (1,18)
<b>Hap10</b>		1					1 (0,59)
<b>Hap11</b>		1					1 (0,59)
<b>Hap12</b>		1					1 (0,59)
<b>Hap13</b>		1					1 (0,59)
<b>Hap14</b>		1					1 (0,59)
<b>Hap15</b>		1					1 (0,59)
<b>Hap16</b>			1				1 (0,59)
<b>Hap17</b>			2				2 (1,18)
<b>Hap18</b>			1				1 (0,59)
<b>Hap19</b>				1			1 (0,59)
<b>Hap20</b>				1			1 (0,59)
<b>Hap21</b>					1		1 (0,59)
<b>Hap22</b>					1		1 (0,59)
<b>Hap23</b>					1		1 (0,59)
<b>Hap24</b>						2	2 (1,18)
<b>Hap25</b>						1	1 (0,59)
<b>Hap26</b>						1	1 (0,59)

Del gen CitB se analizó un total de 184 secuencias (26-39 individuos por localidad). El alineamiento de las secuencias mostró 20 sitios variables; catorce debidos a sustituciones sinónimas y seis a no sinónimas que afectaron tres posiciones aminoacídicas. Los 20 sitios variables definieron 16 haplotipos (anexo III), siendo nueve únicos. Dos de los haplotipos mostraron frecuencias del 55,98% (haplotipo 2) y del 25,54% (haplotipo 1) y se encontraron en todas las localidades con un rango de frecuencias de 35,71%-76,7% y 10%-42% respectivamente (tabla 4.XII). La frecuencia global de los haplotipos menos representados osciló entre el 0,54% y el 4,89%. Se encontraron haplotipos únicos en todas las localidades, excepto en O Grove, en número de uno a tres por localidad. Cangas y Faro fueron las localidades que compartieron un mayor número de haplotipos (6).

Tabla 4.XII. Frecuencia absoluta de los 16 haplotipos del gen CitB en las seis localidades examinadas.

Haplotipo	Bq	Ba	Cm	Gr	Ca	Fa	Global (%)
Hap1	8	13	8	3	7	8	47 (25,54)
Hap2	14	15	20	23	21	10	103 (55,98)
Hap3	1		1		2	1	5 (2,72)
Hap4	1						1 (0,54)
Hap5	1						1 (0,54)
Hap6	1						1 (0,54)
Hap7		1				1	4 (2,17)
Hap8		1					1 (0,54)
Hap9		1					1 (0,54)
Hap10			1				1 (0,54)
Hap11				2	4	3	9 (4,89)
Hap12				2	1	1	4 (2,17)
Hap13					1		1 (0,54)
Hap14					1	2	3 (1,63)
Hap15						1	1 (0,54)
Hap16						1	1 (0,54)

Del gen COI se obtuvo la secuencia en 182 individuos (22-39 individuos por localidad). El alineamiento de secuencias reveló 47 sitios variables identificándose 31 haplotipos, 25 de ellos únicos (anexo IV). De los 47 sitios, 17 se debieron a sustituciones sinónimas y 30 a sustituciones no sinónimas que afectaron a 25 posiciones aminoacídicas. El haplotipo más frecuente fue el 2 tanto globalmente (73%) como por localidad (72,73%-87,88%); la frecuencia global de los demás varió del 0,55 al 7,14% (tabla 4.XIII). Como en los casos anteriores se detectaron haplotipos privados (26) en número de dos a siete por localidad, siendo siempre únicos excepto el haplotipo 1, detectado dos veces en O Barqueiro. Las localidades que compartieron más haplotipos fueron O Barqueiro y Cangas (4).

La red de haplotipos construida para cada uno de los genes muestra en todos los casos una estructura estrellada con todos los haplotipos estrechamente relacionados con el más frecuente (figura 4.5). El número de cambios producidos es en general bajo, con sólo un cambio la mayoría de las veces y máximos de cuatro (CitB), cinco (COI) o seis (16S).

Tabla 4.XIII. Frecuencia absoluta de los 31 haplotipos del gen COI en las seis localidades examinadas.

Haplotipo	Bq	Ba	Cm	Gr	Ca	Fa	Global (%)
Hap1	2						2 (1,10)
Hap2	28	29	22	20	18	16	133 (73,08)
Hap3	1						1 (0,55)
Hap4	1	1			2		4 (2,20)
Hap5	1				1	1	3 (1,65)
Hap6	1		2	3	5	2	13 (7,14)
Hap7	1						1 (0,55)
Hap8	1						1 (0,55)
Hap9	1						1 (0,55)
Hap10	1						1 (0,55)
Hap11	1						1 (0,55)
Hap12		1					1 (0,55)
Hap13		1					1 (0,55)
Hap14		1					1 (0,55)
Hap15			1				1 (0,55)
Hap16			1				1 (0,55)
Hap17			1				1 (0,55)
Hap18			1				1 (0,55)
Hap19				1			1 (0,55)
Hap20				1			1 (0,55)
Hap21				1		1	2 (1,10)
Hap22				1			1 (0,55)
Hap23				1			1 (0,55)
Hap24				1			1 (0,55)
Hap25				1			1 (0,55)
Hap26					1		1 (0,55)
Hap27					1		1 (0,55)
Hap28					1		1 (0,55)
Hap29					1		1 (0,55)
Hap30						1	1 (0,55)
Hap31						1	1 (0,55)

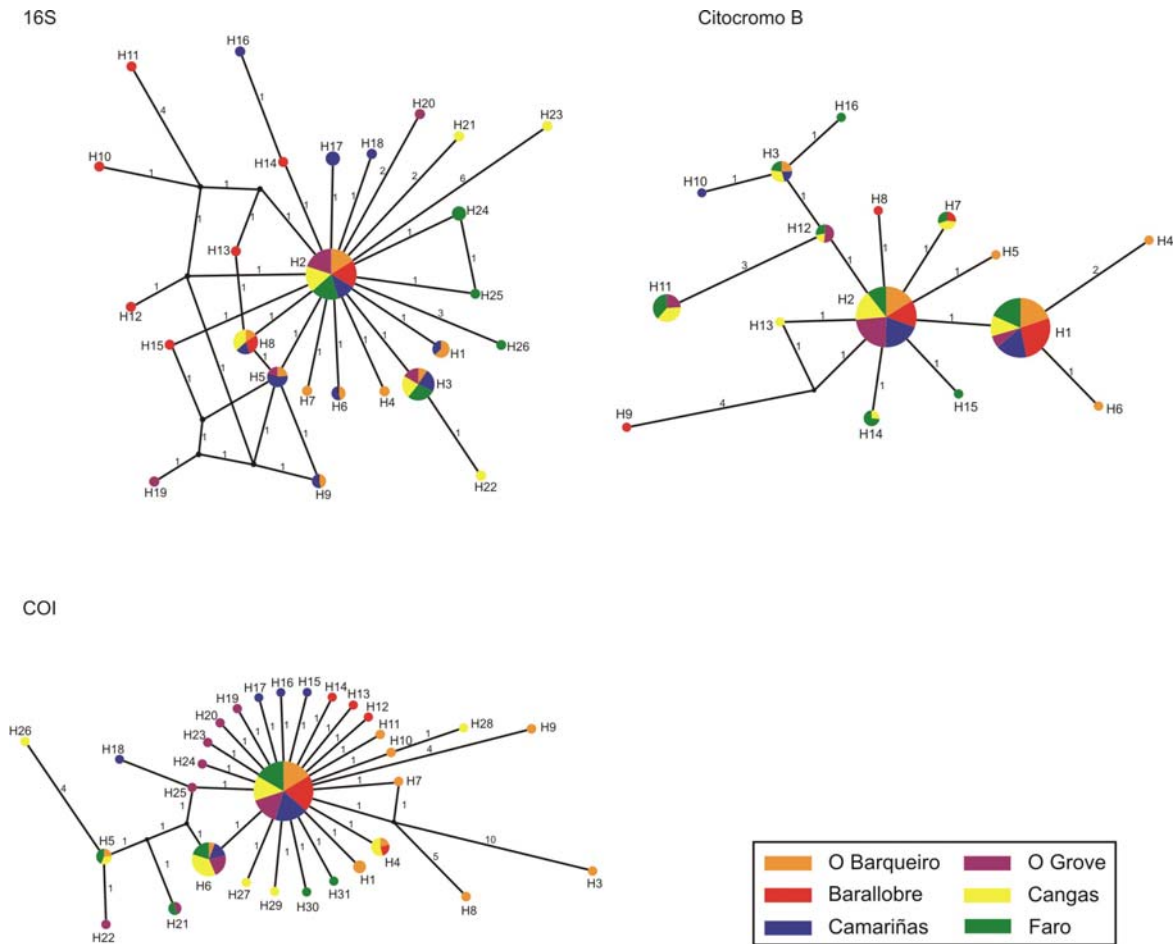


Figura 4.5. Árboles de redes con las relaciones inferidas entre los haplotipos de los genes 16S, CitB y COI. Los números representados en las ramas indican el número de cambios que dieron lugar al haplotipo. El tamaño de los círculos representa la frecuencia de cada haplotipo. Los círculos negros indican haplotipos intermedios no presentes en la muestra.

El análisis de la diversidad genética se realizó también combinando las secuencias obtenidas de los tres genes (1267 pb). Se alinearon 106 secuencias (11-25 por localidad), detectándose 68 sitios variables y 44 haplotipos diferentes (anexo V). Como en el análisis individual, la mayoría de los haplotipos fueron únicos (37) y privados (38). Los haplotipos 3 y 4 fueron los más abundantes globalmente (37% y 20%) y por localidad (30%-52,17% y 6,25%-28,5%, respectivamente); ninguno de los demás superó el 4% respecto al total de haplotipos (tabla 4.XIV). Igualmente, los haplotipos privados se distribuyeron entre todas las localidades (de 3 a 10 por localidad) siempre en una copia, excepto el haplotipo 25, presente en dos individuos de Camariñas. La red de haplotipos evidencia dos haplogrupos con estructura de estrella interconectados y centrados en los haplotipos más frecuentes 3 y 4 (figura 4.6).

Tabla 4.XIV. Frecuencia absoluta de los 44 haplotipos resultantes de la combinación de los tres genes en las seis localidades examinadas.

Haplotipo	Bq	Ba	Cm	Gr	Ca	Fa	Global (%)
Hap1	1						1 (0,94)
Hap2	1						1 (0,94)
Hap3	4	8	5	12	3	7	39 (36,79)
Hap4	1	6	1	2	2	6	18 (16,98)
Hap5	1				1		2 (1,89)
Hap6	1						1 (0,94)
Hap7	1						1 (0,94)
Hap8	1						1 (0,94)
Hap9	1						1 (0,94)
Hap10	1						1 (0,94)
Hap11	1						1 (0,94)
Hap12	1						1 (0,94)
Hap13	1						1 (0,94)
Hap14		1					1 (0,94)
Hap15		1					1 (0,94)
Hap16		1					1 (0,94)
Hap17		1					1 (0,94)
Hap18		1					1 (0,94)
Hap19		1					1 (0,94)
Hap20		1					1 (0,94)
Hap21		1					1 (0,94)
Hap22		1					1 (0,94)
Hap23		1					1 (0,94)
Hap24		1			1		2 (1,89)
Hap25			2				2 (1,89)
Hap26			1				1 (0,94)
Hap27			1				1 (0,94)
Hap28			1				1 (0,94)
Hap29				1			1 (0,94)
Hap30				2		2	4 (3,77)
Hap31				1			1 (0,94)
Hap32				1		1	2 (1,89)
Hap33				1			1 (0,94)
Hap34				1			1 (0,94)
Hap35				1			1 (0,94)
Hap36				1			1 (0,94)
Hap37					1		1 (0,94)
Hap38					1		1 (0,94)
Hap39					1		1 (0,94)
Hap40						1	1 (0,94)

Tabla 4.XIV. Continuación.

Haplotipo	Bq	Ba	Cm	Gr	Ca	Fa	Global
<b>Hap41</b>						1	1 (0,94)
<b>Hap42</b>						1	1 (0,94)
<b>Hap43</b>						1	1 (0,94)
<b>Hap44</b>						1	1 (0,94)

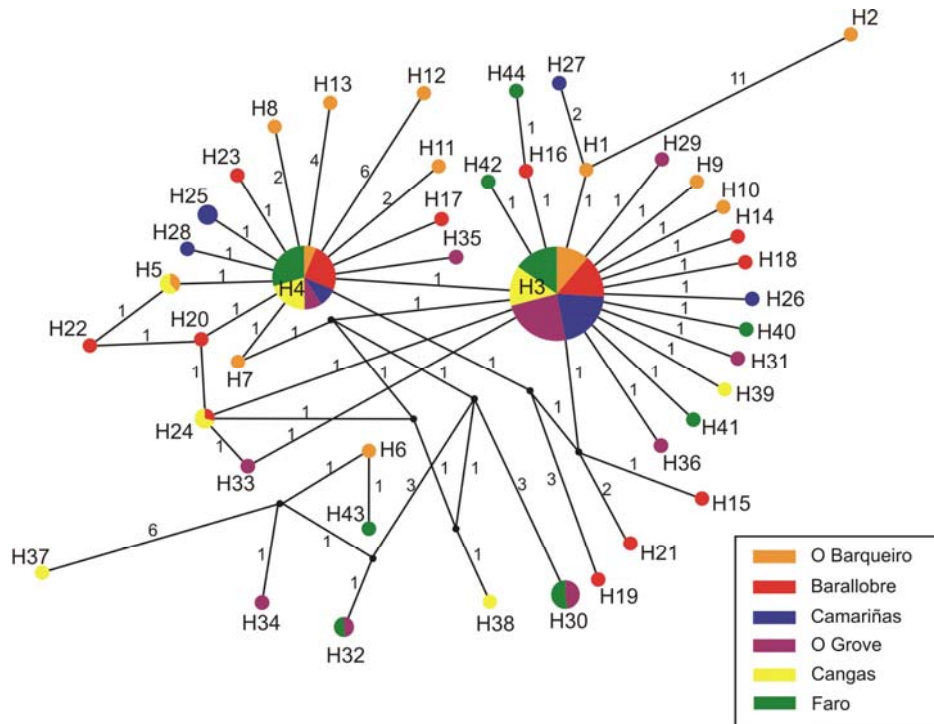


Figura 4.6. Árboles de redes con las relaciones inferidas entre los haplotipos de la combinación de los tres genes. Los números representados en las ramas indican el número de cambios que dieron lugar al haplotipo. El tamaño de los círculos representa la frecuencia de cada haplotipo. Los círculos negros indican haplotipos intermedios no presentes en la muestra.

La tabla 4.XV muestra los valores de diversidad genética medida como diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica en las seis localidades estudiadas. Globalmente, la diversidad haplotípica revelada individualmente por cada gen fue moderada (16S: 0,483; CitB: 0,620; COI: 0,462) pero alta en la combinación de los tres genes (0,838). La mayor parte de las localidades tienen una diversidad haplotípica similar aunque cabe resaltar ciertas diferencias. O Grove y Camariñas destacan por tener una diversidad haplotípica en el gen 16S relativamente baja (0,282) y alta (0,750), respectivamente. O Grove también tiene la diversidad haplotípica más baja (0,407) en el CitB pero es Faro la localidad con los valores más altos (0,796). Barallobre con valores bajos (0,231) y Cangas con valores moderados (0,623) son las localidades que marcan

el rango de diversidad haplotípica en el COI. Todas las localidades tienen valores altos de diversidad haplotípica en las secuencias combinadas pero una vez más O Grove refleja el valor más bajo. Mediante un procedimiento de remuestreo se calculó para cada localidad el valor medio de diversidad haplotípica y su intervalo de confianza (figura 4.7). En todos los casos los intervalos de confianza se solapan indicando niveles similares de diversidad, excepto en las comparaciones del CitB de Faro con Camariñas y O Grove, ambas localidades gallegas con menor diversidad haplotípica. Respecto a la diversidad nucleotídica, todas las localidades muestran valores bajos y similares (0,001-0,006), excepto Barallobre que tiene un valor de un orden de magnitud menor en el COI. Al aplicar el mismo procedimiento de remuestreo a la diversidad nucleotídica, todos los intervalos de confianza de las medias mostraron solapamiento excepto en la comparación del 16S de Camariñas y Faro, teniendo la localidad portuguesa el valor más bajo (figura 4.8).

Tabla 4.XV. Estimaciones de diversidad genética en 16S, CitB, COI y en la combinación de secuencias de los tres genes.

Gen	16S				CitB				
	Localidad	n	Nh	<i>h</i>	$\pi$	n	Nh	<i>h</i>	$\pi$
<b>Bq</b>		28	9	0,545	0,002	26	6	0,634	0,003
<b>Ba</b>		31	8	0,454	0,002	31	6	0,633	0,003
<b>Cm</b>		24	10	0,750	0,003	30	4	0,499	0,002
<b>Gr</b>		33	5	0,282	0,001	30	4	0,407	0,003
<b>Ca</b>		24	6	0,500	0,003	39	8	0,678	0,005
<b>Fa</b>		29	5	0,421	0,001	28	9	0,796	0,006
<b>TOTAL</b>		169	26	0,483	0,002	184	16	0,620	0,004
Gen	COI				Sec. Combinadas				
	Localidad	n	Nh	<i>h</i>	$\pi$	n	Nh	<i>h</i>	$\pi$
<b>Bq</b>		39	11	0,489	0,003	16	13	0,950	0,004
<b>Ba</b>		33	5	0,231	0,0004	25	13	0,857	0,002
<b>Cm</b>		28	6	0,386	0,001	11	6	0,800	0,001
<b>Gr</b>		30	9	0,556	0,002	23	10	0,731	0,002
<b>Ca</b>		30	8	0,623	0,003	10	7	0,911	0,003
<b>Fa</b>		22	6	0,476	0,002	21	9	0,824	0,002
<b>Total</b>		182	31	0,462	0,002	106	44	0,838	0,002

n: número de individuos analizados; Nh: número de haplotipos encontrados; *h*: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica.

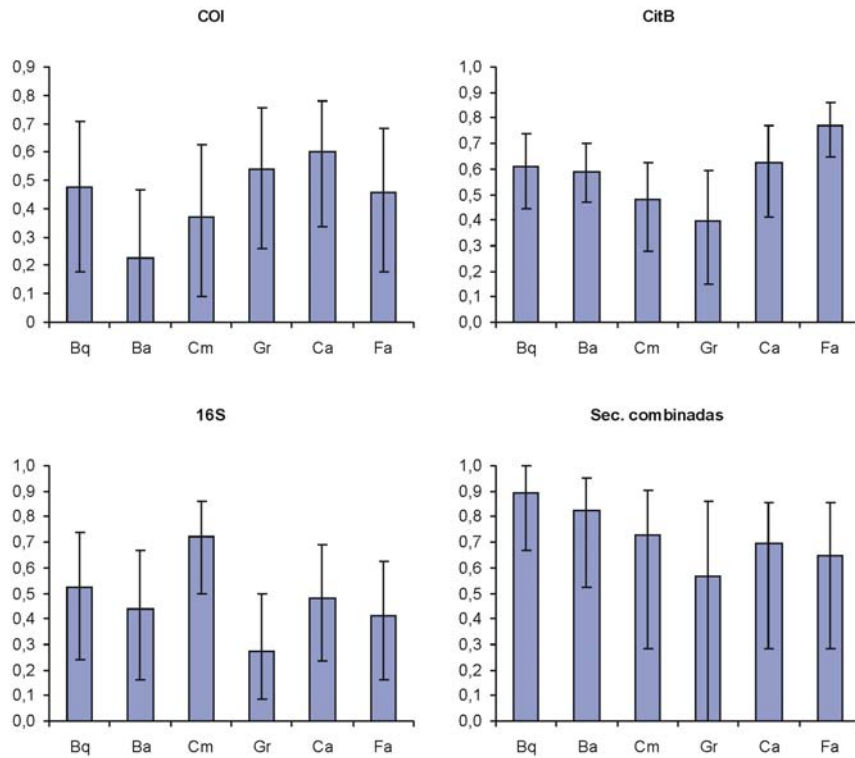


Figura 4.7. Intervalos de confianza de las medias de diversidad haplotípica.

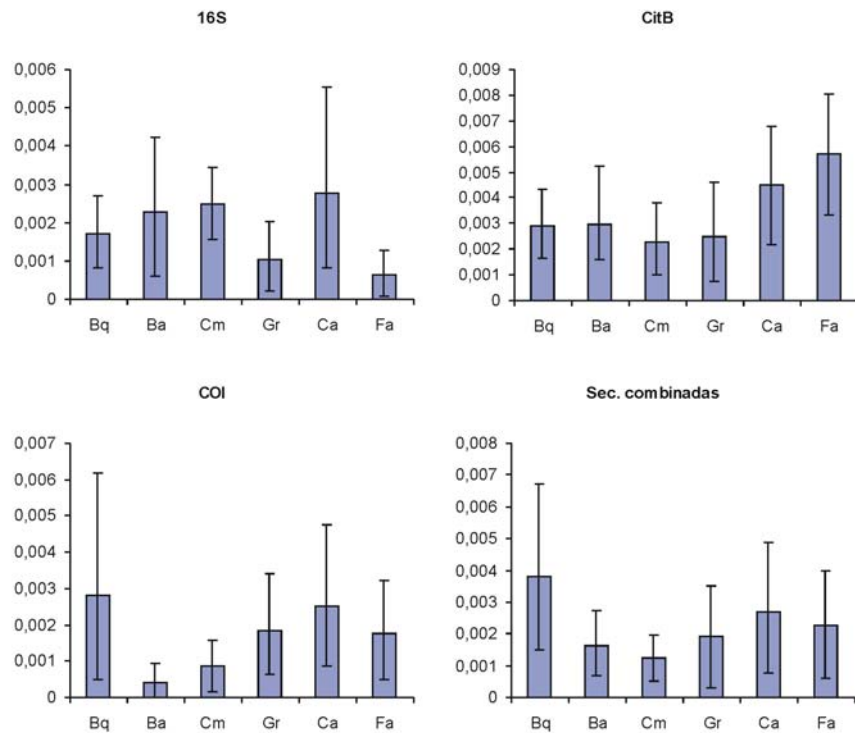


Figura 4.8. Intervalos de confianza de las medias de diversidad nucleotídica.



La tabla 4.XVI contiene los valores obtenidos con el test  $F_s$  de Fu y  $R_2$ . Tanto para cada gen como para las secuencias combinadas, los valores de  $F_s$  fueron siempre negativos. Para  $R_2$  todos los valores son bajos. Conjuntamente ambos tests indican la existencia de expansión poblacional.

Tabla 4.XVI. Tests  $F_s$  y  $R_2$  para los genes 16S, CitB, COI y para la combinación de las secuencias de los tres genes.

Gen	16S		CitB		COI		Sec. Combinadas	
	$F_s$	$R_2$	$F_s$	$R_2$	$F_s$	$R_2$	$F_s$	$R_2$
<b>Bq</b>	-7,591*	0,062*	-1,992	0,089	-4,528*	0,067	-5,559*	0,081*
<b>Ba</b>	-2,956*	0,072*	-0,716	0,118	-4,611*	0,082	-8,311*	0,060*
<b>Cm</b>	-7,556*	0,064*	-0,351	0,094	-4,079*	0,079	-1,923	0,141
<b>Gr</b>	-2,925*	0,079	-0,100	0,081	-5,010*	0,058*	-2,952	0,063*
<b>Ca</b>	-1,580	0,115	-1,899	0,080	-2,531	0,071*	-1,432	0,170
<b>Fa</b>	-1,168	0,103	-2,642	0,088	-2,038	0,072*	-1,581	0,074*
<b>Total</b>	-26,407*	0,022*	-8,594*	0,034	-39,287*	0,018*	-45,356*	0,022*

(\*) Significativo con  $\alpha=0,05$ .

### 4.3.2. Diferenciación poblacional

El análisis molecular de la varianza (AMOVA) indicó en todos los casos que el mayor porcentaje de variación se encuentra dentro de las localidades (tabla 4.XVII). Los valores del índice de fijación  $F_{ST}$  obtenidos a partir de los haplotipos de los genes 16S, CitB y COI fueron de 0,014, 0,030 y 0,010 respectivamente, siendo significativamente distintos de cero para CitB ( $F'_{ST} = 0,076$ ). El valor  $F_{ST}$  para la combinación de los tres genes fue 0,003, y no resultó significativamente distinto de cero.

El cálculo del índice  $F_{ST}$  por pares de localidades para el CitB se refleja en la tabla 4.XVIII. Tras la corrección secuencial de Bonferroni, resultaron significativos los pares de localidades Barallobre-O Grove y O Grove-Faro.

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre las seis localidades mediante el algoritmo *Neighbour-joining* y la distancia Cavalli-Sforza y Edwards (1967) se muestra en la figuras 4.9-4.12. En todos los casos la significación de las ramas

fue elevada, con valores *bootstrap* del 100%. Con el gen 16S se obtuvo un árbol donde Barallobre y Camariñas son las localidades más distantes filogenéticamente (figura 4.9), sin embargo las demás localidades no muestran una marcada diferenciación, destacando la agrupación de Faro, la localidad más alejada geográficamente, y O Grove. En el árbol elaborado con el CitB (figura 4.10) las localidades se agrupan en cierta consonancia con la distribución geográfica norte-sur, excepto Barallobre que está más estrechamente relacionada con Camariñas que con O Barqueiro. Los árboles del COI (figura 4.11) y las secuencias combinadas (figura 4.12) muestran igualmente Faro y O Grove como las localidades más estrechamente relacionadas pero globalmente no reflejan una diferenciación filogenética destacable.

Las redes de haplotipos elaboradas (figuras 4.5 y 4.6) no mostraron en ningún caso evidencias de diferenciación poblacional; la mayoría sino todos los haplotipos privados fueron únicos y los haplotipos más frecuentes se encontraron distribuidos en todas las localidades.

Tabla 4.XVII. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) para 16S, CitB, COI y la combinación de los tres genes.

16S				CitB					
Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes varianza	% Variación	Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes varianza	% Variación
Entre localidades	5	1,659	0,003	1,36	Entre localidades	5	2,970	0,010	3,06
Dentro de localidades	163	38,950	0,239	98,64	Dentro de localidades	178	53,775	0,302	96,94
<b>TOTAL</b>	<b>168</b>	<b>40,609</b>	<b>0,242</b>	<b>100</b>	<b>TOTAL</b>	<b>183</b>	<b>56,745</b>	<b>0,312</b>	<b>100</b>
Índice de fijación $F_{ST}$		0,014			Índice de fijación $F_{ST}$			0,030*	
COI				Sec. Combinadas					
Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes varianza	% Variación	Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes varianza	% Variación
Entre localidades	5	1,487	0,002	0,98	Entre localidades	5	2,185	0,001	0,26
Dentro de localidades	176	40,293	0,229	99,02	Dentro de localidades	100	41,787	0,418	99,74
<b>TOTAL</b>	<b>181</b>	<b>41,780</b>	<b>0,231</b>	<b>100</b>	<b>TOTAL</b>	<b>105</b>	<b>43,972</b>	<b>0,419</b>	<b>100</b>
Índice de fijación $F_{ST}$		0,010			Índice de fijación $F_{ST}$			0,003	

gl: grados de libertad. \*Significativo para  $\alpha=0,05$ .

Tabla 4.XVIII. Valores  $F_{ST}$  por pares de localidades para el CitB. Sobre la diagonal  $F_{ST}$ , bajo la diagonal  $F'_{ST}$ .

	<b>Bq</b>	<b>Ba</b>	<b>Cm</b>	<b>Gr</b>	<b>Ca</b>	<b>Fa</b>
<b>Bq</b>	—	-0,016	-0,015	0,067*	-0,005	0,004
<b>Ba</b>	0	—	0,023	0,136**	0,031	0,007
<b>Cm</b>	0	0,051	—	0,020	0,004	0,055*
<b>Gr</b>	0,139	0,276	0,037	—	0,030	0,128**
<b>Ca</b>	0	0,086	0,011	0,067	—	0,004
<b>Fa</b>	0,015	0,025	0,155	0,319	0,014	—

(\*) Significativo con  $\alpha=0,05$ . (\*\*) Significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni.

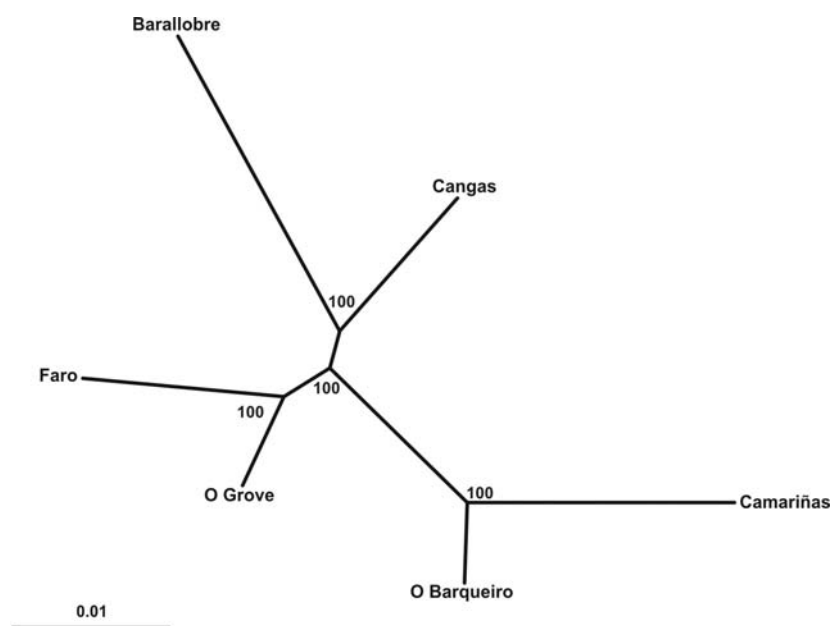


Figura 4.9. Árbol filogenético inferido mediante el algoritmo *Neighbour-joining* a partir de las frecuencias haplotípicas del 16S. Los números de los nodos indican los valores *bootstrap* obtenidos para 10000 réplicas.

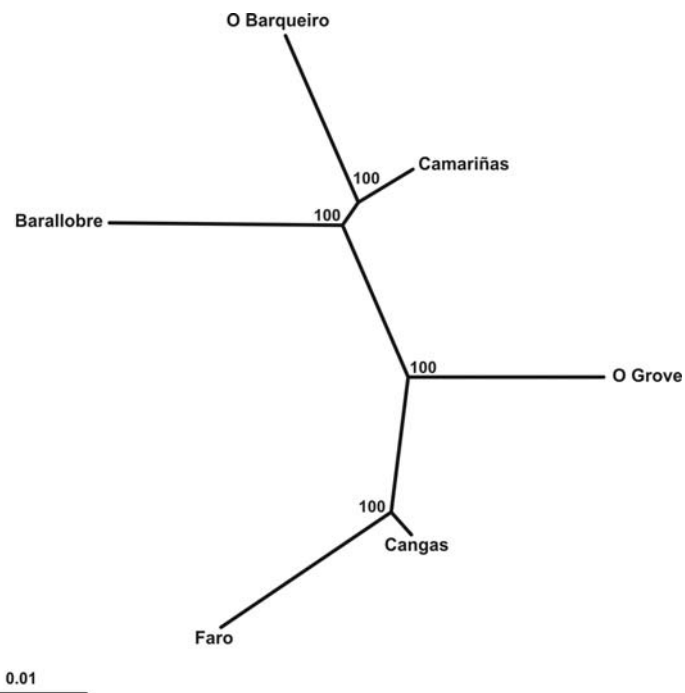


Figura 4.10. Árbol filogenético inferido mediante el algoritmo *Neighbour-joining* a partir de las frecuencias haplotípicas del CitB. Los números de los nodos indican los valores *bootstrap* obtenidos para 10000 réplicas.

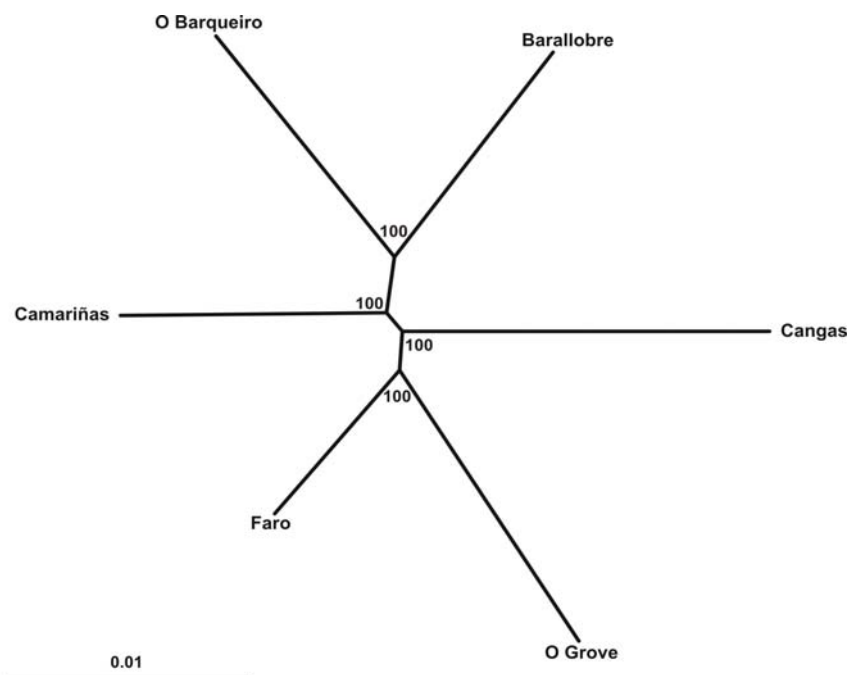


Figura 4.11. Árbol filogenético inferido mediante el algoritmo *Neighbour-joining* a partir de las frecuencias haplotípicas del COI. Los números de los nodos indican los valores *bootstrap* obtenidos para 10000 réplicas.

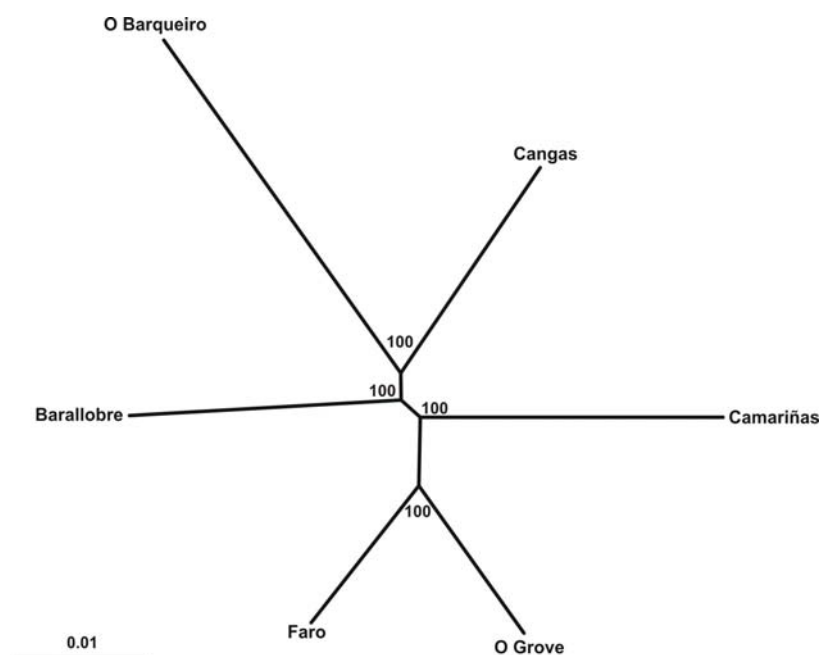


Figura 4.12. Árbol filogenético inferido mediante el algoritmo *Neighbour-joining* a partir de las frecuencias haplotípicas obtenidas de la combinación de los tres genes. Los números de los nodos indican los valores *bootstrap* obtenidos para 10000 réplicas.

#### 4.4. Análisis genético del proceso de obtención de semilla en criadero

Para evaluar el impacto genético del proceso de obtención de semilla en criadero se utilizó un lote de reproductores (139 individuos: 72 machos y 67 hembras) de Barallobre y una muestra de la semilla producida (150 individuos). Dado que en los criaderos es habitual que la semilla se separe en función del tamaño, la semilla analizada se distribuyó en tres clases de talla: grande ( $\geq 4,5$  mm), mediana (2,5-4,5 mm) y pequeña ( $\leq 2,5$  mm). Los análisis se realizaron considerando tanto el total como los tres grupos de semilla.

##### 4.4.1. Asignación de paternidades y estimas de parentesco

La asignación de paternidades se llevó a cabo con 13 *loci* microsatélite, descartándose cinco de los *loci* incluidos en las PCR *multiplex* (VpTE-228, VpAT1-85, VpAT1-92, VpAC1-23 y VpAT2-36) por detectarse alelos nulos a frecuencias altas (0,439-0,610) con el programa CERVUS. La tabla 4.XIX muestra las características de los *loci* usados en el lote de reproductores (N=139). El número medio de alelos por *locus* fue de 8,46, la heterocigosidad observada y esperada de 0,493 y 0,535, respectivamente, y el contenido medio en información del polimorfismo de 0,497.

Aunque el nivel de variabilidad genética fue moderado y el potencial de exclusión por *locus* bajo, se obtuvieron potenciales de exclusión combinados altos tanto para el de exclusión 1 (0,954) y como para el de exclusión 2 (0,997).

Tabla 4.XIX. Características de los 13 microsatélites analizados en el lote de reproductores.

<b>Locus</b>	<b>Na</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>PIC</b>	<b>Exclusión 1</b>	<b>Exclusión 2</b>
<b>VpAT1-6</b>	9	0,550	0,643	0,594	0,237	0,405
<b>VpAC2-34b</b>	15	0,394	0,459	0,447	0,124	0,295
<b>VpAT1-54</b>	9	0,697	0,756	0,719	0,364	0,542
<b>VpAT1-36</b>	9	0,428	0,369	0,349	0,072	0,207
<b>VpAT2-74</b>	7	0,367	0,361	0,329	0,066	0,187
<b>VpAT1-35</b>	5	0,063	0,075	0,074	0,003	0,038
<b>VpAT1-67</b>	7	0,515	0,447	0,416	0,106	0,254
<b>VpTE-139</b>	5	0,631	0,706	0,657	0,286	0,460
<b>VpAC1-59b</b>	7	0,439	0,448	0,412	0,103	0,247
<b>VpAT2-8a</b>	16	0,571	0,854	0,837	0,547	0,709
<b>VpAT2-30</b>	9	0,489	0,673	0,629	0,264	0,439
<b>VpAT2-4</b>	9	0,756	0,672	0,614	0,257	0,419
<b>VpTE-181</b>	3	0,509	0,486	0,382	0,118	0,199
<b>Global</b>	8,46	0,493	0,535	0,497	0,954	0,997

Na: número de alelos; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada; PIC: contenido de información de polimorfismo y potenciales de exclusión 1 y 2.

En la simulación realizada previamente a la asignación real del global de semilla, se obtuvo un poder de asignación del 73% y 100% para un nivel de confianza del 95% y del 80%, respectivamente. En la asignación real, los porcentajes fueron más bajos: 37% y 97%. En los grupos de semilla, la asignación se repartió de la siguiente manera: 56% y 100% para el grupo de semilla grande; 42% y 98% para el grupo de semilla mediana; 27,40% y 95% para grupo de semilla pequeña, según el nivel de confianza considerado.

En la tabla 4.XX se detallan el porcentaje de padres y madres que participaron en la reproducción (progenitores), así como el número medio y el rango de descendientes y las familias detectadas. La contribución de padres y madres a la descendencia se encuentra representada en las figuras 4.13 y 4.14 respectivamente. Atendiendo a los padres identificados no todos los individuos del lote de reproductores participaron en la reproducción pero el porcentaje observado fue relativamente alto (padres 73,61%; madres 74,63%). Tanto el lote de reproductores como los progenitores identificados tenían un número de machos y hembras equilibrado, y el número medio de hijos resultó similar en los dos sexos aunque la varianza del número medio de hijos y el

rango del número de hijos, fueron ligeramente superiores en las hembras. Una proporción relativamente elevada de padres (67,93%) y madres (66%) que contribuyeron a la descendencia lo hicieron con dos o más descendientes. De 4824 posibles familias se detectaron únicamente 137 pero la contribución resultó igualada, 130 (94,89%) dieron lugar a un descendiente y sólo siete a dos descendientes.

Tabla 4.XX. Participación de padres y madres en la reproducción.

	<b>N<sub>R</sub></b>	<b>N<sub>P</sub> (%)</b>	<b>Md</b>	<b>Var</b>	<b>Rd</b>
<b>Padres</b>	72	53 (73,61%)	2,74	3,313	1-8
<b>Madres</b>	67	50 (74,63%)	2,90	5,724	1-11
<b>Familias</b>	4824*	137	1,06	0,055	1-2

N<sub>R</sub>: número de reproductores; N<sub>P</sub>: número (porcentaje) de progenitores identificados; Md: número medio de descendientes; Var: varianza del número medio de descendientes; Rd: rango del número de descendientes. (\*) familias potenciales.

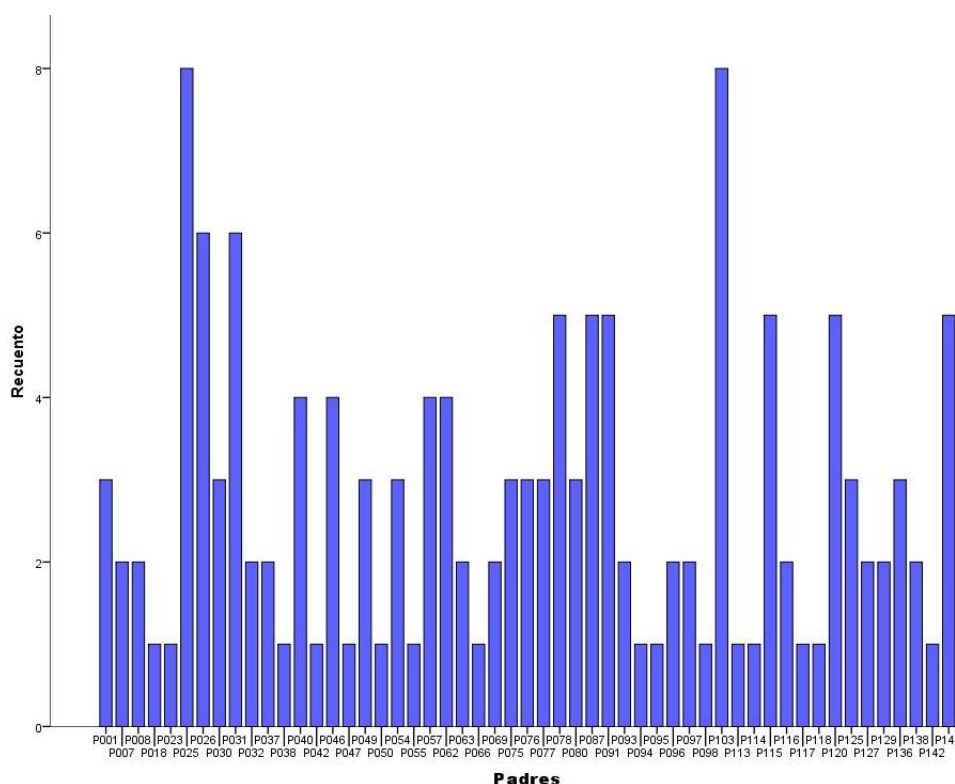


Figura 4.13. Contribución a la semilla de los padres identificados.



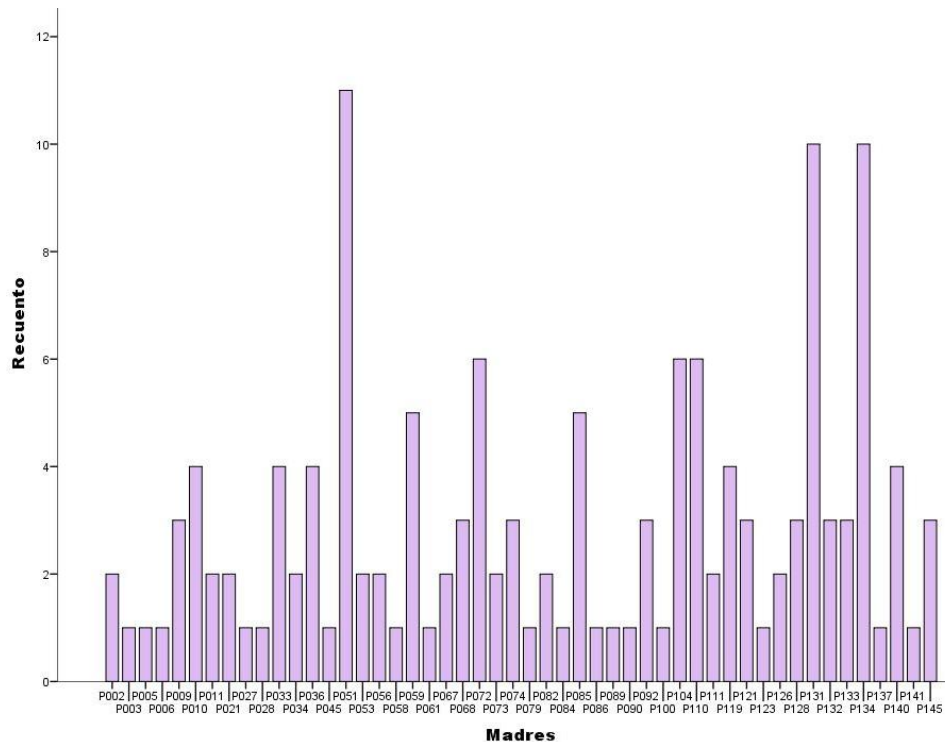


Figura 4.14. Contribución a la semilla de las madres identificadas.

Mediante una prueba de  $\chi^2$  se averiguó si los progenitores habían contribuido por igual a la descendencia tanto al global como en cada grupo de tamaño. En global, la contribución de los machos fue igualitaria pero la de las hembras fue significativamente distinta ( $\chi^2 = 96,72$ ,  $P < 0,05$ ). Al realizar la prueba para cada grupo de tamaño, los machos mostraron igual contribución en los tres casos y las hembras diferencias significativas en el grupo de semilla pequeña ( $\chi^2 = 54,14$ ,  $P < 0,05$ ).

Para conocer si los progenitores contribuyeron por igual a cada grupo de tamaño se elaboraron dos tablas de contingencia (una por sexo) incluyendo solamente los progenitores que habían contribuido a la semilla con tres o más descendientes. Al testar la hipótesis de contribución igualitaria, los machos mostraron diferencias significativas ( $\chi^2 = 61,81$ ,  $P < 0,05$ ). Mediante un método de remuestreo se identificaron tres machos responsables de la contribución diferencial: dos que contribuyeron significativamente más al grupo de semilla pequeña (P25 y P103) y otro (P40) que lo hizo al grupo de semilla mediana. En el caso de las madres, la contribución a los tres grupos de tamaño no fue significativamente distinta.

Asumiendo que la semilla grande y mediana pueden representar descendientes de crecimiento rápido y la semilla pequeña descendientes de crecimiento lento, se

repitearon los análisis agrupando la semilla grande y mediana. De nuevo se detectaron diferencias significativas en la contribución de las hembras dentro del grupo de semilla de crecimiento lento. Por otra parte, la contribución de los machos a cada uno de los dos grupos fue significativamente distinta ( $\chi^2 = 43,75$ ,  $P < 0,05$ ), siendo P25 y P103 los responsables de la contribución desigual. También las hembras contribuyeron de manera desigual; una hembra (P51) contribuyó significativamente más a la semilla pequeña y otra (P85) al grupo de crecimiento rápido.

Se calculó el coeficiente de parentesco para los progenitores obteniéndose un valor de -0,007, que indica que los padres no están relacionados entre sí. Este coeficiente se calculó también para el total de la semilla y los tres grupos de tamaño; los valores obtenidos fueron cero o próximos a cero en la semilla total, grande y mediana pero del orden del esperado para medios hermanos en la semilla pequeña (0,261).

#### **4.4.2. Tamaño efectivo de reproductores y tasa de endogamia**

El tamaño efectivo, considerando que todos los individuos del lote de reproductores (N=139) han contribuido por igual a la descendencia, fue prácticamente igual al tamaño censal, lo que supondría un incremento de endogamia por generación del 0,36%. Al considerar sólo los individuos que han participado en la reproducción (progenitores), el tamaño efectivo fue 103 y el incremento de la endogamia 0,49%. Teniendo en cuenta la contribución diferencial de padres y madres, el tamaño efectivo fue 84, lo que supone un 40% de reducción respecto al número de individuos del lote de reproductores. El incremento de endogamia en este caso fue de 0,60%.

#### **4.4.3. Diversidad y diferenciación genética de la semilla vs reproductores/progenitores vs poblaciones naturales**

Se genotiparon 18 *loci* microsatélite en el lote de 139 progenitores y 150 individuos de la semilla producida para comparar su diversidad tanto entre sí como con la muestra recogida en 2008 en la misma localidad que los reproductores (Barallobre), referida en adelante como población natural. La tabla 4.XXI muestra los valores obtenidos para los diferentes parámetros de diversidad. Tanto el lote de reproductores como los progenitores identificados y el total de la semilla mostraron un número medio de alelos por *locus* (8,110-9,056) superior al de la población natural (6,500) debido probablemente a que el tamaño de muestra de la población natural fue menor. Veintitrés

alelos observados en los progenitores no aparecieron en la semilla y, por otro lado, nueve alelos observados en la semilla no se encontraron en los progenitores. En términos de riqueza alélica media, las tres muestras tienen valores similares, encontrándose los valores más altos del rango en el lote de reproductores (6,497)/progenitores (6,493) y los más bajos en la población natural (5,794). Las tres clases de semilla, con un tamaño de muestra más similar al de la población natural, tienen también un número medio de alelos equivalente a ésta. En la comparación población natural-progenitores-grupos de semilla, la riqueza alélica media osciló entre 5,540 (progenitores) y 4,633 (semilla pequeña). Respecto a la heterocigosidad observada y esperada, todas las muestras reflejaron valores cercanos (0,392-0,436 y 0,503-0,578, respectivamente).

Tabla 4.XXI. Diversidad genética de la población natural, reproductores/progenitores y semilla.

	Población natural	Reproductores			Semilla		
		Lote	Progenitores	Total	Grande	Mediana	Pequeña
<b>N</b>	50	139	103	150	32	44	69
<b>Na</b>	6,500	9,056	8,556	8,110	6,056	6,278	6,333
<b>Rs<sub>1</sub></b>	5,794	6,497	—	6,024	—	—	—
<b>Rs<sub>2</sub></b>	5,794	—	6,493	6,024	—	—	—
<b>Rs<sub>3</sub></b>	5,029	—	5,540	—	5,207	5,016	4,633
<b>Ho</b>	0,392	0,427	0,428	0,421	0,419	0,436	0,400
<b>He</b>	0,572	0,578	0,577	0,562	0,577	0,560	0,503

Ba: Barallobre; N: número de individuos; Na: número medio de alelos, Rs: riqueza alélica calculada en base a: Rs<sub>1</sub>: 27, Rs<sub>2</sub>:27 y Rs<sub>3</sub>: 16 individuos; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada.

Al aplicar el test de Friedman a los valores de riqueza alélica y heterocigosidad observada y esperada de las muestras, no se encontraron diferencias significativas en la comparación población natural-lote de reproductores-semilla total ni en la comparación población natural-progenitores-semilla total. Sin embargo, al hacer la comparación población natural-progenitores-grupos de semilla se detectaron diferencias significativas en la riqueza alélica. En el test *post hoc* realizado las diferencias significativas se encontraron en dos de los grupos de tamaño (mediana y pequeña) frente a sus progenitores.

Los análisis de desequilibrio de ligamiento dieron resultados diferentes en progenitores, semilla y población natural. Mientras que en el caso de los progenitores y la población natural no se encontró desequilibrio de ligamiento para ningún par de *loci*,

en el caso de la semilla, cuatro parejas mostraron desequilibrio de ligamiento tras la corrección secuencial de Bonferroni (VpAT1-85 y VpAT2-30; VpAT2-8a y VpAT1-92; VpAT2-8a y VpAT2-4; VpAT2-8a y VpTE81). En el análisis por grupos de semilla, tras la corrección secuencial de Bonferroni, el desequilibrio de ligamiento se detectó únicamente en la semilla pequeña en consonancia con un valor alto en el coeficiente de parentesco.

Además de comparar la diversidad genética, se evaluó la diferenciación genética de reproductores/progenitores y semilla total/grupos de semilla respecto a todas las muestras tomadas del medio natural en base a 13 *loci* microsatélite (VpAT1-6, VpAC2-34b, VpAT1-54, VpAT1-36, VpAT2-74, VpAT1-35, VpAT1-67, VpTE-139, VpAC1-59b, VpAT2-30, VpAT2-36, VpAT2-4 y VpTE-181). La tabla 4.XXII indica los valores  $F_{ST}$  de las comparaciones realizadas. Ni el lote de reproductores ni los progenitores identificados mostraron diferencias significativas con la población natural, después de la corrección secuencial de Bonferroni. Lo mismo ocurre al comparar con el resto de localidades gallegas, excepto con O Barqueiro que muestra una diferenciación baja ( $F'_{ST}= 0,020-0,021$ ) pero significativa. Por tanto, globalmente los reproductores y progenitores pueden considerarse una muestra representativa de los individuos del medio natural.

Aunque el total de la semilla resulta significativamente distinta al lote de reproductores y a todas las localidades, el valor de  $F_{ST}$  estandarizado no excede el 5% en el contexto de la costa gallega. La semilla grande y mediana constituyen un grupo homogéneo tanto entre sí como con sus progenitores y muestras de las poblaciones naturales, excepto con la de O Barqueiro. La semilla pequeña difiere significativamente de todas las muestras comparadas: progenitores ( $F'_{ST}= 0,032$ ), semilla grande ( $F'_{ST}= 0,054$ ) y mediana ( $F'_{ST}= 0,030$ ) y poblaciones naturales de Galicia ( $F'_{ST}= 0,051-0,062$ ), pero el grado de diferenciación, aunque superior a las comparaciones anteriores, resulta bajo. De los tres grupos de semilla, la de tamaño mediano destaca por no mostrar diferencias significativas con ninguna de las muestras de las localidades gallegas. Como cabría esperar, por la elevada diferenciación detectada previamente en el análisis de las localidades, todas las comparaciones que incluyeron Faro mostraron siempre niveles muy altos de diferenciación genética ( $F'_{ST}= 0,447-0,472$ ).

Tabla 4XXII. Valores  $F_{ST}$  por pares de muestras. Sobre la diagonal valores  $F_{ST}$ ; bajo la diagonal  $F'_{ST}$ .

	LR	Progenitores	Total	Semilla		Pequeña	Bq	Ba	Cm	Gr	Ca	Fa
				Grande	Mediana							
<b>LR</b>	—		0,006**	0,003	0,002	0,021**	0,010**	0,005*	0,006*	0,005*	0,003	0,215**
<b>Progenitores</b>		—	0,002	0,002	-0,001	0,016**	0,010**	0,004	0,006*	0,004	0,003	0,211**
<b>Total</b>	0,012	0,005	—	—	-0,005	0,028**	0,019**	0,016*	0,011**	0,015**	0,015**	0,219**
<b>Grande</b>	0,007	0,004	0	0	—	0,016**	0,011*	0,009*	0,004	0,009*	0,008*	0,213**
<b>Mediana</b>	0,003	0	0,032	0,054	0,030	—	0,032**	0,032**	0,027**	0,031**	0,033**	0,233**
<b>Pequeña</b>	0,041	0,032	0,035	0,039	0,023	0,061	—	—	—	—	—	—
<b>Bq</b>	0,021	0,020	0,032	0,033	0,018	0,062	—	—	—	—	—	—
<b>Ba</b>	0,010	0,008	0,022	0,022	0,008	0,051	—	—	—	—	—	—
<b>Cm</b>	0,012	0,013	0,030	0,025	0,018	0,060	—	—	—	—	—	—
<b>Gr</b>	0,010	0,008	0,029	0,023	0,016	0,062	—	—	—	—	—	—
<b>Ca</b>	0,007	0,006	0,453	0,450	0,447	0,472	—	—	—	—	—	—
<b>Fa</b>	0,454	0,465	0,453	0,450	0,447	0,472	—	—	—	—	—	—

LR: Lote de reproductores. (\*) Significativo con  $\alpha=0,05$ . (\*\*) Significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni.

El análisis filogenético realizado con las muestras de Galicia indicó que la distancia entre el lote de reproductores/progenitores y la población natural es equivalente a la existente entre las muestras de las otras localidades. También que la semilla, independientemente del grupo de tamaño del que se trate, está más estrechamente relacionada con el lote de reproductores/progenitores que con cualquiera de las muestras de las localidades. No obstante, debe señalarse que los valores *bootstrap* son bajos.

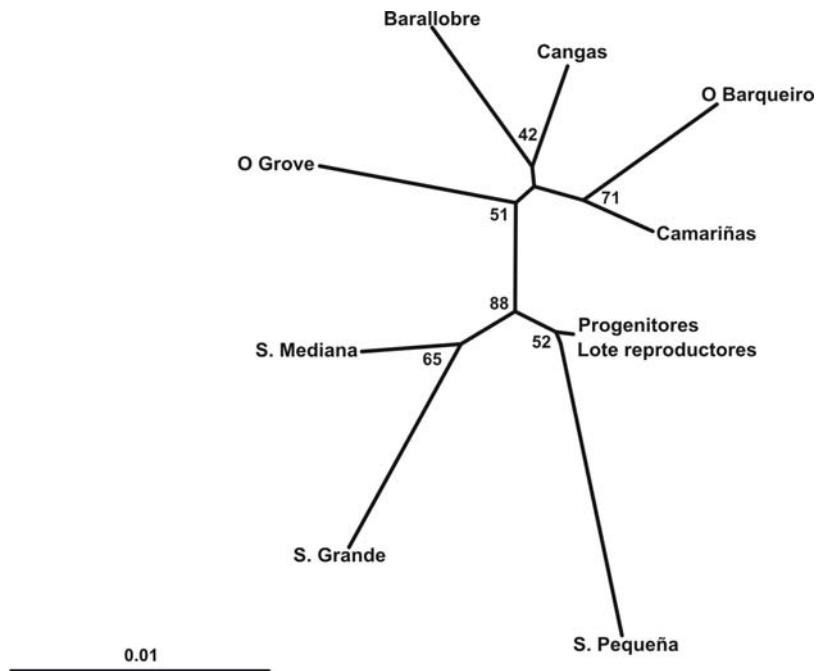


Figura 4.15. Árbol filogenético inferido mediante el algoritmo *Neighbour-joining* a partir de las frecuencias alélicas de 13 *loci* microsatélite. Los números de los nodos indican los valores *bootstrap* obtenidos para 10000 réplicas.

## 5. Discusión





### 5.1. Marcadores microsatélite y mitocondriales

Este trabajo aporta el primer panel de marcadores microsatélite en *V. pullastra*; la construcción de las tres genotecas enriquecidas permitió aislar 24 *loci* polimórficos con patrones de amplificación interpretables, un número que permitió llevar a cabo los análisis de diversidad genética, estructura de población y paternidades planteados en este estudio. Con ello se contribuye a subsanar la necesidad de disponer de marcadores nucleares codominantes para estudios genéticos en esta almeja. Los microsatélites, por su naturaleza multialélica, herencia codominante, pequeña longitud y abundancia en los genomas son marcadores útiles en diversos campos de la biología, incluyendo estudios relacionados con mapeo genético, identificación de individuos, asignación de paternidades, disección de caracteres complejos, genética de poblaciones y genética de la conservación (Chistiakov y col., 2006). Sin embargo, se han descrito en muy pocas especies de almeja. En el contexto de las especies de Veneridae que se encuentran en la costa europea, los esfuerzos para desarrollar este tipo de marcadores se han centrado únicamente en *R. philippinarum* (Yasuda y col., 2007; An y col., 2009).

El método elegido en este trabajo para el aislamiento de microsatélites fue la construcción de genotecas enriquecidas por medio de hibridación selectiva. Se construyeron tres genotecas enriquecidas para dos motivos trinucleotídicos y uno tetranucleotídico. A la vista de los porcentajes de éxito obtenidos (90,3% para ATC, 49,28% para CTGT y 28% para ACC), el motivo ATC parece el más frecuente de los tres. Este motivo resultó también frecuente en otras especies, como el berberecho *Cerastoderma edule* (Martínez y col., 2009) o el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Tóth y col., 2000). No obstante, la frecuencia de cada motivo microsatélite varía entre especies incluso muy cercanas. En un estudio con cinco especies del género *Drosophila* (Ross y col., 2003), el motivo más abundante era AGC en unas especies pero ATC y AAC en otras. Además del motivo, la frecuencia de microsatélites en el genoma varía también entre especies cercanas. Un ejemplo se encuentra en dos especies de la familia *Ostreidae*, mientras en *Ostrea edulis* los microsatélite se encontraron cada 59 kb, en *Crassostrea gigas* el espaciado fue de 172 kb (Cruz y col., 2005).

Aquí se obtuvieron 153 secuencias con al menos un motivo microsatélite. El porcentaje de éxito fue variable entre las tres genotecas construidas (28-90%) pero del orden descrito en otros estudios de bivalvos basados en el mismo método. Yuan y col.

(2010) obtuvieron un 37,3% de éxito en la navaja *Solen grandis* y Liu y col. (2009) un 88,37% en la especie *Atrina pectinata*.

Generalmente, el porcentaje de clones con secuencias microsatélite en una genoteca enriquecida supera en número al encontrado en genotecas genómicas parciales (Tang y col., 2003). Por ejemplo, en el trabajo de Reece y col. (2004) en el que se aislaron microsatélites de *Crassostrea virginica* empleando el método tradicional se obtuvo un éxito de 6,59%. El éxito medio obtenido en nuestro trabajo (59%) fue también superior al obtenido en estudios en los que se aislaron motivos microsatélite a partir de colecciones de ESTs. Wang y col. (2011) obtuvieron un 2,38% de éxito en la almeja *Meretrix meretrix* y Tanguy y col. (2008) 0,4% en *R. decussatus*. Los resultados en otros bivalvos se encuentran alrededor de estos valores (3,63% en *C. gigas*, Yu y Li, 2008; 6,37% en *Mytilus coruscus*, Xu y col., 2010; 0,44% en *M galloprovincialis*, Li y col., 2011). Por tanto, nuestros resultados corroboran que la construcción de genotecas enriquecidas por hibridación selectiva resulta un método eficaz para el aislamiento de marcadores microsatélite.

Las genotecas enriquecidas pueden presentar un alto grado de redundancia (Zane y col., 2002). En nuestro caso, el porcentaje de redundancia encontrado para cada una de las genotecas (24% para ATC, 18% para ACC y 21% para CTGT) es del orden o menor que los descritos en estudios de este tipo (26,9% en *A. pectinata*, Liu y col., 2009; 40% en *Aequipecten opercularis*, Arias y col., 2010). También fue menor que el obtenido con otras metodologías de aislamiento de microsatélites. En un estudio basado en RAPDs en *Pecten yessoensis* se obtuvo un 71,83% de redundancia (Sato y col., 2005). Aunque se considera que las genotecas enriquecidas producen porcentajes elevados de redundancia, en este trabajo los porcentajes encontrados pueden considerarse más bien bajos.

La proporción de *loci* polimórficos aislados de las genotecas ATC (36%) y ACC (17,65%) es coincidente con el obtenido por Petersen y col. (2009) en el pectínido *Nodipecten subnodosus* (34,9%) y Feldheim y col. (2011) en el mejillón *Dreissena polymorpha* (16,66%). Pero los *loci* aislados de la genoteca CTGT resultaron polimórficos en menor proporción (10%). Las diferencias en los resultados de las genotecas enriquecidas para motivos trinucleotídicos *versus* tetranucleotídicos pueden relacionarse con las características estructurales de los mismos. Diferentes estudios

muestran que la tasa de mutación de *loci* microsatélite está inversamente relacionada con el tamaño de la unidad de repetición (Chakraborty y col., 1997; Schug y col., 1998). En *Drosophila melanogaster* las estimas obtenidas indican que las repeticiones de tri- y tetranucleótidos mutan a tasas 6,4 y 8,4 veces más bajas que las de dinucleótidos, respectivamente (Schug y col., 1998). Las diferencias en la proporción de *loci* polimórficos obtenidos a partir de las genotecas ATC y ACC pueden relacionarse con la composición nucleotídica ya que cabe suponer que el contenido en GC afecte a la estabilidad de los tramos de unidades repetidas; en un panel de repeticiones trinucleotídicas del genoma humano, los motivos más polimórficos son ricos en AT (Gastier y col., 1995).

Las repeticiones de dinucleótidos, pese a su mayor polimorfismo y a ser más fáciles de aislar debido a su abundancia en los genomas, tienen la desventaja de poseer una elevada propensión a generar bandas tartamudas (Schlötterer, 1998). Estas bandas se originan por procesos de deslizamiento replicativo durante la amplificación por PCR y difieren de la secuencia molde original en múltiplos de longitud de la unidad de repetición (Shinde y col., 2003), dificultando enormemente la correcta asignación de los alelos. Por ello, en este trabajo se optó por realizar genotecas enriquecidas para motivos tri- o tetranucleotídicos para evitar ambigüedades en la asignación de genotipos. Otra ventaja de las repeticiones de trinucleótidos es que son más frecuentes que las de dinucleótidos en las regiones expresadas (Morgante y col., 2002), cubriendo el genoma de manera más homogénea.

Los microsatélites polimórficos identificados se clasificaron como puros (10), puros interrumpidos (11), compuestos (1) y compuestos interrumpidos (2). Aunque se ha indicado que las repeticiones perfectas son más variables que las imperfectas (Godstein y Clark, 1995), esta observación no se ve reflejada en este estudio donde los microsatélites puros interrumpidos muestran un número medio de alelos (7,63) superior al de los microsatélites puros (4,6). Pero no puede descartarse que otros factores como el análisis de un número reducido de *loci*, composición de la unidad de repetición o el número de repeticiones pudieran afectar a la tasa de mutación y ensombrecer el efecto de las interrupciones en las repeticiones.

Una vez identificados *loci* microsatélite polimórficos, existe un enorme interés en desarrollar PCRs *multiplex* para reducir el coste y el tiempo requerido para el

genotipado, sobre todo cuando se requiere el análisis de múltiples *loci* en cientos de individuos como es el caso de estudios de poblaciones o paternidades. Otra ventaja de las PCRs *multiplex* es que reducen el número de muestras a manipular, disminuyendo el riesgo de contaminación, y también la cantidad de ADN molde necesaria para la reacción de amplificación. También permiten identificar 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). En este trabajo se optimizaron tres PCRs *multiplex* que permiten la amplificación simultánea de ocho *loci* microsatélite en una de ellas y cinco *loci* en las otras dos. Esto supone que un total de 18 *loci* pueden ser analizados en tan solo tres reacciones. A pesar de los beneficios de las PCR *multiplex* su desarrollo y utilización en bivalvos es reciente y se limita a unos pocos casos (Taris y col., 2005; Wang y col., 2010; Mura y col., 2012). Es de destacar la amplificación simultánea de 16 *loci* en la ostra *C. virginica* (Wang y col., 2010), un número muy superior al conseguido en las PCRs *multiplex* desarrolladas no sólo aquí sino también en otros estudios de bivalvos, no obstante, los 16 *loci* fueron seleccionados de un panel de 188 microsatélites caracterizados previamente, mientras que en nuestro caso este número fue de 21.

En este estudio, el análisis poblacional realizado en base a marcadores microsatélite se complementó con el análisis de marcadores mitocondriales. Estos son de uso común en estudios filogenéticos, filogeográficos, genética de poblaciones, genética de la conservación y diferenciación molecular de especies de diversos organismos incluyendo almejas de la familia Veneridae (Canapa y col., 1996; Fernández y col., 2002a; Baker y col., 2008; Mao y col., 2011; Ross y col., 2012; Murakami-Sugihara y col., 2012). En el caso de *V. pullastra* la utilización de marcadores mitocondriales se limita a análisis filogenéticos (Canapa y col., 2003) y diferenciación de especies (Fernández y col., 2002a). En el ámbito de estudios poblacionales de almejas Veneridae que colonizan la costa europea, como ocurre con los marcadores microsatélites, los esfuerzos se han dirigido fundamentalmente a *R. philippinarum* (Park y col., 2002; Chiesa y col., 2011; Mao y col., 2011) y en menor medida a *R. decussatus* (Gharbi y col., 2010).

Un aspecto común de los estudios que emplean marcadores mitocondriales en almejas Veneridae y otras familias de bivalvos es el análisis de los genes 16S y/o COI.

Otras regiones mitocondriales como el gen *CitB*, ampliamente utilizado en otros grupos (Arif y Khan, 2009), han sido más ignoradas. Ésto es debido probablemente a que los cebadores universales descritos para amplificar este gen son poco efectivos, a diferencia de lo que ocurre con los descritos para los genes 16S y COI. En este trabajo, se utilizaron cebadores degenerados diseñados por Dahlgren y col. (2000) a partir de las secuencias de cuatro moluscos. A pesar de que estos cebadores no produjeron amplificaciones satisfactorias en los individuos examinados, la clonación y secuenciación de productos de PCR de unos pocos individuos permitió obtener la secuencia de parte del gen *CitB* de *V. pullastra* y diseñar cebadores específicos para esta almeja. Por tanto, el desarrollo de este marcador en *V. pullastra* amplía el abanico de las regiones mitocondriales en las que explorar la diversidad genética.

Otro aspecto a destacar es que en Veneridae ninguno de los análisis poblacionales basados en marcadores mitocondriales contempla la existencia o posible existencia de DUI, ni siquiera en *R. philippinarum* (Mao y col., 2011) que presenta este tipo de herencia (Passamonti y Scali, 2001). La importancia de este aspecto radica en que puede interferir en la interpretación de los datos poblacionales. En el mejillón *M. galloprovincialis* se ha demostrado que los dos tipos de ADNmt (M y F) aportan diferente información respecto al grado de variación y distancia genética entre poblaciones; el genoma F muestra mayor diversidad dentro de las poblaciones mientras que el genoma M revela mayor diferenciación entre las poblaciones (Ladoukakis y col., 2002).

Aquí se realizó una prueba preliminar para tratar de determinar la existencia de DUI en *V. pullastra* que consistió en comparar un tramo de secuencia del gen *CitB* obtenido por PCR a partir de ADN de esperma y tejido somático de machos y hembras. Si bien uno de los machos analizados mostró dos sustituciones nucleotídicas entre la secuencia procedente del esperma y la del músculo aductor, la magnitud de esta diferencia resulta muy inferior a la descrita entre tipos F y M de otras especies (10-50%, Passamonti y Scali, 2001; Doucet-Beaupré y col., 2010). Por otro lado, no se detectó una variación inusual en el conjunto de individuos analizados ni en el gen *CitB* ni en los genes 16S y COI que de existir constituiría una evidencia indirecta de la existencia de DUI. No obstante, también es posible observar una falsa homoplasia por baja divergencia entre genomas F y M debido a sucesos de masculinización (Theologidis y

col., 2008) donde el genoma F reemplaza al M en la gónada masculina, transmitiéndose vía espermatozoides, un fenómeno descrito en mejillones *Mytilus* (Hoeh y col., 1996). Por tanto, tres escenarios son posibles: (i) no existe DUI en *V. pullastra*; (ii) existe pero las diferencias entre los tipos M y F son tan pequeñas que dificultan su distinción y (iii) existe DUI con marcadas diferencias entre ambos tipos pero no se ha detectado.

La detección de DUI puede ser dificultosa (Theologidis y col., 2008). Generalmente la divergencia entre los dos genomas es alta y en consecuencia cebadores universales pueden reconocer sólo uno de ellos. Una dificultad adicional procede de la contaminación de tejidos; el tejido gonadal masculino contiene también tejido somático e incluso espermatozoides recogidos en la puesta puede estar contaminado por tejido somático (Venetis y col., 2006). Así, como ha ocurrido con otras especies de bivalvos, la situación de *V. pullastra* permanece incierta, pero de existir DUI, es muy probable que las secuencias de las muestras de las localidades examinadas correspondan al tipo F por haber extraído el ADN de tejido fundamentalmente somático.

## 5.2. Diversidad genética de poblaciones naturales

Este trabajo aporta las primeras estimas de diversidad genética de *V. pullastra* de la costa gallega y una localidad del sur de Portugal en marcadores microsatélite y mitocondriales. Previamente, sólo Joaquim y col. (2010) evaluaron la variabilidad genética en marcadores RAPD en dos localidades de la costa portuguesa.

Los 18 *loci* microsatélite analizados fueron polimórficos en las seis localidades examinadas, detectándose de 3 a 33 alelos por *locus*. De los 18 *loci*, 13 se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg en al menos una localidad. En todos los casos de desequilibrio, las desviaciones se debieron a un déficit de heterocigotos, un fenómeno común en moluscos bivalvos, detectado tanto en marcadores microsatélite (Launey y col., 2002; Astanei y col., 2005) como enzimáticos (Borsa y col., 1991; Raymond y col., 1997). Varios factores tanto biológicos como técnicos pueden explicar el déficit de heterocigotos (Zouros y Foltz, 1984; Gaffney, 1994).

El déficit de heterocigotos se puede relacionar con un efecto Wahlund espacial o temporal (Borsa y col., 1991; Raymond y col., 1997; Passamonti y col., 1999), situación en la que una muestra se compone de una mezcla de individuos de dos o más

poblaciones o de diferentes cohortes que divergen en las frecuencias alélicas de uno o varios *loci*. Dado que en este estudio no se observó diferenciación genética entre las localidades gallegas, y dada la distancia de éstas con Faro, es poco probable que el déficit de heterocigotos pueda deberse a un efecto Wahlund espacial. Por otro lado, también parece poco probable que el déficit esté causado por un efecto Wahlund temporal debido a que los individuos analizados eran todos de talla comercial lo que reduce las posibilidades de pertenecer a diferentes cohortes.

Otro factor que puede causar déficit de heterocigotos es la selección (Boudry y col., 2002). Aunque los microsatélites son considerados generalmente marcadores selectivamente neutros, en algunos casos intervienen en diferentes procesos celulares (Li y col., 2008), e incluso sin participar en ningún proceso biológico, un *locus* microsatélite puede estar ligado a otro sometido a selección (Fay y Wu, 2000) y por tanto verse afectado por ella. Sin embargo, no se detectaron desviaciones significativas de neutralidad en las 37 combinaciones *locus*/localidad que no se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg, por lo que podría descartarse el efecto de la selección.

La endogamia es otra de las causas que llevan a un déficit de heterocigotos. En *V. pullastra* los sexos están separados y, como en la mayoría de bivalvos, la fecundación es externa, con una puesta de huevos masiva y una amplia dispersión larvaria, por lo que la endogamia es muy poco probable. Además, en caso de endogamia deberían verse afectados todos los *loci* (Astaneï y col., 2005) y no sólo cinco como ocurre en este estudio.

La explicación más plausible para el déficit de heterocigotos detectado en este trabajo es la presencia de alelos nulos. Los cinco *loci* que se encontraron en desequilibrio en todas las localidades presentaron frecuencias elevadas de alelos nulos ( $>0,2$ ). La aparición de alelos nulos constituye uno de los mayores problemas de los marcadores microsatélite en los estudios de genética de poblaciones (Li y Kijima, 2006). Una manera de evitar los problemas ocasionados por los alelos nulos sería rediseñar los cebadores (Reece y col., 2004; Brownlow y col., 2008) pero ello depende de la variabilidad de la región. Aunque no se conoce la tasa de mutación en moluscos marinos, se han detectado niveles de polimorfismo elevados, sugiriendo una alta tasa de mutación (Brownlow y col., 2008). Cuanto mayor sea la tasa de mutación, más varían los sitios de unión de los cebadores y más complicado resulta su diseño.

El nivel de diversidad genética en marcadores microsatélite de las localidades examinadas aquí resultó similar en todas ellas, independientemente del parámetro empleado (número de alelos, riqueza alélica y heterocigosidad observada y esperada). Al aplicarse el test de Friedman a los valores de riqueza alélica y heterocigosidad observada y esperada de las localidades no se encontraron diferencias significativas en ninguno de estos parámetros. No obstante, el número de alelos y la riqueza alélica fueron los parámetros que mostraron mayores fluctuaciones entre las localidades. De todos los parámetros de diversidad, la riqueza alélica tiene especial relevancia en programas de conservación (Petit y col., 1998) debido a que el límite de la respuesta a la selección está determinado principalmente por el número inicial de alelos independientemente de las frecuencias alélicas, y también porque refleja mejor las fluctuaciones pasadas de tamaño poblacional. La reducción transitoria del tamaño efectivo de población (cuellos de botella) provoca una reducción de la diversidad genética pero en *loci* neutros la reducción generalmente es más marcada en la riqueza alélica que en la heterocigosidad esperada. Esto podría explicar el hecho de que los valores máximos y mínimos de ambos parámetros se encuentren en diferentes localidades. Cabe destacar que la menor riqueza alélica se detectó en Barallobre, localidad sometida a una intensa explotación y situada en la Ría de Ferrol, un enclave mucho más cerrado que el de las restantes localidades.

En los marcadores mitocondriales examinados, todas las localidades mostraron en general mayores valores de diversidad genética en el CitB que en los otros marcadores (16S y COI). Teniendo en cuenta las secuencias combinadas, todas las localidades se caracterizan por tener niveles altos de diversidad haplotípica y bajos de nucleotídica. Al considerar cada gen individualmente, los niveles son relativamente altos en Camariñas (16S) y Faro (CitB) pero bajos/moderados en las demás localidades, destacando la menor diversidad haplotípica de O Grove (16S y CitB) y la menor diversidad haplotípica y nucleotídica de Barallobre (COI). Estos resultados ponen en evidencia la importancia de analizar varias regiones para tener una visión más amplia de la variabilidad genética presente en las localidades. Discrepancias en los niveles de diversidad aportados por distintos marcadores mitocondriales se observaron igualmente en otros estudios de invertebrados marinos (Yuan y col., 2009; Zitari-Chatti y col., 2009). Sin embargo, las diferencias detectadas en ambos parámetros de diversidad no se reflejan en el análisis de remuestreo realizado, lo cual puede deberse a una ausencia de



potencia del test por la existencia de múltiples haplotipos a baja frecuencia. La menor diversidad de O Grove y Barallobre podría reflejar un menor tamaño efectivo de población, dado que teóricamente la variabilidad presente en una población está correlacionada positivamente con este parámetro poblacional (Fuji y Nishida, 1997).

La presencia de uno o dos haplotipos principales igualmente distribuidos en todas las localidades y un número apreciable de haplotipos únicos observada en este trabajo es un patrón recurrente en organismos marinos asociado a las glaciaciones del Pleistoceno (Grant y Bowen, 1998; Baker y col., 2008; Sotelo y col., 2009) e indicativo de una expansión demográfica reciente a partir de una población ancestral con pequeño tamaño efectivo. Este escenario demográfico en expansión resulta igualmente evidente en los resultados aportados por los tests  $F_s$  de Fu y  $R_2$ . También es el que cabe esperar en el caso de especies con una elevada varianza en el éxito reproductivo y sensibilidad a las condiciones ambientales (Baker y col., 2008).

La discusión de las estimas de diversidad genética obtenidas en las localidades de *V. pullastra* examinadas aquí se ve limitada por la escasez de estudios poblacionales en esta especie. La diversidad genética estimada en este estudio fue superior a la detectada previamente en *V. pullastra* empleando RAPDs, donde el valor medio de la heterocigosidad esperada fue de 0,219 (Joaquim y col., 2010). Esta observación no resulta sorprendente dado que los microsatélites son marcadores que suelen presentar altos niveles de polimorfismo (Li y col., 2002), superiores a los de otros marcadores. Así, en el mejillón *D. polymorpha* la heterocigosidad esperada en microsatélites fue el doble de la encontrada en alozimas (Astanei y col., 2005; Gosling y col., 2008) en consonancia con la tasa de mutación de ambos marcadores. Las diferencias son también evidentes respecto a otros marcadores nucleares incluyendo AFLPs (Liu y col., 2010) y polimorfismos de intrones (Arias y col., 2010). Por ello, los microsatélites son más potentes a la hora de detectar polimorfismos que otros marcadores menos variables (Gosling y col., 2008).

Al margen de los valores de diversidad genética arrojados por microsatélites y RAPDs, nuestros resultados coinciden con los de Joaquim y col. (2010) en que Faro, localidad del sur de Portugal, muestra un nivel de variabilidad del mismo orden que localidades más norteñas.

Respecto a estimas basadas en marcadores microsatélite en otras almejas Veneridae, un estudio de 14 *loci* en *R. decussatus* en dos localidades gallegas, Cambados (Ría de Arousa) y Redondela (Ría de Vigo), aportó estimas de riqueza alélica (7,102, 7,529) y heterocigosidades observadas (0,614, 0,621) y esperadas (0,651, 0,669) (Insua, comunicación personal) superiores a las de las localidades (O Grove y Cangas) de las mismas rías examinadas en este trabajo (6,207, 5,701; 0,404, 0,406; 0,590, 0,566, respectivamente). *R. philippinarum* es la almeja en la que se examinaron de cuatro a nueve *loci* microsatélite en un mayor número de localidades (Yasuda y col., 2007; An y col., 2009; Chiesa y col., 2011; Mura y col., 2012). Atendiendo a la heterocigosidad observada de localidades del norte del Mar Adriático (0,41-0,62; Chiesa y col., 2011) los valores obtenidos aquí son coincidentes con los más bajos del rango, pero debe tenerse en cuenta que la almeja japonesa es una especie introducida en Italia y no puede descartarse la existencia de efectos fundadores que reducen la variabilidad genética. Estimaciones de heterocigosidad observada en poblaciones del ámbito natural de distribución de *R. philippinarum* comprenden 0,643 en Japón (Yasuda y col., 2007) y 0,642 en Corea (An y col., 2009). En otras almejas de la familia como *Meretrix meretrix*, distribuida naturalmente en el sur y sureste asiático, el análisis de nueve *loci* en poblaciones cultivadas aportó valores de heterocigosidad observada (0,607-0,663; Lu y col., 2012) similares a los descritos en *R. philippinarum*. En *Mercenaria mercenaria*, distribuida a lo largo de la costa atlántica norteamericana, el análisis de 29 *loci* en una población natural proporcionó una estimación de 0,373 (Wang y col., 2010), un valor más cercano al de las localidades examinadas en este trabajo.

Al igual que ocurre con los marcadores microsatélite, la diversidad genética estimada aquí en marcadores mitocondriales sólo puede compararse con la descrita en otras almejas por la ausencia de estudios en *V. pullastra*. Por otra parte, únicamente se dispone de datos de diversidad haplotípica y nucleotídica del COI; Chiesa y col. (2011) hacen referencia a una baja diversidad haplotípica en el gen 16S de *R. philippinarum* del norte del Mar Adriático pero sin aportar los valores. Todos los estudios realizados coinciden en analizar un tramo similar del COI al utilizar los mismos cebadores universales para su amplificación pero se aprecian diferencias en la diversidad estimada. Tanto Baker y col. (2004; 2008) en *M. mercenaria* (0,7500-0,9474) como Mao y col. (2011) en *R. philippinarum* (0,8-1) aportan estimaciones elevadas de diversidad haplotípica en todas las localidades examinadas (costa este norteamericana y noroeste del pacífico,

respectivamente), si bien algunos stocks de cultivo examinados por Baker y col. (2004) mostraron una diversidad más reducida (0,33-0,50). En *Anomalocardia brasiliensis* de la costa brasileña (0,4460-0,8460, Arruda y col., 2009) y *R. decussatus* de la costa tunecina y francesa (0,1667-0,757, Gharbi y col., 2010) el rango de valores en las localidades es más amplio, siendo bajos o moderados en algunas de ellas. Por tanto, la diversidad haplotípica del COI estimada en las localidades examinadas en este estudio es en general inferior a la descrita en especies de almejas de áreas geográficas muy distantes pero se encuentra dentro del rango descrito en *R. decussatus*, una especie con la que comparte distribución geográfica. Aunque no pueden descartarse factores metodológicos (ej. sesgo en tamaños muestrales), la menor diversidad genética puede ser consecuencia de la historia evolutiva de las poblaciones o del tamaño poblacional actual sujeto probablemente a reducciones por sobreexplotación (Gharbi y col., 2010). Las diferencias en la diversidad haplotípica en general se ven igualmente reflejadas en la diversidad nucleotídica.

En términos generales, tanto los marcadores microsatélite como los mitocondriales revelan la existencia de un nivel moderado de diversidad genética en *V. pullastra*. Las estimas aportadas podrán servir de referencia para realizar un seguimiento en el futuro y conocer los efectos de la explotación continuada del recurso.

### 5.3. Diferenciación genética de poblaciones naturales

Todos los análisis realizados con marcadores microsatélite, incluyendo estimas de  $F_{ST}$  globales y por pares de localidades, distribución de frecuencias alélicas por *locus*, análisis bayesiano de estructura genética, cálculo del número de migrantes y reconstrucción de relaciones filogenéticas de las localidades indican de manera convincente la existencia de diferenciación genética en la costa atlántica de la Península Ibérica. Las localidades de Galicia no muestran diferenciación pero Faro, la localidad del sur de Portugal, resulta significativamente diferente a todas ellas. Es de destacar el valor  $F'_{ST} = 0,196$  que indica un valor de diferenciación genética alta según las directrices de Wright (1978) y también la existencia de un mayor número de alelos privados (12 respecto a 4-8 en las demás localidades), algunos de ellos a frecuencias elevadas (0,711-0,722).

La visión aportada por los marcadores microsatélite contrasta con la aportada por los marcadores mitocondriales. En éstos, de los valores  $F_{ST}$  globales sólo resultó significativo el estimado con el CitB y en este caso el  $F'_{ST}$  (0,076) fue menor que el obtenido con los microsatélites. En las comparaciones de  $F_{ST}$  por pares de localidades, Faro sólo muestra una diferenciación genética significativa con O Grove y, contrariamente a los microsatélites, este marcador mitocondrial revela diferenciación genética significativa entre las localidades gallegas de Barallobre y O Grove. Atendiendo a las relaciones filogenéticas inferidas, cada región mitocondrial aporta topologías únicas, destacando el árbol elaborado con el CitB donde las localidades muestran una agrupación en gran consonancia con la distribución norte-sur. Por otra parte, las redes de haplotipos elaboradas con cada gen no aportan evidencias de diferenciación genética; todas las localidades comparten el haplotipo o los haplotipos más comunes y aunque todas presentan haplotipos privados éstos se encuentran siempre a muy bajas frecuencias.

La existencia de discordancia entre estimas de estructura poblacional de microsatélites y ADNmt no es inusual. El número de trabajos que describen patrones diferentes ha aumentado en los últimos años a medida que aumenta su uso combinado (Toews y Brelsford, 2012). En algunos casos los microsatélites han resultado más potentes que los marcadores mitocondriales para resolver la estructura de población (Sellas y col., 2005; Babbucci y col., 2010) pero en otros no (Lukoschek y col., 2008; Tarnowska y col., 2010; Grobler y col., 2011). La existencia de baja variabilidad haplotípica en el ADNmt comparada con una diversidad generalmente alta en microsatélites puede significar que éstos sean indicadores más sensibles de estructura poblacional (Sellas y col., 2005). Por otro lado, el tamaño efectivo de población del genoma mitocondrial, al ser cuatro veces menor que el de marcadores nucleares, incrementa los efectos de la deriva genética, lo que provoca una fijación o pérdida de alelos más rápida y mayor subdivisión poblacional en los *loci* mitocondriales que en los nucleares (Birky y col., 1983). Diferencias en la intensidad de selección en cada marcador y asimetrías demográficas, como sesgo en la dispersión de los sexos, (Tarnowska y col., 2010; Toews y Brelsford, 2012) también se han postulado como posibles causas. En cualquier caso, la discrepancia entre las estimas de ADNmt y microsatélites pone en evidencia la importancia de utilizar más de un tipo de marcador cuando se trata de inferir la estructura genética de las poblaciones (Sellas y col., 2005).

El grado de diferenciación genética detectado mediante microsatélites entre las localidades de Galicia y Faro contrasta con el detectado en otros bivalvos con los mismos marcadores. En el mejillón *M. galloprovincialis*, Diz y Presa (2008) describieron la existencia de diferencias significativas entre una localidad del sur de Galicia (Combarro) y otras localidades de la costa portuguesa (Figueira da Foz, Sines y Lagos) y del Golfo de Cádiz (Doñana) pero en todos los casos los valores  $F_{ST}$  (<4%) fueron más bajos que los detectados aquí. En el caso del longueirón *Ensis siliqua*, no se detectó diferenciación genética entre algunas localidades gallegas y el sur de Portugal (Arias-Pérez y col., 2012). Aparte de las características propias de cada especie, no puede descartarse que la ausencia o baja diferenciación se deba al análisis de un número de *loci* microsatélite (5-6) menor que el utilizado en este estudio (13).

El hecho de que alelos privados de Faro se encuentren a una frecuencia relativamente elevada constituye un resultado relevante ya que de existir equilibrio Hardy-Weinberg el 92% de los individuos serán homocigotos/heterocigotos para el alelo 170 del *locus* VpAT1-36 y el 97% lo serán para los alelos 126 ó 143 del *locus* VpAT2-74. Combinando el poder de asignación de ambos *loci*, el 99,76% de los individuos podrían ser asignados a dicha localidad. Así, la amplificación de los *loci* VpAT1-36 y VpAT2-74 en una PCR *duplex* derivada de la PCR *multiplex* I optimizada en este estudio permitiría la asignación/exclusión de individuos a Faro. En los últimos años se han descrito diferentes marcadores especie-específicos para identificar almejas (Fernández y col., 2000; 2001; 2002 a, b;) u otros bivalvos (ej. Boudry y col., 1998; López-Piñón y col., 2002; Cross y col., 2006; Santaclara y col., 2006; Fenández-Tajes y col., 2010) sin embargo la descripción de marcadores específicos de población es rara. Fernández-Tajes y col. (2012) describieron en *Ensis siliqua* un *locus* microsatélite con un alelo fijado en poblaciones de la Península Ibérica y otro en poblaciones de Irlanda pero en general el bajo nivel de diferenciación genética detectado habitualmente en especies marinas dificulta la identificación de poblaciones. Con el fin de conocer el alcance del poder de discriminación de los alelos privados identificados aquí, sería de interés analizar en el futuro la estructura de población a una escala más fina a lo largo de la costa portuguesa y Golfo de Cádiz y determinar si existe un límite definido entre Faro y otras localidades o por el contrario se produce un cambio gradual en las frecuencias alélicas de los alelos privados. Un estudio en el alga *Zostera noltii* a lo largo de la costa atlántica de la Península Ibérica sugiere la existencia de una barrera

oceanográfica en la región de Río Tajo/Cañón de Nazaré (Diekmann y col., 2005). La posibilidad de diferenciar las almejas de Faro podrá ser de utilidad tanto en la gestión del recurso como en establecer su trazabilidad en el mercado.

Las muestras de Galicia examinadas aquí proceden todas de diferentes rías y, excepto la de Barallobre que presenta diferenciación genética con la de O Grove (CitB) todas ellas parecen estar interconectadas por elevado flujo génico. Sin embargo, en otros casos se ha descrito un cierto grado de restricción. En un exhaustivo análisis de mejillones de 27 localidades distribuidas en seis rías desde el norte al sur de Galicia (Ribadeo, Betanzos, Muros-Noya, Pontevedra y Vigo), Diz y Presa (2009) pusieron de manifiesto mediante marcadores microsatélite una débil pero significativa diferenciación entre los *pools* de muestras de todas las rías, excepto las comparaciones de Pontevedra-Arousa y Betanzos-Ribadeo (éstas tratadas como componentes del mismo *pool*), existiendo la mayor diferenciación entre los *pools* de muestras de ambos lados del Cabo Finisterre. Esta discontinuidad en el patrón de variación se asocia con la existencia de un frente de masas de agua en la zona del Cabo Finisterre (Fraga y col., 1982) que establece dos regiones biogeográficas con diferencias en la producción primaria, salinidad, temperatura del agua y evaporación. Una discontinuidad genética similar podría ocurrir también en el berberecho (Martínez y col., 2013) y su existencia se ha demostrado en el caracol marino *Littorina saxatilis* (Piñeira y col., 2008).

La diferenciación genética entre Barallobre y O Grove evidenciada por el gen CitB en principio no puede relacionarse con la barrera oceanográfica del Cabo Finisterre al no verse afectadas otras localidades. Más bien podría deberse al fenómeno de *sweepstakes reproductive success* descrito por Hedgecock (1994) en animales marinos con alta fecundidad. Según este autor, la elevada varianza en el éxito reproductivo de estos organismos podría provocar heterogeneidad genética en una escala espacial reducida. Otro factor a tener en cuenta es una posible restricción en la dispersión larvaria debida a la situación de Barallobre en un enclave cerrado; la ría de Ferrol presenta en la zona media un fuerte estrechamiento (~300 m entre los dos márgenes) de forma que el interior de la misma, donde se encuentra Barallobre, está muy protegido. Aparte de la existencia potencial de restricciones en el flujo génico debe considerarse que la pesca continuada ha podido provocar reducciones en la abundancia que contribuyesen a la diferenciación genética detectada. Para confirmar la estructura

poblacional observada, debería disponerse de datos adicionales sobre el patrón espacial en varias generaciones.

Un aspecto adicional a determinar es en qué medida la aparente homogeneidad genética de *V. pullastra* de Galicia se debe a actividades asociadas con su explotación. Las primeras experiencias de cultivo de esta almeja datan de los años 70 (Pérez-Camacho y col., 1977) y actualmente se produce semilla tanto bajo iniciativa privada (ej. GRUPO TINAMENOR en Cantabria, PROAFER en Galicia) como al amparo de instituciones autonómicas (Martínez Patiño y col., 2008). La práctica habitual consiste en obtener semilla en criadero a partir de progenitores recogidos en el medio natural sin que exista conexión entre el origen de reproductores y las áreas repobladas con la semilla producida, lo que podría incrementar significativamente el flujo génico dentro y entre las rías gallegas. También debe tenerse en cuenta el traslado de ejemplares de unas áreas a otras, una práctica conocida cuya dimensión exacta se desconoce.

La evaluación de la estructura poblacional realizada en este estudio podrá servir de referencia para detectar posibles cambios causados por factores antropogénicos o ambientales. Dado el régimen de explotación al que se ve sometido el recurso y el deterioro de su medio a consecuencia del desarrollo urbanístico en el litoral, éste debería estar sujeto a un monitoreo sistemático para alertar de cambios que comprometan su variabilidad.

#### **5.4. Consecuencias genéticas de la producción de semilla en criadero**

Una de las principales aplicaciones de los microsatélites es la asignación de paternidades; a medida que se van desarrollando su uso en este campo se hace más frecuente. Esta metodología tiene gran relevancia al permitir estimar el número efectivo de reproductores, inferir la varianza del éxito reproductivo entre individuos, establecer relaciones genealógicas entre individuos de criadero y poblaciones repobladas y facilitar los programas de selección genética.

En este estudio se utilizaron 13 *loci* microsatélite para asignar paternidades a 150 semillas obtenidas por desove masivo de un lote de 139 reproductores. Se obtuvo un porcentaje de asignación simulado del 73 y 100% y una asignación real del 37 y 97% para un nivel de confianza del 95% y 80%, respectivamente. El poder de las técnicas de

asignación que utilizan microsatélites depende de varios factores incluyendo la variación de los marcadores, presencia de alelos nulos, segregación independiente de los *loci*, mutación y fallos de genotipado (Jerry y col., 2004; Dong y col., 2006; Vandeputte y col., 2011; Karaket y Poompuang, 2012). La probabilidad de exclusión aumenta con el número de *loci* incluidos en el análisis, el número de alelos por *locus* y con la igualdad de frecuencias alélicas en los *loci*. En nuestro caso se incluyeron 13 *loci*, un número relativamente alto respecto a otros trabajos (ej. Boudry y col., 2002; Li y col., 2009; Lallias y col., 2010) y, aunque la variabilidad presente en la muestra de estudio resultó moderada (PIC global= 0,497), el poder de exclusión fue alto (>0,95). La presencia de alelos nulos es una fuente clásica de incompatibilidades en la asignación de paternidades basada en microsatélites; frecuencias por encima del 5% comprometen la determinación de pedigríes (Marshall y col., 1998). Dado que en este estudio los *loci* con alelos nulos a frecuencias elevadas fueron excluidos del análisis y que en 11 de los 13 *loci* la frecuencia de alelos nulos fue del orden del 5% o inferior parece poco probable que la presencia de este tipo de alelos tuviese un efecto muy significativo. También puede descartarse la ausencia de segregación independiente de los *loci* ya que no se detectaron evidencias de desequilibrio de ligamiento ni en los progenitores ni en las muestras analizadas del medio natural. El efecto de la mutación no puede descartarse al haberse detectado alelos nuevos en la semilla pero éstos también podrían deberse a errores de genotipado. Cabe suponer que los fallos de genotipado hayan tenido un papel relevante en la asignación de paternidades. Aunque en el análisis se utilizaron 13 *loci*, no todos los individuos fueron genotipados para el total de *loci* debido a problemas de amplificación; se genotiparon todos los individuos para al menos seis *loci* pero el porcentaje de individuos con los 13 *loci* genotipados fue de 40% en los progenitores y 43% en la semilla, resultando mucho más bajo (16%) en la semilla pequeña. Al aumentar el número de marcadores cabe esperar un incremento en el riesgo de problemas de amplificación (Vandeputte y col., 2011). Es probable que la adopción de protocolos de extracción que produzcan ADN más puro que el basado en la resina Chelex utilizado aquí pueda mejorar la amplificación y el genotipado y en consecuencia la capacidad de asignación.

La asignación de paternidades ha permitido estimar el número real de padres y madres que contribuyeron a la semilla en el criadero donde se utilizó un lote de reproductores recogido en el medio natural y, por lo tanto, estimar el tamaño efectivo de



reproductores, uno de los parámetros más importantes en la gestión de stocks de reproductores. Este parámetro proporciona una indicación sobre la estabilidad genética de la población por estar inversamente relacionado con la endogamia y la deriva genética. Está determinado por varios factores, incluyendo el número de machos y hembras que producen descendencia viable, la proporción de sexos, la contribución de cada parental y la varianza del tamaño familiar (Tave, 1999; Boudry y col., 2002; Li y col., 2009). Como ocurre a menudo en especies acuáticas (Lind y col., 2009; Liu y col., 2012), el tamaño efectivo de población estimado aquí resultó inferior al número real de individuos del lote de reproductores, observándose una reducción del 40%. Dado que la proporción de sexos se encontró equilibrada, la reducción observada puede atribuirse en gran medida a una contribución desigual de los parentales. En organismos marinos con altas tasas de fecundidad y mortalidad temprana cabe esperar que exista una variación substancial en el éxito reproductivo (Hedgecock, 1994), documentándose esta variación en varias especies de bivalvos tanto en poblaciones naturales (Li y Hedgecock, 1998; Hedgecock y col., 2007) como en condiciones experimentales (Boudry y col., 2002; Petersen y col., 2008; Li y col., 2009; Lallias y col., 2010). Boudry y col. (2002) detectaron una elevada varianza en las contribuciones parentales de *C. gigas*, incluso en condiciones de aportaciones gaméticas equilibradas, atribuyendo la varianza observada a tres factores principales: calidad de los gametos, interacción huevo-esperma y viabilidad diferencial de los genotipos. En nuestro caso es de destacar la existencia de diferencias entre sexos; mientras que la contribución de los machos resultó igualitaria, la de las hembras fue significativamente distinta ( $\chi^2 = 96,72$ ;  $P < 0,05$ ). Ésto indica que factores que afectan específicamente a las hembras, como cantidad y calidad de los huevos, podrían tener un papel relevante en la contribución desigual de las mismas. Dado el número de posibles familias que podría formarse (4824), la cantidad de semilla analizada (150 individuos) resulta insuficiente para evaluar apropiadamente la contribución por parejas por lo que deben realizarse otros ensayos con un menor número de progenitores y mayor cantidad de semilla para conocer el efecto de la interacción huevo-esperma y la viabilidad diferencial de los genotipos, pero hay que destacar que en las familias detectadas la contribución no resulta desproporcionada.

A pesar de que se detecta una contribución diferencial de los reproductores, el grado en el que ocurre resulta muy inferior al descrito en otras especies. En el pez plano *Paralichthys olivaceus* la contribución de un lote de reproductores a la siguiente

generación fue radicalmente sesgada con prácticamente toda la descendencia monopolizada por un macho de los seis incluidos en el lote (Sekino y col., 2003). En un desove de seis ejemplares del pectínido hermafrodita *Nodipecten subnodosus* dos de ellos aportaron la práctica totalidad de los ovocitos y el 52% de la descendencia fueron hermanos (Petersen y col., 2008). Evaluaciones realizadas en *R. decussatus*, con 5 de 24 hembras y 2 de 15 machos aportando el 61% y el 47% de la descendencia, respectivamente, (Insua, comunicación personal) indican que la contribución desigual de los reproductores también puede ser un problema severo en el cultivo en criadero de las almejas. Es necesario analizar más puestas en *V. pullastra* pero los datos obtenidos aquí apuntan a que la dinámica reproductiva de esta especie condiciona su reproducción en criadero en menor grado que en otras especies.

Dado que en los criaderos es común separar clases de tamaño en diferentes tanques para maximizar el crecimiento y la supervivencia y que la semilla de cada tanque puede ser gestionada diferencialmente (ej. siembra en localizaciones distintas), se evaluó la contribución de los reproductores considerando grupos de tamaño. Al considerar tres (semilla pequeña, mediana y grande) o dos grupos (crecimiento potencialmente rápido y lento) se detectó que en el grupo de semilla pequeña/crecimiento lento las hembras no contribuyen por igual. Por otro lado, la evaluación de la contribución a cada grupo de tamaño desveló que algunos progenitores (tres machos y dos hembras) hicieron una contribución significativamente distinta a alguno de los grupos. Por el reducido número de individuos en cada grupo resulta aventurado extraer conclusiones fiables pero observaciones similares han sido interpretadas como reflejo de que un componente genético guía los resultados de crecimiento observados (Borrell y col., 2011). En cualquier caso, los resultados obtenidos indican que los análisis de paternidad realizados resultan útiles para identificar reproductores que contribuyen significativamente a fenotipos de interés y también que la representación de los progenitores puede no ser equitativa en los grupos de tamaño. Ésto último conlleva que los grupos de tamaño sean genéticamente heterogéneos y que su gestión independiente acuse los cambios o pérdida de diversidad potencialmente asociados a la reproducción en criadero. Por otro lado, las estimas de parentesco obtenidas aquí evidencian igualmente el efecto de los grupos de tamaño al mostrar ausencia de parentesco en el conjunto de la semilla pero un coeficiente de

parentesco equivalente al esperado para medios hermanos en el grupo de semilla pequeña.

La estima del tamaño efectivo de reproductores permite determinar el incremento de endogamia por generación, el cual equivale a la pérdida de heterocigosidad (Frankham y col., 2002). La endogamia debe evitarse en programas de reproducción en criadero al tener como consecuencia directa la depresión endogámica, un descenso de la eficacia biológica que puede afectar a la tasa de crecimiento, fertilidad u otros caracteres de interés productivo. Las razones por las que la endogamia provoca depresión endogámica incluyen la expresión de alelos recesivos raros cuyos efectos deletéreos están habitualmente enmascarados en heterocigosis, y la sobredominancia, un fenómeno que ocurre cuando los heterocigotos tienen un fenotipo superior al de los homocigotos (Halliburton, 2004). La severidad de la depresión endogámica depende del nivel de endogamia, el fenotipo en cuestión y de la población (Tave, 1999). El nivel de endogamia que causa problemas en poblaciones de criadero es desconocido pero en el caso de poblaciones que son cultivadas para programas de repoblación el valor debería ser inferior al 5% (Tave, 1999). En nuestro caso, la estima del incremento de endogamia fue 0,6, un valor que permite prever mínimos efectos.

Además del incremento de endogamia producido, la estima del tamaño efectivo de población permite determinar la pérdida de alelos vía deriva genética. Cuando una población pequeña se reproduce, la siguiente generación deriva de una muestra de los gametos producidos por los parentales; simplemente por azar algunos alelos, especialmente los más raros, pueden no pasar a la descendencia y por lo tanto pueden perderse (Frankham y col., 2002). La pérdida de alelos tiene dos efectos: (i) aumenta la homocigosidad y en consecuencia tiene un efecto similar a la endogamia y (ii) reduce la varianza genética, el material sobre el que actúa la selección (Tave, 1999). En los casos de cultivo para programas de repoblación debe preservarse la mayor parte de la variación genética posible, lo cual significa que debe evitarse la pérdida de alelos con frecuencias de 0,01-0,001 (Tave, 1999). Según las tablas elaboradas por Tave (1999), la probabilidad de perder alelos a frecuencias de 0,01 y 0,001, considerando el tamaño efectivo de reproductores estimado en este trabajo (84), sería del 18% y 84%, lo que supone un alto riesgo para los alelos de menor frecuencia. El tamaño efectivo de población necesario para tener una probabilidad del 95% de retener alelos a frecuencias

de 0,01 y 0,001 sería 150 y 1498, respectivamente, por lo que se hace evidente que para evitar la pérdida de alelos durante el proceso de obtención de semilla debe incrementarse el tamaño efectivo de población estimado aquí. No obstante, el efecto de pérdida de alelos depende del contexto en que se use la semilla, siendo perjudicial cuando ésta se utiliza para fundar una población pero marginal cuando se utiliza para repoblar una población con un tamaño efectivo alto (Gaffney, 2006).

Las prácticas de acuicultura han producido muy a menudo stocks con niveles de diversidad genética significativamente más bajos que las poblaciones progenitoras del medio natural no sólo en moluscos (Evans y col., 2004; Lind y col., 2009; Lallias y col., 2010) sino también en crustáceos (Xu y col., 2001) y peces (Pampoulie y col., 2006; Wachirachaikarn y col., 2011). En este estudio no se encontraron diferencias significativas en los valores de riqueza alélica ni en los de heterocigosidad observada y esperada entre la semilla producida y los reproductores/progenitores recogidos en el medio natural. Además, en términos de heterocigosidad observada y esperada, la variabilidad presente en la semilla es comparable a la detectada en el medio natural, incluyendo varias localidades. Por tanto, puede interpretarse que el proceso de obtención de semilla de *V. pullastra* en el criadero no modifica significativamente la composición genética. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la ausencia de diferencias en la heterocigosidad observada y esperada no resulta sorprendente ya que la heterocigosidad declina muy lentamente con el tiempo y es un indicador de cuellos de botella menos sensible que la riqueza alélica (Amos y Balmford, 2001). Diferentes estudios han demostrado que una reducción evidente del número medio de alelos por *locus* conlleva pocos cambios entre la heterocigosidad de poblaciones naturales y cultivadas (English y col., 2000; Evans y col., 2004; Yu y Chu, 2006). Aunque no se detectan diferencias significativas en los valores de riqueza alélica, tanto la media de este parámetro como el número medio de alelos por *locus* (menor en la semilla respecto a reproductores/progenitores) evidencian que ha tenido lugar una pérdida de alelos. Al considerar los grupos de tamaño, la pérdida de alelos se hace más patente en la semilla mediana y pequeña con diferencias significativas en la riqueza alélica respecto a sus progenitores. No obstante, hay que señalar que la riqueza alélica media del conjunto de la semilla (6,024) cae dentro del rango de valores (5,794-6,497) obtenidos para dos muestras temporales de la localidad donde se recogieron los reproductores (población natural: 2008; lote de reproductores: 2012). Por ello, la magnitud de la reducción en el

número de alelos detectada en la semilla podría ser equivalente a la que pueda darse en el medio natural a lo largo del tiempo.

En relación a la estructura de población, puede considerarse que tanto el lote de reproductores como los progenitores representan el *pool* génico de todas las localidades gallegas examinadas excepto O Barqueiro, al no detectarse diferenciación genética significativa. La semilla producida no difiere de sus progenitores pero sí del lote de reproductores y también de las muestras de todas las localidades examinadas en este estudio. Esta diferenciación genética significativa puede ser atribuida a la deriva genética pero también a la selección durante el proceso de cultivo en el criadero (Pampoulie y col., 2006; Camara y Vadopalas, 2009). Las condiciones ambientales del criadero son relativamente más estables que las del medio natural y pueden haber ejercido una presión selectiva diferente a la que ocurre en el medio natural. Las consecuencias genéticas de sembrar en el medio natural semilla que difiere genéticamente de la población natural incluye la depresión exogámica, una reducción de eficacia biológica por hibridación de stocks genéticamente diferentes (Ward, 2006). La depresión exogámica refleja la rotura de complejos de genes coadaptados y el desajuste de interacciones beneficiosas entre genes y ambientes locales, y su severidad aumenta linealmente con la distancia genética de las poblaciones parentales (Edmands y Timmerman, 2003). De acuerdo con Frankham y col. (2011) la probabilidad predicha de depresión exogámica es baja en cruzamientos entre dos poblaciones de la misma especie cuando las poblaciones tienen el mismo cariotipo, han estado aisladas por menos de 500 años y ocupan ambientes similares. Así, es probable que el riesgo de exogamia tras una generación de cría de *V. pullastra* en criadero pueda considerarse mínimo. No obstante, hay que señalar que los microsatélites son esencialmente neutros y para tener evidencias más convincentes sobre la probabilidad de depresión exogámica debería analizarse más bien la variación adaptativa. Independientemente del riesgo de depresión exogámica, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la siembra en Galicia de la semilla producida puede modificar la estructura de la población aunque ello dependerá de la contribución numérica de la semilla al tamaño total de la población natural. El impacto sería mayor si Faro fuese la población receptora y también si se utilizase para la siembra únicamente la semilla pequeña. Si bien la semilla grande y la mediana no muestran una diferenciación genética significativa con las muestras de varias sino todas las localidades gallegas, ello no justifica que la semilla pequeña sea

desechada. En cultivos de ostra *C. gigas* se ha demostrado que la eliminación de las larvas más pequeñas tiene un impacto en la variación genética; los ejemplares de menor crecimiento son importantes para minimizar la variabilidad en el éxito reproductivo y por tanto maximizar la variabilidad genética de una población de criadero (Taris y col., 2006).

Este trabajo pone de manifiesto que para retener y conservar la heterogeneidad genética existente dentro y entre poblaciones de *V. pullastra* el proceso de obtención de semilla para programas de repoblación debería ser optimizado. Por un lado, debe seleccionarse la población que proporcione los reproductores; idealmente éstos deben proceder de la localidad que será repoblada y, de no ser posible, debe utilizarse la que sea genéticamente más similar (Ward, 2006). En el caso de Galicia, la semilla producida por reproductores de Barallobre no debería ser sembrada en otras localidades por la existencia de diferenciación genética detectada en este estudio. Por otro lado, debería incrementarse el tamaño efectivo de reproductores. Para ello se han propuesto varias estrategias no excluyentes. Una es aumentar el número de reproductores manteniendo una proporción de sexos 1:1, lo cual conlleva determinar el tamaño efectivo de población necesario para evitar endogamia y problemas relacionados con la deriva genética y utilizar un número de reproductores que permitan alcanzarlo (Tave, 1999). Otra estrategia es modificar las técnicas de fecundación: (i) fecundar los huevos de cada hembra con espermatozoides de un único macho, dividiendo los huevos de las hembras para que puedan ser fecundados por machos distintos (Tave, 1999); (ii) combinar en proporciones iguales las larvas obtenidas de múltiples grupos de desove masivo pequeños (Gaffney y col., 1992) o de cada una de las hembras (Lind y col., 2009) y (iii) combinar la progenie obtenida por sucesivos desoves (Lallias y col., 2010). Dado que en *V. pullastra* la proporción de sexos observada, tanto aquí como en el medio natural, es próxima al 50% (Pérez Camacho, 1980) y que la contribución desigual de las hembras parece uno de los principales factores que contribuyen a la reducción del tamaño efectivo, una estrategia basada en las modificaciones (ii) y (iii), como combinar de manera equitativa larvas producidas por sucesivos desoves de cada hembra debería ser ensayada.

## 6. Conclusiones





6.1. Se desarrolló un panel de 24 marcadores microsatélite en *V. pullastra* mediante la construcción de genotecas enriquecidas. Los microsatélites identificados permitieron realizar análisis de diversidad genética, estructura de población y paternidades, y serán útiles para futuros estudios genéticos en esta especie. Además, se optimizaron tres PCR *multiplex* que amplifican simultáneamente cinco u ocho *loci*, reduciendo el coste y el tiempo requerido para el genotipado de estos marcadores.

6.2. Se desarrolló un nuevo marcador mitocondrial (CitB) que resultó más variable que los otros dos marcadores mitocondriales utilizados (COI y 16S), ampliando las regiones mitocondriales donde evaluar la diversidad genética.

6.3. Las localidades examinadas presentaron niveles de diversidad genética similares en los marcadores microsatélite pero fluctuaciones destacables en los mitocondriales. Globalmente el nivel de diversidad genética de *V. pullastra* es moderado, encontrándose en el rango o por debajo del descrito en otras especies de almeja.

6.4. El análisis de microsatélites puso de manifiesto la existencia de estructuración genética en la Península Ibérica. No se detectó heterogeneidad entre las localidades de Galicia pero sí una alta diferenciación genética entre éstas y la localidad portuguesa de Faro. Las dos regiones deberían ser gestionadas por separado, evitando el traslado de almejas entre ellas.

6.5. La presencia en Faro de alelos privados en dos *loci* microsatélite permite identificar las almejas de esta localidad, lo cual supone disponer de marcadores específicos de población, poco frecuentes en bivalvos. Dada la distancia entre Galicia y Faro debería analizarse la estructura de población a una escala más fina para determinar el alcance del poder de discriminación de los alelos identificados.

6.6. El ADNmt no reflejó de manera consistente la diferenciación genética detectada con los microsatélites, pero puso en evidencia una diferenciación genética significativa entre las localidades gallegas de Barallobre y O Grove.

6.7. Mediante análisis de paternidades se estima que el tamaño efectivo de reproductores utilizados en el criadero para la producción de semilla es un 40% menor que el tamaño censal. El valor estimado del tamaño efectivo de reproductores supone un

incremento de endogamia por generación bajo (0,6) pero resulta insuficiente para evitar la pérdida de alelos a baja frecuencia ( $\leq 0,01$ ). La reducción del tamaño efectivo de reproductores puede atribuirse en gran medida a la ausencia de contribución y a una contribución desigual de los reproductores, siendo las hembras las que muestran mayor sesgo.

6.8. El lote de reproductores utilizado en el criadero puede considerarse representativo de las almejas de la costa gallega. La semilla producida difiere significativamente de todas las localidades analizadas pero el grado de diferenciación genética es bajo.

6.9. El análisis de la semilla por grupos de tamaño indicó que la semilla pequeña difiere de la mediana y grande, caracterizándose por una menor riqueza alélica, mayor coeficiente de parentesco, presencia de desequilibrio de ligamiento y mayor diferenciación genética respecto a los progenitores y a las muestras examinadas del medio natural. Su uso individualizado en un programa de repoblación incrementaría el riesgo de impacto genético y su descarte acentuaría el sesgo en la representación de los padres y la pérdida de diversidad genética parental.

6.10. La calidad genética de la semilla analizada es superior a la descrita en otros bivalvos y permite prever que se pueda llegar a alcanzar un nivel de calidad óptimo para programas de repoblación con mínimo impacto genético. Para ello, deberían adoptarse en el criadero estrategias que aumenten el número de reproductores y equilibren la contribución de los mismos, especialmente de las hembras. Las herramientas moleculares y los datos genéticos proporcionados en este trabajo permitirán evaluar el éxito de las estrategias que se adopten.

## 7. Bibliografía



- 
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Amos W, Balmford A (2001) When does conservation genetics matter? *Heredity* 87, 257-265.
- 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.
- Arias A, Fernandez-Moreno M, Fernandez-Tajes J, Gaspar MB, Mendez J (2011) 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, Mendez 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-Perez A, Fernandez-Tajes J, Gaspar MB, Mendez 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.
- Arif IA, Khan HA (2009) Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation* 32, 9-17.
- Arruda CCB, Beasley CR, Vallinoto M, Marques-Silva ND, Tagliaro CH (2009) Significant genetic differentiation among populations of *Anomalocardia brasiliiana* (Gmelin, 1791): a bivalve with planktonic larval dispersion. *Genetics and Molecular Biology* 32, 423-430.
- 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 (2004) *Molecular markers, natural history and evolution* (2nd edition). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Babbucci M, Buccoli S, Cau A, y col. (2010) Population structure, demographic history, and selective processes: contrasting evidences from mitochondrial and nuclear markers in the European spiny lobster *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 1040-1050.
- Baker P, Austin JD, Bowen BW, Baker SM (2008) Range-wide population structure and history of the northern quahog (*Merceneria merceneria*) inferred from mitochondrial DNA sequence data. *ICES Journal of Marine Science* 65, 155-163.

- Baker P, Rocha C, Bowen B, y col. (2004) Mitochondrial genetic variability of cultured versus wild northern hard clams *Mercenaria mercenaria*. *Journal of Shellfish Research* 1, 281.
- Balaresque P (2007) Microsatellites: life cycle concept and neutrality issues. *Medecine/ Sciences* 23, 729-734.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohlf A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48.
- Beaumont AR, Hoare K (2003) *Biothechnology and genetics in fisheries and aquaculture*. Blackwell Publishing, Oxford.
- 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.
- Belkhir K, Castric V, Bonhomme F (2002) IDENTIX, a software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Molecular Ecology Notes* 2, 611-614.
- Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27, 573-580.
- Bert TM, Crawford CR, Tringali MD, y col. (2007) Genetic management of hatchery-based stock enhancement. En: *Ecological and genetic implications of aquaculture activities* (ed. Bert TM), pp. 123-174. Springer, New York.
- Billote N, Lagoda P, 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, Maruyama T, Fuerst P (1983) An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics* 103, 513-527.
- Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research* 27, 1767-1780.
- Borrell YJ, Gallego V, García-Fernández C, y col. (2011) Assessment of parental contributions to fast- and slow-growing progenies in the sea bream *Sparus aurata* L. using a new multiplex PCR. *Aquaculture* 314, 58-65.
- Borsa P, Jarne P, Belkhir K, Bonhomme F (1994) Genetic-structure of the palourde *Ruditapes decussatus* L. in the Mediterranean. En: *Genetics and evolution of aquatic organisms* (ed. Beaumont AR), pp. 103-113. Chapman & Hall, London.
- Borsa P, Zainuri M, Delay B (1991) Heterozygote deficiency and population structure in the bivalve *Ruditapes decussatus*. *Heredity* 66, 1-8.

- 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.
- Boudry P, Collet B, Cornette F, Hervouet V, Bonhomme F (2002) High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture* 204, 283-296.
- Boudry P, Heurtebise S, Collet B, Cornette F, Gerard A (1998) Differentiation between populations of the Portuguese oyster, *Crassostrea angulata* (Lamarck) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), revealed by mtDNA RFLP analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 226, 279-291.
- 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.
- Brookfield JFY (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5, 453-455.
- Brownlow RJ, Dawson DA, Horsburgh GJ, Bell JJ, Fish JD (2008) A method for genotype validation and primer assessment in heterozygote-deficient species, as demonstrated in the prosobranch mollusc *Hydrobia ulvae*. *BMC Genetics* 9, 55.
- Camara MD, Vadopalas B (2009) Genetic aspects of restoring Olympia oysters and other native bivalves: balancing the need for action, good intentions, and the risks of making things worse. *Journal of Shellfish Research* 28, 121-145.
- Canapa A, Marota I, Rollo F, Olmo E (1996) Phylogenetic analysis of Veneridae (Bivalvia): comparison of molecular and palaeontological data. *Journal of Molecular Evolution* 43, 517-522.
- Canapa A, Schiaparelli S, Marota I, Barucca M (2003) Molecular data from the 16S rRNA gene for the phylogeny of Veneridae (Mollusca: Bivalvia). *Marine Biology* 142, 1125-1130.
- Carlsson J (2008) Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* 99, 616-623.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967) Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19, 233-257.
- Cerviño Otero A (2011) Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). Tesis de doctorado, Universidad de Santiago de Compostela.
- 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 Part 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.
- Chevassus B (1989) Genetic aspects of the foundation of hatchery populations for stocking use. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 314, 146-168.
- Chiesa S, Marzano FN, Minervini G, y col. (2011) The invasive Manila clam *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve, 1850) in Northern Adriatic Sea: population genetics assessed by an integrated molecular approach. *Fisheries Research* 110, 259-267.
- 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.
- Cochrane KL (2002) Fisheries management. En: *A fishery manager's guidebook. Management measures and their application* (ed. Cochrane KL), pp. 1-20. FAO Fisheries Technical Paper No. 424. FAO, Roma.
- Cordero D, Pena JB, Saavedra C (2008) Polymorphisms at three introns in the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) and the grooved carpet-shell clam (*R. decussatus*). *Journal of Shellfish Research* 27, 301-306.
- Cross I, Rebordinos L, Díaz E (2006) Species identification of *Crassostrea* and *Ostrea* oysters by polymerase chain reaction amplification of the 5S rRNA gene. *Journal of AOAC International* 89, 144-148.
- Coyle T (1998) Stock identification and fisheries management: the importance of using several methods in a stock identification study. En: *Taking stock: defining and managing shared resources* (ed. Hancock DA), pp. 173-182. Australian Society for Fishery Biology, Sydney.
- Crow JF, Kimura M (1970) *An introduction to population genetics theory*. Harper and Row, New York.
- Cruz F, Perez M, Presa P (2005) Distribution and abundance of microsatellites in the genome of bivalves. *Gene* 346, 241-247.
- 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, y col. (2011) Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* 12, 499-510.



- Diekmann OE, Coyer JA, Ferreira J, y col. (2005) Population genetics of *Zostera noltii* along the west Iberian coast: consequences of small population size, habitat discontinuity and near-shore currents. *Marine Ecology Progress Series* 290, 89-96.
- 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 Rías (NW Iberian estuaries). *Aquaculture* 287, 278-285.
- Dong SR, Kong J, Zhang TS, Meng XH, Wang RC (2006) Parentage determination of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* 258, 283-288.
- Doucet-Beaupre H, Breton S, Chapman EG, y col. (2010) Mitochondrial phylogenomics of the Bivalvia (Mollusca): searching for the origin and mitogenomic correlates of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *BMC Evolutionary Biology* 10:50.
- Earl DA, von Holdt BM (2012) Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4, 359-361.
- Edmands S, Timmerman CC (2003) Modeling factors affecting the severity of outbreeding depression. *Conservation Biology* 17, 883-892.
- 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.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92, 832-839.
- Ellegren H (2000) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics* 16, 551-558.
- English LJ, Maguire GB, Ward RD (2000) Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia. *Aquaculture* 187, 283-298.
- Estoup A, Angers, B (1998) Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. En: *Advances in Molecular Ecology* (ed. Carvahlo G), pp. 55-86. IOS Press, Amsterdam.

- 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.
- Evans B, Bartlett J, Sweijd N, Cook P, Elliott NG (2004) Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture* 233, 109-127.
- Ewens WJ (1972) Sampling theory of selectively neutral alleles. *Theoretical Population Biology* 3, 87-112.
- 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.
- Falconer DS (1989) Introduction to quantitative genetics (3rd edition). Longman, New York.
- Fay JC, Wu CI (2000) Hitchhiking under positive Darwinian selection. *Genetics* 155, 1405-1413.
- Feldheim KA, Brown JE, Murphy DJ, Stepien CA (2011) Microsatellite loci for dreissenid mussels (Mollusca: Bivalvia: Dreissenidae) and relatives: markers for assessing exotic and native populations. *Molecular Ecology Resources* 11, 725-732.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Ferguson A, Taggart JB, Prodohl PA, y col. (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.
- Fernandez A, Garcia T, Asensio L, y col. (2000) Identification of the clam species *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell), *Venerupis pullastra* (pullet carpet shell), and *Ruditapes philippinarum* (Japanese carpet shell) by PCR-RFLP. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3336-3341.
- Fernandez A, Garcia T, Asensio L, y col. (2001) PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species. *Journal of Food Science* 66, 657-661.
- Fernandez A, Garcia T, Gonzalez I, y col. (2002a) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a 16S rRNA gene fragment for authentication of four clam species. *Journal of Food Protection* 65, 692-695.

- Fernandez A, Garcia T, Asensio L, y col. (2002b) Genetic differentiation between the clam species *Ruditapes decussatus* (grooved carpet shell) and *Venerupis pullastra* (pullet carpet shell) by PCR-SSCP analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82, 881-885.
- Fernandez-Tajes J, Arias-Perez A, Gaspar MB, Mendez J (2012) Identification of *Ensis siliqua* samples and establishment of the catch area using a species-specific microsatellite marker. *Journal of AOAC International* 95, 820-823.
- Fernandez-Tajes J, Freire R, Mendez J (2010) A simple one-step PCR method for the identification between European and American razor clams species. *Food Chemistry* 118, 995-998.
- Fernandez-Tajes J, Mendez 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.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3, 294-299.
- Fraga F, Mouriño C, Manriquez M (1982) Las masas de agua en la costa de Galicia: junio-octubre. *Resultados de Expediciones Científicas* 10, 51-77.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham R, Ballou JD, Eldridge MDB, y col. (2011) Predicting the probability of outbreeding depression. *Conservation Biology* 25, 465-475.
- Frost LA, Evans BS, Jerry DR (2006) Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 261, 1056-1064.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915-925.
- Fujii T, Nishida M (1997) High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science* 63, 906-910.
- Gaffney PM (1994) Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: more light? En: *Genetics and evolution of aquatic organisms* (ed.: Beaumont AR), pp. 146-153. Chapman & Hall, London.
- Gaffney PM (2006) The role of genetics in shellfish restoration. *Aquatic Living Resources* 19, 277-282.

- Gaffney PM, Davis CV, Hawes RO (1992) Assessment of drift and selection in hatchery populations of oysters (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture* 105, 1-20.
- Galili T (2010) *Post hoc* analysis for Friedman's Test (R code). R-statistics blog [online]. [Consultado 31/08/2012]. Disponible en <http://www.r-statistics.com/2010/02/post-hoc-analysis-for-friedmans-test-r-code/>.
- Galtier N, Nabholz B, Glemin S, Hurst GDD (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18, 4541-4550.
- Gastier JM, Pulido JC, Sunden S, y col. (1995) Survey of trinucleotide repeats in the human genome: assessment of their utility as genetic markers. *Human Molecular Genetics* 4, 1829-1836.
- Gharbi A, Chatti N, Said K, Van Wormhoudt A (2010) Genetic variation and population structure of the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* along the Tunisian coast inferred from mtDNA and ITS1 sequence analysis. *Biologia* 65, 688-696.
- Gharbi A, Zitari-Chatti R, Van Wormhoudt A, y col. (2011) Allozyme variation and population genetic structure in the carpet shell clam *Ruditapes decussatus* across the Siculo-Tunisian Strait. *Biochemical Genetics* 49, 788-805.
- Goldstein DB, Clark AG (1995) Microsatellite variation in North-American populations of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research* 23, 3882-3886.
- Gosling E, Astanei I, Was A (2008) Genetic variability in Irish populations of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: discordant estimates of population differentiation from allozymes and microsatellites. *Freshwater Biology* 53, 1303-1315.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Institut d'Ecologie, Université de Lausanne.
- Grant WS, Bowen BW (1998) Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The American Genetic Association* 89, 415-426.
- Grobler JP, Jones JW, Johnson NA, Neves RJ, Hallerman EM (2011) Homogeneity at nuclear microsatellite loci masks mitochondrial haplotype diversity in the endangered fanshell pearly mussel (*Cyprogenia stegaria*). *Journal of Heredity* 102, 196-206.
- Guerra-Díaz A (2012) Clam production and cultivation in Galicia (NW Spain): the role of hatcheries. En: *Clam fisheries and aquaculture* (ed. Da Costa F), pp. 255-272. Nova Science Publishers, New York.
- Guo SW, Thompson EA (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48, 361-372.

- Hall 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.
- Halliburton R (2004) Introduction to population genetics. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New York.
- Hancock JM (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms En: Microsatellites: evolution and applications (eds. Goldstein DB, Schlötterer C), pp. 1-9. Oxford University Press, Oxford.
- Harris H (1966) Enzyme polymorphisms in man. Proceedings of the Royal Society B164, 298-310.
- Hartl DL, Clark AG (2007) Principles of population genetics (4th edition) Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hedgecock D (1994) Does variance in reproductive success limit effective population sizes of marine organisms? En: Genetics and evolution of aquatic organisms, pp. 122-134. Chapman & Hall, London.
- Hedgecock D, Coykendall K (2007) Genetic risks of marine hatchery enhancement: the good, the bad, and the unknown. En: Ecological and genetic implications of aquaculture activities (Ed. Bert T), pp. 85-101. Springer, New York.
- Hedgecock D, Launey S, Pudovkin AI, y col. (2007) Small effective number of parents (N-b) inferred for a naturally spawned cohort of juvenile European flat oysters *Ostrea edulis*. Marine Biology 150, 1173-1182.
- 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.
- Helm MM, Bourne N (2006) Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Documento Técnico de Pesca No. 471. (ed. Lovatelli A). FAO, Roma.
- Hoeh WR, Stewart DT, Sutherland BW, Zouros E (1996) Multiple origins of gender-associated mitochondrial DNA lineages in bivalves (Mollusca: Bivalvia). Evolution 50, 2276-2286.
- Hoffman JI (2009) A panel of new microsatellite loci for genetic studies of Antarctic fur seals and other otariids. Conservation Genetics 10, 989-992.
- Hollander M, Wolfe DA (1999) Nonparametric statistical methods (2nd edition). John Wiley & Sons, New York.
- Holleley CE, Geerts PG (2009) Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. Biotechniques 46, 511-517.

- Insua A, Thiriot-Quiévreux C (1992) Karyotypes of *Cerastoderma edule*, *Venerupis pullastra* and *Venerupis rhomboides* (Bivalvia, Veneroidea). *Aquatic Living Resources* 5, 1-8.
- Jarne P, Berrebi P, Guelorget O (1988) Genetic and morphometric variability of 5 populations of the clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca, Bivalvia). *Oceanologica Acta* 11, 401-407.
- Jerry DR, Preston NP, Crocos PJ, y col. (2004) Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers (Bate). *Aquaculture* 235, 237-247.
- Joaquim S, Pereira J, Leitao A, y col. (2010) Genetic diversity of two Portuguese populations of the pullet carpet shell *Venerupis senegalensis*, based on RAPD markers: contribution to a sustainable restocking program. *Helgoland Marine Research* 64, 289-295.
- Johnson MS (2000) Measuring and interpreting genetic structure to minimize the genetic risks of translocations. *Aquaculture Research* 31, 133-143.
- Jones AG, Small CM, Paczolt KA, Ratterman NL (2010) A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10, 6-30.
- Jones DB, Zenger KR, Jerry DR (2011) In silico whole-genome EST analysis reveals 2322 novel microsatellites for the silver-lipped pearl oyster, *Pinctada maxima*. *Marine Genomics* 4, 287-290.
- Jordaens K, De Wolf H, Willems T, y col. (2000) Loss of genetic variation in a strongly isolated Azorean population of the edible clam, *Tapes decussatus*. *Journal of Shellfish Research* 19, 29-34.
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16, 1099-1106.
- Karagyozov L, Kalcheva ID, Chapman VM (1993) Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research* 21, 3911-3912.
- Karaket T, Poompuang S (2012) CERVUS vs. COLONY for successful parentage and sibship determinations in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* de Man. *Aquaculture* 324, 307-311.
- Kashi Y, King D, Soller M (1997) Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in Genetics* 13, 74-78.
- Kijas JMH, Fowler JCS, Garbett CA, Thomas MR (1994) Enrichment of microsatellites from the citrus genome using biotinylated oligonucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Biotechniques* 16, 656-660.

- Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49, 725-738.
- 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.
- Kliman R, Sheehy B, Schultz J (2008) Genetic drift and effective population size. *Nature Education* 1:3.
- Ladoukakis ED, Saavedra C, Magoulas A, Zouros E (2002) Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. *Molecular Ecology* 11, 755-769.
- Ladoukakis ED, Zouros E (2001) Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 18, 1168-1175.
- Lallias D, Boudry P, Lapegue S, King JW, Beaumont AR (2010) Strategies for the retention of high genetic variability in European flat oyster (*Ostrea edulis*) restoration programmes. *Conservation Genetics* 11, 1899-1910.
- 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.
- Lewontin RC, Hubby JL (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations.II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54, 595-609.
- Li G, Hedgecock D (1998) Genetic heterogeneity, detected by PCR-SSCP, among samples of larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) supports the hypothesis of large variance in reproductive success. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, 1025-1033.
- Li H, Liang Y, Sui L, Gao X, He C (2011) Characterization of 10 polymorphic microsatellite markers for Mediterranean blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by EST database mining and cross-species amplification. *Journal of Genetics* 90, E30-E33.
- Li J-J, Li Q, Kong L-F (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in the xishishe clam *Coelomactra antiquata* (Bivalvia: Veneroidea). *Conservation Genetics* 9, 453-455.
- Li Q, Kijima A (2006) Microsatellite analysis of gynogenetic families in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 331, 1-8.

- Li RH, L Q, Yu RH (2009) Parentage determination and effective population size estimation in mass spawning Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, based on microsatellite analysis. *Journal of the World Aquaculture Society* 40, 667-677.
- Li W-H (1997) *Molecular evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- 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.
- Lian CL, Zhou ZH, Hogetsu T (2001) A simple method for developing microsatellite markers using amplified fragments of inter-simple sequence repeat (ISSR). *Journal of Plant Research* 114, 381-385.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lind CE, Evans BS, Knauer J, Taylor JJU, Jerry DR (2009) Decreased genetic diversity and a reduced effective population size in cultured silver-lipped pearl oysters (*Pinctada maxima*). *Aquaculture* 286, 12-19.
- Liu J, Li Q, Kong L-F (2009) Isolation and characterization of 13 microsatellite loci in the pen shell *Atrina pectinata* (Bivalvia: Pinnidae). *Conservation Genetics* 10, 1369-1371.
- Liu W-D, Li H-J, Bao X-B, y col. (2010) Genetic differentiation between natural and hatchery stocks of Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) as revealed by AFLP analysis. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 3933-3941.
- Liu X, Zhao G, Wang Z, y col. (2012) Parentage assignment and parental contribution analysis in large yellow croaker *Larimichthys crocea* using microsatellite markers. *Current Zoology* 58, 244-249.
- Liu XQ, Bao ZM, Hu JJ, y col. (2007) AFLP analysis revealed differences in genetic diversity of four natural populations of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in China. *Acta Oceanologica Sinica* 26, 150-158.
- Liu ZJ, Cordes JF (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1-37.
- Lopez-Piñón MJ, Insua A, Mendez J (2002) Identification of four scallop species using PCR and restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region. *Marine Biotechnology* 4, 495-502.
- Lu X, Wang H, Liu B, Lin Z (2012) Microsatellite-based genetic and growth analysis for a diallel mating design of two stocks of the clam, *Meretrix meretrix*. *Aquaculture Research* 43, 260-270.
- Lukoschek V, Waycott M, Keogh JS (2008) Relative information content of polymorphic microsatellites and mitochondrial DNA for inferring dispersal and



- population genetic structure in the olive sea snake, *Aipysurus laevis*. *Molecular Ecology* 17, 3062-3077.
- Lunt DH, Hutchinson WF, Carvalho GR (1999) An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Molecular Ecology* 8, 891-893.
- MacAvoy ES, Wood AR, Gardner JPA (2008) Development and evaluation of microsatellite markers for identification of individual Greenshell (TM) mussels (*Perna canaliculus*) in a selective breeding programme. *Aquaculture* 274, 41-48.
- Mao Y, Gao T, Yanagimoto T, Xiao Y (2011) Molecular phylogeography of *Ruditapes philippinarum* in the Northwestern Pacific Ocean based on COI gene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 407, 171-181.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7, 639-655.
- Martinez L, Arias A, Mendez 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.
- Martinez L, Mendez J, Insua A, Arias-Perez A, Freire R (2013) Genetic diversity and population differentiation in the cockle *Cerastoderma edule* estimated by microsatellite markers. *Helgoland Marine Research* 67, 179-189.
- Martinez Patiño D, Cerviño Otero A, Louzán A, y col. (2008) Producción de especies de interés marisquero en la Planta de Cultivos de Ribadeo. II Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura, Cumaná, Venezuela.
- Moraga D (1986) Genetic polymorphism of cultivated populations of the Manila clam, *Tapes philippinarum*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III-Sciences de la Vie-Life Sciences* 302, 621-624.
- Morgante M, Hanafey M, Powell W (2002) Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* 30, 194-200.
- Morgante M, Vogel JM (1996) Modified amplified fragment length polymorphism assay for detection of polymorphism in microsatellite regions. En: *International Patent Publication*. No.WO96/17082.
- Mura L, Cossu P, Cannas A, y col. (2012) Genetic variability in the Sardinian population of the manila clam, *Ruditapes philippinarum*. *Biochemical Systematics and Ecology* 41, 74-82.
- Murakami-Sugihara N, Furota T, Okamoto K (2012) Genetic structure of the exotic hard clam *Mercenaria mercenaria* in Tokyo Bay, determined using mitochondrial DNA. *Fisheries Science* 78, 569-575.

- Neff BD, Gross MR (2001) Microsatellite evolution in vertebrates: inference from AC dinucleotide repeats. *Evolution* 55, 1717-1733.
- Nei M (1977) F-Statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics* 41, 225-233.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- Nei M (1987) *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nóvoa S (2007) Metabolismo lipídico, ácidos grasos en el cultivo larvario de almeja babosa, "*Venerupis pullastra*" (Montagu, 1803), calidad ovocitaria, larvaria y nutricional con una aproximación al uso de la microencapsulación lipídica. Tesis de doctorado, Universidad de Santiago de Compostela.
- Ostrander EA, Jong PM, Rine J, Duyk G (1992) Construction of small-insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 3419-3423.
- Paetkau D (1999) Microsatellites obtained using strand extension: an enrichment protocol. *Biotechniques* 26, 690-697.
- Palumbi SR (1996) Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. En: *Molecular systematics*, (2nd edition, eds. Hillis DM, Moritz C, Mable BK), pp. 205-248. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Pampoulie C, Jorundsdottir TD, Steinarsson A, y col. (2006) Genetic comparison of experimental fanned strains and wild Icelandic populations of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* 261, 556-564.
- Park GM, Chung EY, Hur SB (2002) Genetic characters of the Korean shortnecked clam *Ruditapes philippinarum* based on ITS2 and mtCOI gene sequences. *Korean Journal of Genetics* 24, 51-58.
- Park SDE (2001) Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Tesis de doctorado, Universidad de Dublin.
- Passamonti M, Mantovani B, Scali V (1997) Allozymic characterization and genetic relationships among four species of Tapetinae (Bivalvia, Veneridae). *Italian Journal of Zoology* 64, 117-124.
- Passamonti M, Mantovani B, Scali V (1999) Allozymic analysis of some Mediterranean Veneridae (Mollusca: Bivalvia): preliminary notes on taxonomy and systematics of the family. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 79, 899-906.

- Passamonti M, Scali V (2001) Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia). *Current Genetics* 39, 117-124.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
- Pérez Camacho A (1980) Biología de *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803) y *Venerupis decussata* (Linné, 1767) (Mollusca: Bivalvia) con especial referencia a factores determinantes de la producción. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 5, 43-76.
- Pérez Camacho A (2007) El cultivo de bivalvos en Galicia: entre el paradigma y la entelequia. XI Congreso Nacional de Acuicultura, Vigo.
- Pérez Camacho A, Román G, Torre M (1977) Experiencias en cultivos de larvas de tres especies de moluscos bivalvos: *Venerupis pullastra* (Montagu), *Venerupis decussata* (Linnaeus) y *Ostrea edulis* (Linnaeus). *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 235, 215-268.
- Petersen JL, Ibarra AM, May B (2009) Thirty-seven additional microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and cross-amplification in other pectinids. *Conservation Genetics Resources* 1, 101-105.
- Petersen JL, Ibarra AM, Ramirez JL, May B (2008) An induced mass spawn of the hermaphroditic lion-paw scallop, *Nodipecten subnodosus*: genetic assignment of maternal and paternal parentage. *Journal of Heredity* 99, 337-348.
- 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, Rolan-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.
- 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.
- Queller DC, Goodnight KF (1989) Estimating relatedness using genetic-markers. *Evolution* 43, 258-275.
- R Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19, 2092-2100.

- Rayment, W. (2007) *Venerupis senegalensis*. Pullet carpet shell. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Sub-programme [on-line]. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom. [Consultado 25/04/2013]. Disponible en: <http://www.marlin.ac.uk/reproduction.php?speciesID=4565>.
- Raymond M, Vaanto RL, Thomas F, y col. (1997) Heterozygote deficiency in the mussel *Mytilus edulis* species complex revisited. Marine Ecology Progress Series 156, 225-237.
- Reece KS, Ribeiro WL, Gaffney PM, Carnegie RB, Allen SK (2004) Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios. Journal of Heredity 95, 346-352.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43, 223-225.
- Rokas A, Ladoukakis E, Zouros E (2003) Animal mitochondrial DNA recombination revisited. Trends in Ecology and Evolution 18, 411-417.
- Rolan Mosquera E, Otero Schmitt J, Rolan Alvarez E (1989) Moluscos de la Ría de Vigo II. Poliplacóforos, Bivalvos, Escafópodos, Cefalópodos. Thalassas: Revista de Ciencias del Mar 7, Anexo 2.
- Roodt-Wilding R (2007) Abalone ranching: a review on genetic considerations. Aquaculture Research 38, 1229-1241.
- Ross CL, Dyer KA, Erez T, y col. (2003) Rapid divergence of microsatellite abundance among species of *Drosophila*. Molecular Biology and Evolution 20, 1143-1157.
- Ross PM, Hogg ID, Pilditch CA, Lundquist CJ, Wilkins RJ (2012) Population genetic structure of the New Zealand estuarine clam *Austrovenus stutchburyi* (Bivalvia: Veneridae) reveals population subdivision and partial congruence with biogeographic boundaries. Estuaries and Coasts 35, 143-154.
- Rousset F (2007) Inferences from spatial population genetics. En: Handbook of statistical genetics (3rd edition, eds. Balding DJ, Bishop M, Cannings C), pp. 945-979. Wiley, Chichester.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology (eds. Krawetz S, Misener S), pp. 365-386. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Saavedra C (2007) Recursos genéticos de moluscos y acuicultura. En: Genética y genómica en acuicultura (ed. Espinosa de los Monteros J.), pp. 67-112. Observatorio Español de Acuicultura, Madrid.
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4, 406-425.

- Santaclara FJ, Espiñeira M, Cabado G, y col. (2006) Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 8461-8470.
- Sato M, Kawamata K, Zaslavskaya N, y col. (2005) Development of microsatellite markers for Japanese scallop (*Mizuhopecten yessoensis*) and their application to a population genetic study. *Marine Biotechnology* 7, 713-728.
- Schlötterer C (1998) Microsatellites. En: *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach* (ed. Hoelzel AR), pp. 237-261. Oxford University Press, New York.
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109, 365-371.
- Schug MD, Hutter CM, Wetterstrand KA, y col. (1998) The mutation rates of di-, tri- and tetranucleotide repeats in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution* 15, 1751-1760.
- Sekino M, Saitoh K, Yamada T, y col. (2003) Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture* 221, 255-263.
- Sellas AB, Wells RS, Rosel PE (2005) Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal fine scale geographic structure in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) in the Gulf of Mexico. *Conservation Genetics* 6, 715-728.
- 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 (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.
- Sobrino B, Brion M, Carracedo A (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International* 154, 181-194.
- Sotelo G, Posada D, Moran P (2009) Low-mitochondrial diversity and lack of structure in the velvet swimming crab *Necora puber* along the Galician coast. *Marine Biology* 159, 1039-1048.
- Sunnucks P (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15, 199-203.

- Tang B, Huang YH, Lin L, y col. (2003) Isolation and characterization of 70 novel microsatellite markers from ostrich (*Struthio camelus*) genome. *Genome* 46, 833-840.
- Tanguy A, Bierne N, Saavedra C, y col. (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.
- Taniguchi N (2003) Genetic factors in broodstock management for seed production. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13, 177-185.
- 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.
- Taris N, Ernande B, McCombie H, Boudry P (2006) Phenotypic and genetic consequences of size selection at the larval stage in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 333, 147-158.
- 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.
- Tave D (1999) Inbreeding and brood stock management. Fisheries Technical Paper No. 392. FAO, Roma.
- Tebble N (1966) British bivalve seashells: a handbook for identification. Trustees of The British Museum (Natural History), Oxford.
- 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) ClustalW: 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.
- Toews DPL, Brelsford A (2012) The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology* 21, 3907-3930.
- Tóth G, Gaspari Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10, 967-981.

- 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.
- Vandeputte M, Rossignol MN, Pincent C (2011) From theory to practice: empirical evaluation of the assignment power of marker sets for pedigree analysis in fish breeding. *Aquaculture* 314, 80-86.
- Vargas K, Asakura Y, Ikeda M, y col. (2008) Allozyme variation of littleneck clam *Ruditapes philippinarum* and genetic mixture analysis of foreign clams in Ariake Sea and Shiranui Sea off Kyushu Island, Japan. *Fisheries Science* 74, 533-543.
- Venetis C, Theologidis I, Zouros E, Rodakis GC (2006) No evidence for presence of maternal mitochondrial DNA in the sperm of *Mytilus galloprovincialis* males. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273, 2483-2489.
- 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.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, y col. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414.
- Wachirachaikarn A, Prakoon W, Nguyen TTT, Prompakdee W, Na-Nakorn U (2011) Loss of genetic variation of *Phalacronotus bleekeri* (Gunther, 1864) in the hatchery stocks revealed by newly developed microsatellites. *Aquaculture* 321, 298-302.
- 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 H, Huan P, Lu X, Liu B (2011) Mining of EST-SSR markers in clam *Meretrix meretrix* larvae from 454 shotgun transcriptome. *Genes and Genetic Systems* 86, 197-205.
- 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.
- Ward RD (2000) Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* 420, 191-201.
- Ward RD (2006) The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fisheries Research* 80, 9-18.
- Watterson GA (1978) Homozygosity test of neutrality. *Genetics* 88, 405-417.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.

- Westgaard JI, Tafese T, Wesmajervi MS, y col. (2007) Development of ten new EST-derived microsatellites in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Conservation Genetics* 8, 1503-1506.
- 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.
- Wilson AC (1985) The molecular basis of evolution. *Scientific American* 253, 164-173.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15, 323-354.
- Wright S (1978) *Evolution and the genetics of populations, vol. 4: variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago.
- Xu TJ, Sun YN, Yuan YT, Liao Z, Wang RX (2010) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the hard-shelled mussel, *Mytilus coruscus* (Mytilidae). *Genetics and Molecular Research* 9, 1388-1391.
- Xu ZK, Primavera JH, de la Pena LD, y col. (2001) Genetic diversity of wild and cultured black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture* 199, 13-40.
- 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.
- Yu DH, Chu KH (2006) Genetic variation in wild and cultured populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* from Southern China. *Aquaculture* 258, 220-227.
- Yu H, Li Q (2008) Exploiting EST databases for the development and characterization of EST-SSRs in the pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Journal of Heredity* 99, 208-214.
- Yuan T, He M, Huang L (2009) Intraspecific genetic variation in mitochondrial 16S rRNA and COI genes in domestic and wild populations of Huaguizhikong scallop *Chlamys nobilis* Reeve. *Aquaculture* 289, 19-25.
- Yuan Y, Li Q, Kong L, Zheng X (2010) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the grand jackknife clam *Solen grandis* (Bivalvia: Veneroida). *Genes and Genomics* 32, 191-197.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.
- Zitari-Chatti R, Chatti N, Fulgione D, y col. (2009) Mitochondrial DNA variation in the caramote prawn *Penaeus (Melicertus) kerathurus* across a transition zone in the Mediterranean Sea. *Genetica* 136, 439-447.



Zouros E, Foltz DW (1984) Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. *Malacologia* 25, 583-591.



**Anexos**



## ANEXO I

Motivos microsatélite encontrados. Clasificación según Chambers y MacAvoy, 2000.

<i>Locus</i>	Motivo Microsatélite	Clasificación
<b>Genoteca ATC</b>		
VpAT1-1	(ATG) <sub>6</sub>	P
VpAT1-6	(TGA) <sub>4</sub> ....(TGC) <sub>3</sub> TAC(TGA) <sub>4</sub> ....(TGA) <sub>9</sub> ...(TGA) <sub>4</sub>	CI
VpAT1-11	(ATG) <sub>6</sub>	P
VpAT1-12	(TGA) <sub>2</sub> G(TGA) <sub>5</sub>	PI
VpAT1-13	(ATG) <sub>4</sub> TTG(ATG) <sub>3</sub>	PI
VpAT1-15	(TCA) <sub>7</sub>	P
VpAT1-19	(TGA) <sub>5</sub> CAA(TGA) <sub>2</sub> CAATGC(TGA) <sub>4</sub> ...(TGA) <sub>5</sub>	PI
	(AAC) <sub>3</sub>	P
VpAT1-20	(ATC) <sub>3</sub> ACC(ATC) <sub>5</sub>	PI
VpAT1-29	(ATG) <sub>7</sub>	P
VpAT1-30	(TCA) <sub>3</sub> CCA(TCA) <sub>2</sub>	PI
	(CCA) <sub>5</sub>	P
VpAT1-31	(TCA) <sub>6</sub>	P
VpAT1-35	(TCA) <sub>3</sub> CCA(TCA) <sub>3</sub>	PI
VpAT1-48	(ATA) <sub>4</sub>	P
VpAT1-4	(TGA) <sub>4</sub>	P
VpAT1-16	(ATT) <sub>3</sub> AAC(ATT) <sub>2</sub>	PI
VpAT1-27	(TGA) <sub>2</sub> AGA(TGA) <sub>6</sub>	PI
VpAT1-36	(GAC) <sub>7</sub> (GAT) <sub>14</sub>	C
VpAT1-37	(GAT) <sub>6</sub>	P
VpAT1-40	(GAT) <sub>6</sub>	P
VpAT1-40	(ATC) <sub>4</sub> GCC(ATC) <sub>2</sub>	PI
VpAT1-50	(ATC) <sub>5</sub> ACC(AAC) <sub>3</sub>	CI

P: puro; PI: puro interrumpido; C: compuesto; CI: compuesto interrumpido; Cm: complejo y Cml: complejo interrumpido. En negrita se destaca la repetición del motivo microsatélite. En cursiva, los microsatélites para los que se diseñaron cebadores.

Continuación.

<b>Locus</b>	<b>Motivo Microsatélite</b>	<b>Clasificación</b>
VpAT1-51	(ATA) <sub>4</sub> AAGCTA(ATG) <sub>2</sub> ATA(ATG) <sub>8</sub> ATA(ATG) <sub>5</sub>	CI
VpAT1-53	(TGA) <sub>5</sub> (AAACC) <sub>3</sub>	P P
VpAT1-54	(CAT) <sub>3</sub> AAT(CAT) <sub>4</sub> ...(CAT) <sub>9</sub> ...(AAATC) <sub>4</sub> GATC(AATC) <sub>2</sub>	CI
VpAT1-56	(ATC) <sub>9</sub> ATTACC(ATC) <sub>2</sub>	PI
VpAT1-62	(TGA) <sub>2</sub> TGG(TGA) <sub>3</sub>	PI
VpAT1-63	(TGA) <sub>4</sub> TTA(TGA) <sub>5</sub>	PI
VpAT1-64	(ATC) <sub>2</sub> ATTATA(ATC) <sub>6</sub> ACTGTC(ATC) <sub>2</sub>	PI
VpAT1-65	(ATG) <sub>5</sub>	P
VpAT1-67	(ACG) <sub>3</sub>	P
VpAT1-68	(TGT) <sub>4</sub> ...(TGT) <sub>2</sub> ...(TGT) <sub>2</sub> ...(TGA) <sub>5</sub> ...(TGT) <sub>3</sub>	CI
VpAT1-72	(ATC) <sub>7</sub> (TTA) <sub>5</sub>	C
VpAT1-73	(TCA) <sub>4</sub> ...(CAT) <sub>6</sub>	CI
VpAT1-76	(TGA) <sub>5</sub>	P
VpAT1-77	(TGA) <sub>2</sub> AGA(TGA) <sub>4</sub>	PI
VpAT1-81	(ATC) <sub>8</sub>	P
VpAT1-85	(TCA) <sub>5</sub> TAA(TCA) <sub>4</sub>	PI
VpAT1-86	(ATC) <sub>8</sub> ...(ATC) <sub>3</sub> (ATT) <sub>3</sub>	CI
VpAT1-92	(TCA) <sub>3</sub> TTTTA(TCA) <sub>3</sub> ...(ATC) <sub>3</sub> AA(ATC) <sub>3</sub> (TGA) <sub>6</sub> TGG(TGA) <sub>3</sub>	CI PI
VpAT1-95	(TGT) <sub>5</sub> ...(TGA) <sub>3</sub> (TGT) <sub>3</sub> (TGA) <sub>4</sub> ...(TGT) <sub>3</sub> ...(TGA) <sub>7</sub> ...(TGA) <sub>3</sub> AGG(TGA) <sub>2</sub> (TGT) <sub>2</sub> (TGA) <sub>3</sub> ...(TGC) <sub>3</sub> (TGA) <sub>2</sub> ATATTT(TGA) <sub>5</sub> ...(TGT) <sub>2</sub> ...(TGA) <sub>3</sub> ...(TGA) <sub>2</sub>	Cml
VpAT1-97	(TGA) <sub>4</sub>	P
VpAT2-2	(AAT) <sub>4</sub> AAA(AAT) <sub>4</sub> AGT(AAT) <sub>2</sub> (GAT) <sub>6</sub> TATGAT(GGT) <sub>4</sub> (GAT) <sub>2</sub> ...(AAT) <sub>3</sub>	Cml
VpAT2-4	(ATC) <sub>2</sub> ATT(ATC) <sub>8</sub>	PI
VpAT2-8	(GAT) <sub>7</sub> (AAAT) <sub>3</sub>	P P

Continuación.		Clasificación
<i>Locus</i>	Motivo Microsatélite	
VpAT2-9	(GAT) <sub>4...</sub> (GAT) <sub>7</sub>	PI
VpAT2-10	(ATG) <sub>7</sub>	P
VpAT2-14	(ATG) <sub>3</sub> GCCG(ATG) <sub>3</sub>	PI
VpAT2-17	(GAT) <sub>2...</sub> (GAT) <sub>2</sub> GAC(GAT) <sub>5</sub>	PI
VpAT2-19	(ATG) <sub>3...</sub> (AT) <sub>4...</sub> (ATG) <sub>5</sub>	CI
VpAT2-24	(ATC) <sub>6</sub>	P
VpAT2-25	(CAT) <sub>4...</sub> (CAT) <sub>2...</sub> (CTT) <sub>2</sub> (CAT) <sub>2...</sub> (CAC) <sub>2...</sub> (CAT) <sub>4...</sub> (CAT) <sub>3...</sub> (CAT) <sub>3</sub> ...(CAT) <sub>6</sub> (CAC) <sub>5...</sub> (CAT) <sub>2</sub>	Cml
VpAT2-27	(TGA) <sub>2</sub> TGT(TGA) <sub>2...</sub> (TGA) <sub>2</sub> ATT(TGA) <sub>4</sub> TGT(TGA) <sub>2</sub>	PI
VpAT2-28	(CAT) <sub>5...</sub> (CAT) <sub>2</sub>	PI
VpAT2-30	(ATC) <sub>2...</sub> (ATC) <sub>2...</sub> (ATC) <sub>6</sub>	PI
VpAT2-36	(CAT) <sub>3...</sub> (CAT) <sub>3</sub> CA(CAT) <sub>5</sub>	PI
VpAT2-38	(ATC) <sub>8...</sub> (GAT) <sub>5</sub>	CI
VpAT2-39	(TCA) <sub>12</sub>	P
VpAT2-49	(TCA) <sub>6</sub>	P
	(AT) <sub>5</sub>	P
VpAT2-59	(GAT) <sub>5</sub> (TAT) <sub>3</sub>	C
VpAT2-61	(ATC) <sub>6</sub>	P
VpAT2-68	(TGA) <sub>4...</sub> (TGA) <sub>2</sub> TGG(TGA) <sub>2...</sub> (TGA) <sub>3</sub>	PI
VpAT2-74	(ATC) <sub>8</sub> AAAT(ATC) <sub>2</sub>	PI
VpAT2-81	(TGA) <sub>2</sub> AAA(TGA) <sub>7</sub>	PI
VpAT2-87	(GAT) <sub>3</sub> GGT(GAT) <sub>4</sub>	PI
VpAT2-96	(ATG) <sub>6</sub>	P
VpAT2-97	(TCA) <sub>8</sub>	P
Genoteca ACC		
VpAC1-2	(CCACC) <sub>3</sub>	P
VpAC1-10	(GTCT) <sub>3</sub> (GTCTG) <sub>2</sub>	C

<i>Locus</i>	Motivo Microsatélite	Clasificación
VpAC1-13	(TGG) <sub>5</sub>	P
VpAC1-23	(TAT) <sub>3</sub>	P
VpAC1-24	(GT) <sub>42</sub>	P
VpAC1-24	(ATG) <sub>3</sub>	P
VpAC1-44	(CTGT) <sub>2</sub> TCGTCCAC (CTGT) <sub>3</sub> CAGTCTGT	PI
VpAC1-48	(TGG) <sub>4</sub>	P
VpAC1-59	(TGT) <sub>3</sub>	P
VpAC1-59	(CCT) <sub>5</sub>	P
VpAC1-59	(TAAT) <sub>3</sub>	P
VpAC1-60	(CCACC) <sub>2</sub>	P
VpAC1-71	(ACAA) <sub>3</sub>	P
VpAC2-70	(TGG) <sub>3</sub>	P
VpAC1-88	(CCA) <sub>2</sub>	P
VpAC2-1	(GTG) <sub>2</sub> GAA (GTG) <sub>2</sub>	PI
VpAC2-6	(TG) <sub>7</sub> ...(TG) <sub>2</sub> CG (TG) <sub>2</sub> CG (TG) <sub>8</sub> ... (TG) <sub>7</sub> (CG) <sub>3</sub> ... (TG) <sub>4</sub>	CI
VpAC2-29	(TAA) <sub>3</sub>	P
VpAC2-34	(ATC) <sub>4</sub>	P
VpAC2-34	(ATG) <sub>4</sub> (GTG) <sub>4</sub> (TGT) <sub>3</sub>	Cm
VpAC2-35	(GTCC) <sub>3</sub>	P
VpAC2-43	(GACA) <sub>2</sub> CACA (GACA) <sub>3</sub>	PI
VpAC2-53	(GAAA) <sub>3</sub>	P
VpAC2-65	(CAT) <sub>2</sub> AAT (CAT) <sub>5</sub> ... (CAT) <sub>6</sub> CACAC (CAT) <sub>3</sub> ... (CAT) <sub>2</sub>	PI
VpAC2-69	(TGG) <sub>5</sub>	P
Genoteca CTGT		
VpTE-102	(TCCG) <sub>2</sub> ...(TCCG) <sub>3</sub>	PI
VpTE-103	(TGTC) <sub>3</sub>	P
VpTE-104	(AT) <sub>5</sub>	P



Continuación.

<i>Locus</i>	<b>Motivo Microsatélite</b>	<b>Clasificación</b>
VpTE-107	(ATG) <sub>3</sub> ACG(ATG) <sub>4</sub> TACTTT(TTG) <sub>5</sub> (ATG) <sub>3</sub>	CI
VpTE-110	(CAT) <sub>6</sub> CAAT(CAT) <sub>2</sub>	PI
VpTE-112	(GACA) <sub>3</sub> GACT(GACA) <sub>3</sub> GACT(GACA) <sub>2</sub> ...(GACA) <sub>2</sub>	PI
VpTE-113	(TC) <sub>5</sub>	P
VpTE-114	(GACA) <sub>3</sub>	P
VpTE-115	(TGTC) <sub>3</sub>	P
VpTE-123	(CTGT) <sub>3</sub>	P
VpTE-125	(GTCT) <sub>3</sub> (GCCT) <sub>2</sub> GGCT(GCCT) <sub>5</sub> GTCTCT(GTCT) <sub>5</sub> ATCT(GTCT) <sub>5</sub>	CI
VpTE-127	(TCTGT) <sub>2</sub> TCTG(TCTGT) <sub>2</sub>	PI
VpTE-129	(CTGT) <sub>3</sub>	P
VpTE-131	(GGAC) <sub>3</sub> (AGAC) <sub>2</sub>	C
VpTE-133	(GTCC) <sub>3</sub>	P
VpTE-134	(TGA) <sub>3</sub> TATGG(TGA) <sub>4</sub> ...(TGA) <sub>2</sub> TAAATGA(TAA) <sub>3</sub> TGG(TGA) <sub>2</sub> TAA(TGA) <sub>2</sub> ...(TGA) <sub>4</sub> (TGG) <sub>3</sub>	Cml
VpTE-136	(AGAC) <sub>3</sub>	P
VpTE-138	(CTGT) <sub>5</sub>	P
VpTE-139	(GACG) <sub>3</sub>	P
VpTE-140	(GACA) <sub>5</sub>	P
VpTE-141	(GTCC) <sub>2</sub> ...(GTCT) <sub>2</sub>	CI
VpTE-142	(ACGG) <sub>2</sub>	P
VpTE-143	(TGT) <sub>4</sub>	P
VpTE-152	(TCA) <sub>2</sub> ...(TCA) <sub>8</sub>	PI
VpTE-157	GTCT(GTCC) <sub>2</sub> (GTCT) <sub>3</sub>	CI
VpTE-158	(TGA) <sub>2</sub> TAA(TGA) <sub>6</sub>	PI
VpTE-159	(GACT) <sub>3</sub>	P
VpTE-162	(GTCG) <sub>3</sub>	P
VpTE-163	(AGAC) <sub>2</sub> ...(AGAC) <sub>2</sub>	PI
VpTE-166	(ATC) <sub>4</sub> AAC(ATC) <sub>2</sub>	PI

<i>Locus</i>	Motivo Microsatélite	Clasificación
VpTE-170	(TTG) <sub>9</sub> (TTA) <sub>4</sub> TT(ATC) <sub>8</sub> ACC(ATC) <sub>2</sub>	Cml
VpTE-172	(GAT) <sub>7</sub> AATGAT(GTT) <sub>4</sub> GCTAAC(GAT) <sub>5</sub> ...(GTT) <sub>5</sub> (GAT) <sub>3</sub> (GCT) <sub>4</sub> (GAT) <sub>9</sub> ... (GAT) <sub>3</sub> ...(GAT) <sub>3</sub> ...(GAT) <sub>2</sub> ...(GAT) <sub>6</sub> (GAT) <sub>2</sub> ...(GAT) <sub>3</sub> ...(GAT) <sub>2</sub> ...(GAT) <sub>4</sub>	Cml
VpTE-173	(CAT) <sub>11</sub> (TAT) <sub>4</sub> TGT(TAT) <sub>2</sub> ...(TAT) <sub>4</sub>	CI
VpTE-174	(GACA) <sub>3</sub> (GACC) <sub>5</sub> (GACA) <sub>4</sub>	C
VpTE-178	(ATC) <sub>7</sub> (AGC) <sub>5</sub>	C
VpTE-179	(CTGT) <sub>3</sub>	P
VpTE-180	(TGA) <sub>2</sub> AGA(TGA) <sub>4</sub>	PI
VpTE-181	(GAT) <sub>6</sub>	P
VpTE-183	(TGTC) <sub>4</sub>	P
VpTE-184	(CCGT) <sub>3</sub> ATGT(CTGT) <sub>2</sub> (CTGT) <sub>7</sub>	CI
VpTE-185	(ATG) <sub>2</sub> ATAAT(ATG) <sub>4</sub> GTG(ATG) <sub>2</sub> ...(ATG) <sub>4</sub> TTG(ATG) <sub>4</sub>	PI
VpTE-187	(CAT) <sub>6</sub>	P
VpTE-192	(GTCC) <sub>2</sub> (GTCT) <sub>2</sub> (GTCC) <sub>3</sub> (GTCT) <sub>2</sub>	C
VpTE-193	(TCTG) <sub>3</sub>	P
VpTE-199	(GACA) <sub>3</sub>	P
VpTE-201	(TGTC) <sub>5</sub>	P
VpTE-202	(ATG) <sub>2</sub> ...(ATG) <sub>6</sub>	PI
VpTE-203	(GACA) <sub>6</sub>	P
VpTE-212	(TCA) <sub>6</sub>	P
VpTE-215	(ATG) <sub>6</sub> ...(ATG) <sub>2</sub> ...(ATG) <sub>3</sub> ...(ATG) <sub>6</sub>	PI
VpTE-219	(TGTT) <sub>4</sub>	P
VpTE-221	(CTGT) <sub>3</sub>	P
VpTE-224	(CTGT) <sub>3</sub>	P
VpTE-226	(CAT) <sub>6</sub>	P
VpTE-227	(CTGT) <sub>3</sub> GTGAGT(CTGT) <sub>2</sub>	PI
VpTE-228	(AGAC) <sub>4</sub>	P

Continuación.

Continuación.

<i>Locus</i>	<b>Motivo Microsatélite</b>	<b>Clasificación</b>
VpTE-233	(TCA) <sub>4</sub> ...(ATG) <sub>4</sub>	CI
VpTE-241	(TGTC) <sub>3</sub>	P
VpTE-243	(AAG) <sub>4</sub>	P
VpTE-245	TATTAAT(TAT) <sub>3</sub> ...(CTCC) <sub>3</sub>	CI
VpTE-258	(TGA) <sub>8</sub> ...(TGA) <sub>3</sub> (TGG) <sub>4</sub> ...(TGA) <sub>2</sub> ...(TGA) <sub>3</sub> ...(TGA) <sub>2</sub> (TGA) <sub>3</sub>	CI
VpTE-263	(CTGT) <sub>2</sub> TTGTGT(CTGT) <sub>3</sub> (CT) <sub>8</sub> GCC(CT) <sub>2</sub>	CI
VpTE-264	(CAGA) <sub>2</sub> ...(CAGA) <sub>3</sub>	PI
VpTE-265	(CTGT) <sub>4</sub> (GTGT) <sub>2</sub>	C
VpTE-266	(CTGT) <sub>3</sub>	P
VpTE-274	(GACG) <sub>3</sub>	P
VpTE-275	(CGTC) <sub>3</sub> ...(TGTC) <sub>3</sub>	CI

**ANEXO II**

Sitios variables localizados en los 26 haplotipos definidos para el gen 16S

	Posición de la variación																																				
H	3	4	5	6	8	9	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3	6	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3					
A						1	2	4	8	0	4	2	3	6	7	7	1	5	6	6	7	7	8	0	9	3	3	3	3	5	5	7	9				
P																	6	3	2	7	5	6	9	7	3	2	3	6	0	2	1	5					
1	A	G	C	G	G	A	A	A	T	C	C	A	A	T	T	-	C	A	C	T	G	A	T	T	C	C	-	-	-	A	T	G	A				
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			
5	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.		
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
8	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		
9	.	C	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
10	.	.	.	C	.	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
11	.	.	.	C	T	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
12	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
13	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
15	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19	.	C	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
20	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.
21	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
23	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	G	.	G	.	.	G	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
24	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.
25	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.
26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

## ANEXO III

Sitios variables localizados en los 16 haplotipos definidos para el gen CitB.

		<b>Posición de la variación</b>																		
<b>H</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
<b>A</b>							<b>2</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>9</b>
<b>P</b>										<b>6</b>	<b>9</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>7</b>
<b>1</b>	T	G	A	G	T	C	T	T	C	G	C	A	T	C	C	G	A	G	T	T
<b>2</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
<b>3</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.
<b>4</b>	.	.	G	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>5</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
<b>6</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
<b>7</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>8</b>	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
<b>9</b>	G	C	.	C	C	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.
<b>10</b>	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.
<b>11</b>	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	A	C	C	.	.	.
<b>12</b>	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>13</b>	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.
<b>14</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.
<b>15</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.	.	.	.	.	.
<b>16</b>	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	.

**ANEXO IV**

Sitios variables localizados en los 31 haplotipos definidos para el gen COI.

		<b>Posición de la variación</b>																					
<b>H</b>	<b>5</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>1</b>
<b>A</b>				<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>7</b>	<b>0</b>
<b>P</b>																							<b>2</b>
<b>1</b>	A	T	G	T	A	A	A	T	T	T	G	T	T	A	A	T	T	A	C	C	T	T	T
<b>2</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>3</b>	.	G	.	.	.	C	.	.	A	G	C	A	A	.	T	A	.	.	A	A	.	.	.
<b>4</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>5</b>	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
<b>6</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
<b>7</b>	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>8</b>	.	.	.	C	.	C	.	C	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>9</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>10</b>	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>11</b>	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>12</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>13</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.
<b>14</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>15</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>16</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>17</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>18</b>	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.
<b>19</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>20</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>21</b>	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
<b>22</b>	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
<b>23</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>24</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>25</b>	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>26</b>	.	G	A	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G
<b>27</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>28</b>	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>29</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
<b>30</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>31</b>	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C

Continuación.

		Posición de la variación																													
H		1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	5	5	5	
A		2	2	3	3	5	5	6	1	1	4	8	9	0	0	1	2	4	6	8	0	9	1	3	3						
P		1	8	2	7	0	6	9	0	4	8	2	4	0	1	8	8	8	5	9	9	8	1	1	5						
1		G	C	C	G	C	T	G	C	G	C	T	C	T	C	C	G	G	G	G	T	T	G	C	G						
2		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
4		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	
5		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
6		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
7		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
8		.	.	A	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
9		.	.	.	.	.	C	T	.	C	.	.	.	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
10		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
11		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C
13		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
14		T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
15		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
16		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.
17		.	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
18		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
19		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.
20		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
21		.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
22		.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
23		.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
24		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
25		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26	A	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
27		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.
28		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
29		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
30		.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
31		.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

**ANEXO V**

Sitios variables localizados en los 44 haplotipos definidos para la combinación de los tres genes.

		Posición de la variación																			
H	3 4 6 8 9	1 3 3 1 1 1 1 1 2 4 4 4 4 4	5 5 5 5 6 6 6 6 6 7 7 7 7 7																		
a		4 3 6 1 5	6 6 7 9 0 0 1 1 2 2 2 3 7 8 0 1 4 9 9 2 2 2 2 2																		
p		5 2 1 6 5	2 1 4 0 3 8 4 7 0 8 1 2 1 1 2 5 0 1 2 5 9																		
1	A G G G A T T T A C T G T C A C T T C G C A T C G A G T T T G T A T																				
2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G . . C .
3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . .
4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . .
5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . .
6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T C . . . . . A . . . . . G . . . . . A . . . . .
7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . .
8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . G . . . . . G . . . . . C . . . . .
9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . G . . . . .
10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . T . . . . .
11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . . C T . . . . .
12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . . C C C
13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . .
14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . .
15	.	C . T . . . . .	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . .
16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . G . . . . .
17	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . .
18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . .
19	.	C T . A C . . . . .	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . .
20	.	T . . . . .	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . .
21	T . C . . . . .	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . .
22	.	T . . . . .	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . .
23	.	.	.	.	G . T . . . . .	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . .
24	.	T . . . . .	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . .
25	.	.	.	.	G T . . . . .	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . .
26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . .
27	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	. . . . . A . . . . .
28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . T . . . . . C . . . . .
29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . .
30	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . A . . . . . A C C . . . . .
31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . .
32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T C . . . . . A . . . . . A . . . . .
33	.	C . . . . .	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . .
34	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T C . . . . . A . . . . . A . . . . .
35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . C . . . . .
36	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . .
37	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T C . . . . . G . . . . . G A . C . . . . .
38	.	T . . . . .	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . A . . . . . G . . . . .
39	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . T . . . . .
40	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . . A . . . . .
41	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . .
42	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . . . . .
43	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T C . . . . . A . A . . . . . G . . . . . A . . . . .
44	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T . A . . . . . G . . . . .





## ANEXO VI

Conservation Genet Resour (2010) 2:201–203  
DOI 10.1007/s12686-009-9134-4

### TECHNICAL NOTE

## Isolation of twelve microsatellite markers in the pullet carpet shell *Venerupis pullastra* (Bivalvia: Veneridae)

Sandra M. Pereira · Alberto Arias ·  
Josefina Méndez · Ana Insua · Ruth Freire

Received: 19 October 2009 / Accepted: 20 October 2009 / Published online: 5 November 2009  
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

**Abstract** In this paper we report 12 polymorphic microsatellite loci isolated for the pullet carpet shell *Venerupis pullastra*, a commercial important clam in Europe. All loci were tested on a minimum of 45 individuals from O Barqueiro (NW Spain). The number of alleles ranged from three to 28. Observed and expected heterozygosity ranged from 0.074 to 0.727 and from 0.073 to 0.958, respectively. No linkage disequilibrium between loci was detected and nine of them conformed to Hardy–Weinberg equilibrium. These 12 loci will be useful for future population genetic studies in *V. pullastra*.

**Keywords** *Venerupis pullastra* · Pullet carpet shell · Microsatellite markers · Enriched genomic library

*Venerupis pullastra* is a bivalve mollusc of the Veneridae family distributed along the European Atlantic coast, from Norway to Spain, and also along the Mediterranean Sea. It is one of the most common clam species on the European markets, and Spain, Portugal, France and Italy are its main producer countries. The market price of *V. pullastra* is generally higher than other commercial clams, such as Japanese carpet shell (*Ruditapes philippinarum*) and the Yellow carpet shell (*V. rhomboides*). In spite of its commercial importance, no population genetic studies have been carried out on this species yet. The absence of suitable

molecular markers may be one of the reasons for the lack of this kind of studies. This work shows for the first time the characterization of polymorphic microsatellite loci in *Venerupis pullastra*.

DNA was isolated from adductor muscle according to Fernández-Tajes and Méndez (2007). Two genomic libraries enriched for two microsatellite repeats (ATC and ACC) were constructed following the protocol of Billote et al. (1999), with modifications described in Martínez et al. (2009). A total of 483 microsatellite-positive clones were identified after nylon membrane hybridization with ATC and ACC digoxigenin-labelled probes. Plasmid DNA of 186 hybridized clones was extracted using the QUIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (Quiagen) and sequenced at the Molecular Biology Unit of the University of A Coruña (Spain). Similarity between sequences was checked with the local Blast tool of the Bioedit program (Hall 1999) and with the MicroFamily WIN software (Megléczy 2007). Sequences were analyzed for the presence of microsatellites with Tandem Repeats Finder (Benson 1999). A total of 99 sequences were unique and contained at least one microsatellite. Oligonucleotide primers flanking the microsatellite regions were designed using the Primer3 web resource (Rozen and Skaletsky 2000). PCR amplifications were optimized for annealing temperature and MgCl<sub>2</sub> concentration with the gradient thermal cycler Bio-Rad MyCycler<sup>™</sup>. They were performed in a reaction volume of 12.5 µl containing 0.5 µl of genomic DNA (25 ng/µl), 0.06 µl of *Taq* DNA polymerase (5 U/ml), 1.25 µl of the 10× polymerase buffer (Roche Applied Science), 1 µl of dNTPs mixture (2.5 mM), 0.15 µl of each primer (20 µM), and MgCl<sub>2</sub> ranging from 1.5 to 3.0 mM. The thermal cycler protocol consisted on an initial denaturalization of 5 min at 95°C, followed by 34 cycles of 94°C for 30 s, optimal annealing temperature for 30 s, and 72°C for 30 s, and a final extension of 72°C for

S. M. Pereira · A. Arias · J. Méndez · A. Insua · 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

**Table 1** Characterization of twelve microsatellites markers in *Venerupis pullastra*

Locus	Accession no.	Repeat motif (5 → 3)	Primer sequence (5 → 3)	Mg Cl <sub>2</sub> (mM)	T <sub>a</sub> (°C)	N	Na	Size range (pb)	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>is</sub>
VpATI-6	FN556579	(TGA) <sub>4</sub> (TAG) <sub>2</sub> N <sub>2</sub> (TGC) <sub>3</sub> TAC(TGA) <sub>4</sub> AAA(TAA) <sub>2</sub> (TGA) <sub>9</sub> N <sub>18</sub> (TGT) <sub>2</sub> TATTGT(TGA) <sub>4</sub>	F: tggcagtagtgtaatagtc R: cgtggataaatgctcctg	1.5	60	55	7	255–279	0.727	0.661	-0.101
VpAC2-34	FN556580	(ATG) <sub>3</sub> TTG(ATG) <sub>2</sub> GC(ATG) <sub>2</sub> GCAATGCTAGTGTGG(ATG) <sub>4</sub> (GTG) <sub>4</sub> TGATAACCAA(TGT) <sub>3</sub>	F: gctgcttattgtaatgag R: gccacacctggatttat	1.5	60	58	8	316–349	0.552	0.519	-0.063
VpATI-54	FN556581	(CAT) <sub>3</sub> AAT(CAT) <sub>4</sub> CACCGTTTGG(CAT) <sub>9</sub> N <sub>34</sub> (AATC) <sub>4</sub> GATC(AATC) <sub>2</sub>	F: aaccgaacagagataaa R: eggattcaaacgagaacaa	2.5	59.5	59	8	267–285	0.627	0.765	0.182
VpATI-36	FN556582	(GAT) <sub>6</sub>	F: caggegtagacaacaaga R: acccatttcatctcaeg	3	60	58	9	106–193	0.397	0.370	-0.073
VpAT2-74	FN556583	(ATC) <sub>8</sub> AAT(ATC) <sub>2</sub>	F: gctgtttccatgcat R: cctccttgcatctcccttc	2.5	59.5	54	4	129–149	0.333	0.321	-0.038
VpATI-35	FN556584	(TCA) <sub>3</sub> CCA(TCA) <sub>3</sub>	F: catcaatccacaaccagtcg R: cctccttgcatctcccttc	1.5	60	54	4	123–135	0.074	0.073	-0.017
VpATI-31	FN556585	(TCA) <sub>6</sub>	F: ggaacgctttgctgtgtt R: ggaagaatggcgtccata	3	58	56	5	131–176	0.232	0.327*	0.292
VpATI-67	FN556586	(TGT) <sub>4</sub> CGC(TGC) <sub>2</sub> AGTTGTTGACGT(TGA) <sub>2</sub> TGCA GCTGTAT(TGT) <sub>2</sub> TGATGGTAT(TGT) <sub>2</sub> (TGA) <sub>2</sub> TGCTAT(TGT) <sub>2</sub> (TGA) <sub>5</sub>	F: taagtagaagctatgaga R: cgaccactttctacatctcg	2.5	56	58	4	145–202	0.379	0.352	-0.077
VpTE-181	FN556587	(GAT) <sub>6</sub>	F: csgatgtgtactgtggagaa R: ctgtttctgttccacagtg	1.5	60	45	3	127–133	0.436	0.533*	0.184
VpATI-53	FN556588	(TGA) <sub>5</sub>	F: algcattgaccacagctcct R: cttaatcaaggatcaatcca	2.5	59.5	46	9	131–156	0.261	0.857**	0.698
VpATI-12	FN556589	(TGA) <sub>2</sub> G(TGA) <sub>5</sub>	F: ttatcgtcagatgggtgag R: tggacaacagcttagccagaa	3	56	54	22	187–261	0.481	0.937**	0.489
VpATI-64	FN556590	(ATC) <sub>2</sub> ATTATA(ATC) <sub>6</sub> ACTGTC(ATC) <sub>2</sub>	F: ggtcgttatagcgaaatcaca R: caaataggctatggctcct	2.5	58.5	49	28	123–347	0.490	0.958**	0.492

T<sub>a</sub> annealing temperature, N number of individuals tested, Na number of alleles, H<sub>o</sub> observed heterozygosity, H<sub>e</sub> expected heterozygosity, F<sub>is</sub> Weir and Cockerham (1984) inbreeding coefficient

\* P < 0.05

\*\* Significant departures from Hardy–Weinberg equilibrium after sequential Bonferroni correction

10 min. Thirty-four primer pairs were tested in PCR reactions and 12 of them yielded polymorphic products.

Polymorphic loci were subsequently amplified with one of the two primers 5'-labeled with one fluorescent phosphoramidite dye, 6-FAM or HEX in a minimum of 45 individuals from a natural population from O Barqueiro (NW Spain). PCR products were run on an ABI PRISM 3130xl sequencer and genotyped with the GeneMapper v.3.7 software (Applied Biosystems).

The number of alleles, observed heterozygosity ( $H_o$ ) and gene diversity ( $H_e$ ) of Nei (1978) were calculated with the Genetix software v4.03 (Belkhir et al. 2004). Tests for agreement with Hardy–Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium between loci were carried out with the Genepop v4.0 software (Raymond and Rousset 1995). When multiple tests were performed, the significance values were adjusted by sequential Bonferroni correction (Rice 1989). Finally, microsatellite data were examined for evidence of null alleles with the MicroChecker software (Van Oosterhout et al. 2004).

Table 1 shows the results obtained for the 12 microsatellite loci characterized. Eleven loci were isolated from the ATC enriched library and one (VpAC2-34) from the ACC library. Between three and 28 alleles per locus were detected. Observed and expected heterozygosity values ranged from 0.074 to 0.727 and from 0.073 to 0.958, respectively. Seven loci, nine after sequential Bonferroni correction, conformed to Hardy–Weinberg equilibrium at a 5% significance level. The analysis with MicroChecker showed evidence of null alleles in the three loci in Hardy–Weinberg disequilibrium (VpAT1-53, VpAT1-12 and VpAT1-64), with frequencies ranging from 0.232 to 0.318, which may explain, at least in part, the deviations observed. No significant linkage disequilibrium was detected between loci.

The microsatellites described here will be a valuable tool for future population genetic studies in *V. pullastra*.

**Acknowledgments** We thank Dr. Martínez Patiño team for supplying the clam samples and Jose García Gil, Luisa Martínez and Rosa

García Díaz for their technical assistance. This work was supported by Xunta de Galicia through the project PGIDIT06RMA50101PR.

## References

- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous windows TM pour la génétique des populations. Université de Montpellier II, Montpellier
- Benson G (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 27:573–580
- Billote N, Lagoda P, Risterucci AM, Baurens FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277–288
- 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 Agr Food Chem* 55:7278–7282
- Hall TA (1999) Bioedit a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95–98
- 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). *Cons Genet Res*. doi:10.1007/s12686-009-9026-7
- Megléc E (2007) MICROFAMILY (version 1): a computer program for detecting flanking-region similarities among different microsatellite loci. *Mol Ecol Notes* 7:18–20
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583–590
- 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
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating  $F$ -statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358–1370