



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Departamento de Bioloxía Celular e Molecular

Área de Xenética

**Análisis genético de *Donax vittatus* mediante
marcadores moleculares**

**Análise xenética de *Donax vittatus* mediante
marcadores moleculares**

**Genetic analysis of *Donax vittatus* using molecular
markers**

Julio Martínez Rumbo

Trabajo Fin de Grado

Fecha de defensa: 27 de julio de 2016

Dirigido por:

Dra. Ana Insua Pombo

Dra. Josefina Méndez Felpeto

XENOMAR
Genética de organismos marinos



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

ANA INSUA POMBO, Doctora en Biología y profesora contratada Doctora 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 presente Trabajo Fin de Grado titulado “**Análisis genético de *Donax vittatus* mediante marcadores moleculares**” que presenta el alumno Julio Martínez Rumbo, ha sido elaborado bajo nuestra supervisión y, considerándolo finalizado, damos nuestro visto bueno para su presentación y defensa ante el tribunal calificador.

A Coruña, 21 de Julio de 2016

Fdo. Ana Insua Pombo

Fdo. Josefina Méndez Felpeto

RESUMEN

En las costas europeas se encuentran cinco bivalvos del género *Donax* (Familia Donacidae) con morfología similar, de las cuales solo una, *D. trunculus*, se explota comercialmente. En este trabajo se realiza un análisis genético de dos muestras de *Donax* de la costa atlántica de la Península Ibérica con el fin de contribuir a su conservación y gestión. Mediante marcadores moleculares basados en el ADNr 5S y el gen mitocondrial COI se corroboró que la muestras objeto de estudio corresponden a *D. vittatus*. Por otra parte, se llevó a cabo un análisis poblacional basado en el gen COI. Los resultados obtenidos con este marcador indican que ambas muestras de *D. vittatus* presentan valores altos de diversidad genética, superiores a los de otros bivalvos explotados comercialmente con los que comparten distribución geográfica. No se encontraron evidencias de diferenciación poblacional y la historia demográfica inferida corresponde a un escenario de expansión poblacional.

Palabras clave: *Donax*, *Donax vittatus*, marcadores moleculares, genética de poblaciones.

RESUMO

Nas costas europeas atópanse cinco bivalvos do xénero *Donax* (Familia Donacidae) con morfoloxía similar, das cales só unha, *D. trunculus*, explótase comercialmente. Neste traballo realízase unha análise xenética de dúas mostras de *Donax* da costa atlántica da Península Ibérica co fin de contribuir a súa conservación e xestión. Mediante marcadores moleculares baseados no ADNr 5S e no xene mitocondrial COI corroborouse que as mostras obxecto de estudo corresponden a *D. vittatus*. Por outra banda, levouse a cabo unha análise poboacional baseada no xene COI. Os resultados obtidos con este marcador indican que ambas mostras de *D. vittatus* amosan valores altos de diversidade xenética, superiores ós de outros bivalvos explotados comercialmente cos que comparte distribución xeográfica. Non se atoparon evidencias de diferenciación poboacional e a historia demográfica inferida corresponde cun escenario de expansión poboacional.

Palabras clave: *Donax*, *Donax vittatus*, marcadores moleculares; xenética de poboacións.

ABSTRACT

On the European coasts there are five bivalves of the genus *Donax* (Family Donacidae) with similar morphology of which only one, *D. trunculus*, is commercially exploited. In this work, a genetic analysis of two samples of *Donax* from the Atlantic coast of Iberian Peninsula was carried to provide useful data for the conservation and management. Two molecular markers based on the 5S rDNA and the mitochondrial COI gene was used to confirm that the samples under study correspond to *D. vittatus*. A population analysis based on COI gene was also undertaken. The results obtained with this marker indicated that both samples of *D. vittatus* show a high genetic diversity, with values higher than that reported in other commercially exploited bivalves with the same geographical distribution. Evidences of population differentiation were not found and the inferred demographic history corresponds to a scenario of population expansion.

Keywords: *Donax*, *Donax vittatus*, molecular markers, population genetics.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia de <i>Donax spp.</i>	1
1.2 Aspectos genéticos de la conservación y gestión de recursos pesqueros	3
1.3 Marcadores moleculares	3
2. OBJETIVOS.....	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	6
3.1 Material de estudio.....	6
3.2 Extracción de ADN genómico.....	6
3.3 Amplificación por PCR y secuenciación	6
3.4 Digestión de productos de PCR	7
3.5 Secuenciación y haplotipos.....	7
3.6 Análisis de datos	8
4. RESULTADOS	10
4.1 Identificación molecular de <i>D. vittatus</i>	10
4.2 Análisis genético poblacional	11
5. DISCUSIÓN	17
6. CONCLUSIONES	19
7. BIBLIOGRAFÍA	21

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de *Donax* spp.

Los moluscos bivalvos del género *Donax* (familia Donacidae) son un componente importante de la macrofauna de playas arenosas en zonas templadas, tropicales y subtropicales, siendo los organismos dominantes en este tipo de ambientes (Ansell, 1983). Suelen encontrarse en zonas expuestas como el intermareal o el sublitoral somero de playas limpias. Su éxito puede ser atribuido a la habilidad para coordinar los movimientos en respuesta a las condiciones físicas como las olas y las corrientes. Son más abundantes en áreas eutróficas, con una elevada producción de plancton puesto que son suspensívoros. Las especies de *Donax* muestran poca variabilidad en su ciclo de vida; todas son gonocóricas, con proporción igual de sexos, desarrollo larvario planctónico y la sedimentación primaria ocurre en tallas pequeñas. La mayoría de las especies viven entre uno y dos años, con un rápido crecimiento y madurez temprana. La reproducción es continua, con desoves parciales, sin embargo, el crecimiento, la reproducción y la sedimentación muestran respuestas estacionales en función de las condiciones ambientales.

En las costas europeas se encuentran cinco especies del género *Donax* (Figura 1); *D. semistriatus* con una distribución limitada al Mediterráneo y Mar Negro, *D. venustus* distribuida a través del Mediterráneo, Mar Negro y la costa atlántica al sur del Estrecho de Gibraltar, *D. vittatus* que pertenece a la fauna boreal mediterránea, extendiéndose hasta las costas de Noruega, y *D. trunculus* y *D. variegatus*, especies mediterráneas de aguas cálidas, que alcanzan la costa Atlántica de Francia y las costas suroeste de Francia e Inglaterra, respectivamente (Ansell y Lagardère, 1980). Así, en la costa atlántica de la Península Ibérica pueden convivir en simpatria varias especies del género (Salas *et al.*, 2001; Rufino *et al.*, 2010).



Figura 1. Apariencia de la concha externa de *D. semistriatus* (1), *D. venustus* (2), *D. vittatus* (3), *D. variegatus* (4) y *D. trunculus* (5). Las imágenes se obtuvieron de Database Illustrato Completo Delle Conchiglie Marine del Mediterraneo (www.conchigliedelmediterraneo.it).

En zonas donde coexisten *D. vittatus* y *D. trunculus*, como es el caso de Galicia y norte de Portugal, *D. trunculus* se encuentra en la zona intermareal, mientras que *D. vittatus* se encuentra principalmente en el sublitoral somero, hasta una profundidad de 5-6m (Lagardère, 1972).

Pocas especies del género *Donax* son explotadas comercialmente, pero algunas son consumidas localmente o utilizadas como cebo. *D. trunculus*, conocida comúnmente como coquina, se explota en muchos países que bordean el Mar Mediterráneo, incluyendo Portugal (Gaspar *et al.*, 1999; Chícharo *et al.*, 2002), Italia (Zeichen *et al.*, 2002), Francia (Thébaud *et al.*, 2005) y España (Ramón *et al.*, 2005; Molares *et al.*, 2008). Debido a la similitud de tamaño, forma y color de las especies (Figura 1), las capturas de los bancos naturales de *D. trunculus* pueden contener otras especies del género de menor valor económico y comercializarse conjuntamente. En el caso de Galicia y norte de Portugal, no se descarta que las capturas

contengan *D. vittatus*. En Galicia *D. trunculus* es una especie con un elevado índice de cotización, siendo el bivalvo con mayor valor económico (32,55 €/Kg) en las lonjas gallegas durante el año 2015 (Tabla 1). Pero las capturas de esta especie están en clara recesión, se aprecia un claro descenso desde el año 1997 hasta el 2003, una pequeña recuperación a partir del año 2004 y nuevamente una disminución brusca en el año 2015 (Figura 2).

Tabla 1. Nivel de capturas en Kg y valor económico en € de los principales moluscos bivalvos descargados en las lonjas gallegas durante el año 2015. Datos procedentes del servicio de estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia (www.pescadegalicia.com).

Especie	Kg	Importe €	Media €/Kg
Almeja babosa	1079485	13690069	12,68
Almeja bicuda	9963,52	44686,38	4,48
Almeja fina	547668,13	13254631	24,2
Almeja rubia	454935,82	3677837,7	8,08
Almeja japónica	1835376,3	13680186	7,45
Almejón	69712,25	176264,87	2,53
Berberecho	2649192,4	13410475	5,06
Berberecho verde	27693,3	145899,37	5,27
Coquina	2125,5	69181,02	32,55
Almeja vieja	67486,83	223531,33	3,31
Almeja blanca	3937,45	17811,42	4,52
Longueirón	17667,25	130301,55	7,38
Longueirón viejo	46593,33	192345,83	4,13
Navaja	459080	3996636,8	8,71
Ostra plana	27326,97	115571,1	4,23
Ostra rizada	22622,5	19985,56	0,88
Reloj	226259,15	290121,03	1,28
Vieira	123682,8	514924,16	4,16
Volandeira	103380,95	391867,31	3,79
Zamburiña	2395,75	15777,19	6,59
TOTAL	7776585	64058104	

Producción comercial coquina

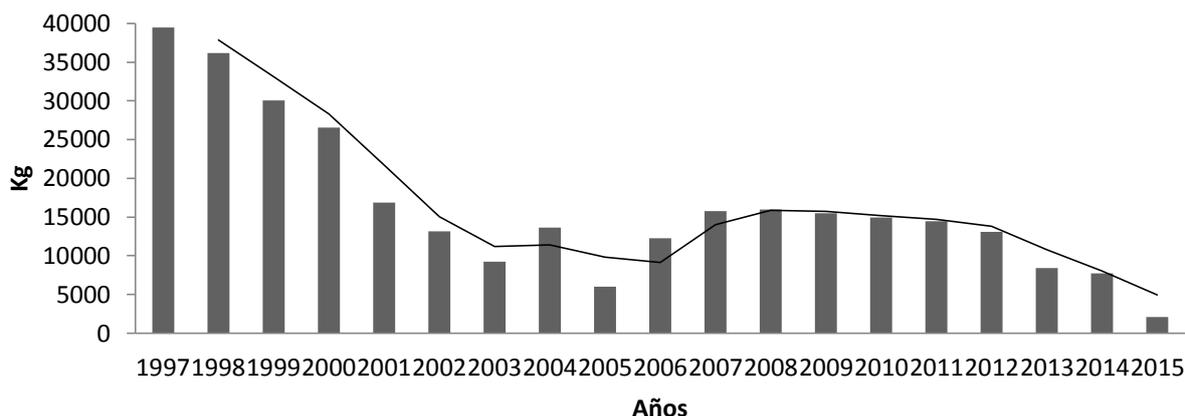


Figura 2. Evolución de las capturas de coquina en Kg desde 1997 hasta el 2015. Los datos se obtuvieron del servicio de estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia, (www.pescadegalicia.com).

Los descensos de las capturas podrían estar asociados con la desaparición de bancos naturales como es el caso de la desaparición de bancos de coquina de los arenales do Lombo das Navallas, en la Ría do Barqueiro, y de Praia América en la Ría de Vigo (Martínez Patiño, comunicación personal).

Ante el escenario de colapso de una pesquería una actuación posible es la valoración de una especie similar como recurso alternativo a la especie explotada, permitiendo aumentar el número de capturas sin incrementar la presión sobre los bancos naturales. En esta línea se han realizado estudios, en Portugal, para proponer a *D. vittatus* como especie alternativa a la almeja blanca *Spisula solida* (Maiga y Pimenta, 2007).

1.2 Aspectos genéticos de la conservación y gestión de recursos pesqueros

La diversidad genética permite a las poblaciones adaptarse a cambios o presiones medioambientales y es imprescindible para la supervivencia de la especie. Un componente importante de la variabilidad genética de una especie es la debida a diferencias entre poblaciones. El conocimiento de la estructura genética de las poblaciones naturales es un aspecto clave para cuantificar el impacto potencial de la explotación directa y las prácticas de repoblación y de la acuicultura en los recursos naturales (Morvezen *et al.*, 2016).

La existencia de estructura poblacional significa que la población no se comporta como una única unidad y tiene importantes consecuencias. Por ejemplo, la sobreexplotación localizada de un recurso sin división poblacional podría no afectar seriamente al futuro de la pesquería, ya que el aprovisionamiento larvario podría producirse por reclutamiento de áreas vecinas. Sin embargo, en el caso de poblaciones diferenciadas genéticamente, la sobreexplotación podría conducir al colapso de la pesquería. De igual modo, en ausencia división poblacional, no cabría esperar impacto genético en repoblaciones con individuos del medio natural, pero no ocurre lo mismo en caso de que existiese (Johnson, 2000).

1.3 Marcadores moleculares

Para realizar estudios genéticos, habitualmente se recurre al uso de marcadores genéticos, que son caracteres heredables que muestran variación (polimórficos). Los marcadores

genéticos incluyen caracteres fenotípicos, proteínas y ADN, estos dos últimos conocidos como marcadores moleculares. En la actualidad los más utilizados son los basados en el ADN, debido a que requieren una cantidad mínima de tejido para su análisis y a que, se localizan tanto en regiones codificantes como no codificantes, pudiendo existir un número muy elevado en los genomas.

Los marcadores moleculares de ADN pueden localizarse en el ADN mitocondrial (ADNmt) o en el ADN nuclear. En función de la región genómica que se seleccione y el tipo de variación que se examine, existen diferentes tipos como los RAPDs (ADN polimórficos ampliados al azar), RFLPs (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), AFLPs (polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados), microsatélite o SNPs (polimorfismos de un solo nucleótido) (Liu y cordes, 2004; Rasmussen y Morrissey, 2008).

El ADN ribosomal 5S (ADNr 5S) constituye una familia multigénica de repeticiones en tándem con una región altamente conservada de 120 pb, seguida de un espaciador no transcrito (NTS) de longitud y/o secuencia específica de especie. Debido a la tasa de mutación rápida del NTS, los productos de PCR del ADNr 5S pueden diferenciar, a menudo, especies visualizando simplemente la longitud del fragmento en un gel de electroforesis sin necesidad de análisis posteriores.

EL ADNmt de animales es una molécula circular, cerrada y bicatenaria, con pocas excepciones. Generalmente posee 37 genes que codifican para los ARNr 12S y 16S, 22 tipos de ARN transferente y 13 subunidades proteicas, que forman parte de complejos multienzimáticos, implicados en la cadena de transporte electrónico y la fosforilación oxidativa como las subunidades I, II y III de la citocromo c oxidasa (COI, COII, COIII) o el citocromo b.

Las características del ADNmt incluyen una tasa de mutación mayor que la del ADN nuclear de copia única (Brown *et al.*, 1979) atribuida a la baja eficiencia en la reparación de la ADN polimerasa mitocondrial (Hartl y Clark, 2007). Normalmente, el ADNmt sufre mutaciones puntuales, inserciones y deleciones (Awise, 2004) y en general estas mutaciones suelen ser neutras o deletéreas, con muy pocas mutaciones de carácter adaptativo. Generalmente, presenta herencia uniparental materna, aunque hay excepciones, como es el caso de algunas especies de bivalvos que presentan dos tipos de ADNmt, uno que se transmite por vía materna y otro por vía paterna (Theologidis *et al.*, 2008). Este fenómeno se conoce como doble herencia uniparental (DUI) y está documentado en *D. trunculus* (Theologidis *et al.*, 2008). Además el genoma mitocondrial es haploide, con un tamaño efectivo cuatro veces menor que el del ADN nuclear, y por lo que es más sensible a la deriva genética y, por tanto, un buen candidato para detectar cambios poblacionales (Ferguson *et al.*, 1995; Ballard y Whitlock, 2004). La variación del ADNmt puede analizarse mediante RFLPs que revelan cambios en la secuencia nucleotídica producidos por inserciones, sustituciones o reordenaciones que afectan a los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción. También puede analizarse por secuenciación directa de productos obtenidos por PCR. El ADNmt es utilizado en muchos estudios de identificación de especies, en genética de poblaciones o filogeografía (Awise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987; Galtier *et al.*, 2009).

Una característica común del ADNr 5S y el ADNmt es que pueden ser amplificados fácilmente por PCR incluso en especies con genomas poco conocidos como ocurre en bivalvos. En ambos casos, existen múltiples copias por célula y el grado de conservación de las secuencias permite la utilización de cebadores diseñados en especies poco relacionadas (ADNr 5S) o de cebadores degenerados (ADNmt).

2. OBJETIVOS

En este trabajo se plantea un análisis genético de *D. vittatus* con el fin de contribuir a la conservación y gestión de este recurso. Los objetivos específicos comprenden:

1. Corroborar mediante los marcadores moleculares ADNr 5S y el gen mitocondrial COI la identidad de dos muestras procedentes del noroeste de la Península Ibérica.
2. Evaluar la variación genética de las muestras en base al marcador mitocondrial COI.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material de estudio

Las muestras de *Donax* objeto de estudio fueron recolectadas en bancos naturales de dos zonas atlánticas de la Península Ibérica: Corrubedo (A Coruña) y Mira-Vagueira (Aveiro, Portugal) (Figura 3) en el marco del proyecto de investigación “Estudo dos bancos naturais de coquina: problemática da súa desaparición en Galicia (PGIDIT-CIMA 13/08)” financiado por la Consellería do Medio Rural e do Mar de la Xunta de Galicia y realizado por el grupo de investigación XENOMAR (Xenética de Organismos Mariños) de la Universidade da Coruña. Las muestras utilizadas se encontraban en etanol al 96%. El número de individuos utilizados fue 34 de Corrubedo (CO) y 31 de Mira-Vagueira (MV). Además de las muestras objeto de estudio, se utilizaron ejemplares control de *D. trunculus*, *D. vittatus*, *D. semistriatus* y *D. variegatus* disponibles en el laboratorio.



Figura 3 Situación geográfica de las zonas de muestreo. CO: Corrubedo, MV: Mira-Vagueira.

3.2 Extracción de ADN genómico

Puesto que las muestras estaban conservadas en etanol al 96%, se mantuvieron en agua destilada durante 20 min para rehidratarlas y eliminar los posibles restos de etanol. La extracción de ADN genómico se realizó a partir de tejido muscular del pie siguiendo el método descrito por Walsh *et al.* (1991) que emplea la resina Chelex 100TM (Sigma-Aldrich). Para ello, una pequeña porción de tejido (1mm³) se introdujo en 100 µl de Chelex 100TM al 10% (g/ml) en agua miliQ estéril y se incubó a 100°C durante 20 min. Tras esta incubación, se realizó una centrifugación a 13000 rpm durante 1 min y se recuperó el sobrenadante. Para cuantificar el ADN extraído se usó un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Technologies, Inc.).

3.3 Amplificación por PCR y secuenciación

La amplificación del ADNr 5S se llevó a cabo empleando un par de cebadores diseñados por Fernández-Tajes y Méndez (2007):

5SF: 5' CGTCCGATCACCGAAGTTAA-3'

5SR: 5' ACCGGTGTTTTCAACGTCAT-3'.

Del gen COI se amplificó un fragmento empleando cebadores degenerados descritos por Nantón *et al* (2015):

COIDonax-F: 5' GAGTDATAATRCGKACTGARYTRATAC 3'

COIDonax-R: 5' GTGAATRAATAAHACNGGRTCYCC 3'

En ambos casos la reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 μ l. Para el ADNr 5S se utilizaron 150 ng de ADN genómico, 0,25 mM de dNTPs, 3 mM de $MgCl_2$, 0,6 μ M de cada primer, 0,75 U de *Taq* ADN polimerasa, tampón de polimerasa 1x y agua miliQ estéril. Para COI se usó la misma mezcla de reacción pero con 100 ng de ADN y 2,5 mM de $MgCl_2$.

El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad- Barcelona-Spain). El programa de amplificación para el ADNr 5S consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, 34 ciclos de 30 s de desnaturalización a 94°C, 30 s de hibridación a 55°C y 40 s de extensión a 72°C, seguida de una extensión final de 7 min a 72°C. Para la amplificación del gen COI, el programa consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, 35 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 41°C, 45 s a 72°C y una extensión final de 3 min a 72°C.

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% en tampón 1xTAE (Trisacetato 40 mM pH 8, EDTA 1 mM) cargando 5 μ l de producto de PCR y 1 μ l de tampón de carga (azul de bromofenol 0,25%, azul de xianol 0,25% y glicerol al 30% en 1xTAE). Para determinar la longitud, los fragmentos se compararon con el marcador de peso molecular XIV de Roche (100-1500 pb). El proceso de migración se observó gracias al colorante azul de bromofenol y xileno cianol incluidos en el tampón de carga. La electroforesis se realizó a 70-90 v, dependiendo de la cubeta utilizada y se dejó migrar hasta que el frente alcanzó unos 2/3 del gel. Por último, se tiñó por inmersión en bromuro de etidio (0.5 μ g/ml en 1xTAE) durante 25-30 min y luego se visualizó en el equipo de documentación de geles Gel Doc XR (Bio-Rad).

3.4 Digestión de productos de PCR

Los productos PCR del COI se sometieron a digestión con la endonucleasa de restricción *AluI*. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, conteniendo 5 μ l de producto de PCR, 5 U de la enzima de restricción y 2 μ l del tampón recomendado por la casa comercial. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante toda la noche y la digestión se paró añadiendo 4 μ l del tampón de carga. Los fragmentos de restricción se cargaron en geles de agarosa al 2.5 %. Para determinar la longitud de los fragmentos obtenidos, se utilizó el marcador de peso molecular XIV (100-1500 pb) de Roche. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml en 1xTAE) y se visualizaron en Gel Doc XR (Bio-Rad).

3.5 Secuenciación y haplotipos

La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo en un secuenciador automático ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) en los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña, empleando para ello el cebador directo utilizado en la PCR. Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999), eliminándose los extremos con lectura poco fiable. Las secuencias editadas, se sometieron a un análisis BLAST (*Basic Local Aligment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997) para verificar su identidad y se alinearon con Clustal W (Thomson *et al.*, 1994) implementado en BioEdit. La identificación de los haplotipos se realizó con el programa DNAsp versión 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009).

3.6 Análisis de datos

La variación genética dentro de las muestras se evaluó mediante la diversidad haplotípica (h) y la diversidad nucleotídica (π).

La diversidad haplotípica es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una muestra sean distintos y se calculó según (Nei, 1987):

$$h = n(1 - \sum x_i^2)/(n - 1)$$

siendo n el número de secuencias examinadas y x_i la frecuencia del haplotipo i .

La diversidad nucleotídica (π) indica la probabilidad de que dos nucleótidos con posiciones homólogas tomados al azar sean diferentes, es decir, el número medio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias. Para calcularla se empleó la ecuación de Nei, (1987):

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij}$$

donde n es el número de secuencias examinadas, x_i y x_j son las frecuencias de las secuencias i y j , y π_{ij} es la proporción de nucleótidos diferentes entre los haplotipos i y j .

Ambos índices, se calcularon con el programa DNAsp versión 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009). Las frecuencias haplotípicas se calcularon con el programa Arlequín versión 3.5.12 (Excoffier y Lischer, 2010).

Se utilizó el programa Network 5.0.0 (Fluxus Tenchnology Ltd.) para establecer las relaciones filogenéticas entre los haplotipos, mediante un árbol de redes. Éste se realizó mediante un algoritmo *Median-Joining* (Bandelt *et al.*, 1999), que establece las redes de haplotipos a partir de todos los árboles filogenéticos posibles más parsimoniosos.

Para determinar si existe diferenciación poblacional entre las muestras se estimó el índice de fijación F_{st} , realizando un análisis molecular de la varianza (AMOVA) con el programa Arlequin V 3.5.12. La significación se determinó mediante un análisis de permutaciones (10.000).

Se utilizó el test F_s de F_u (Fu, 1997) implementado en el DNAsp versión 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009) para analizar cambios demográficos dentro de las poblaciones. Este estadístico 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 indica un exceso de haplotipos, esperable en una situación de expansión poblacional reciente o selección purificadora. Un valor positivo indica un déficit de haplotipos, esperable en una situación de cuello de botella reciente, o sobredominancia.

La posible existencia de expansión poblacional se analizó también mediante la distribución de *mismatches* (Rogers y Harpending, 1992), donde las diferencias observadas entre pares de haplotipos se representan frente a las esperadas en caso de expansión poblacional. Con la misma finalidad, se realizaron los test D de Tajima (Tajima, 1989) que compara el número de

sitios segregantes y el número de diferencias entre pares de haplotipos y el estadístico R_2 de Ramos-Onsins y Rozas (Ramos-Onsins y Rozas, 2002), basado en la diferencia entre número de variantes únicas y el número medio de diferencias entre secuencias. Estos test se realizaron con el programa DNAsp versión 5.10.1, determinándose la significación por simulación coalescente (1000 réplicas).

4. RESULTADOS

4.1 Identificación molecular de *D. vittatus*

Se amplificó el ADN_r 5S en las dos muestras objeto de estudio, obteniendo en todos los casos un producto principal de ~500 pb (Figura 4), lo cual permitió descartar la presencia de *D. trunculus* ya que en esta especie el producto de PCR generado con los mismos cebadores es de 275-300 pb (Pereira *et al.*, 2012).

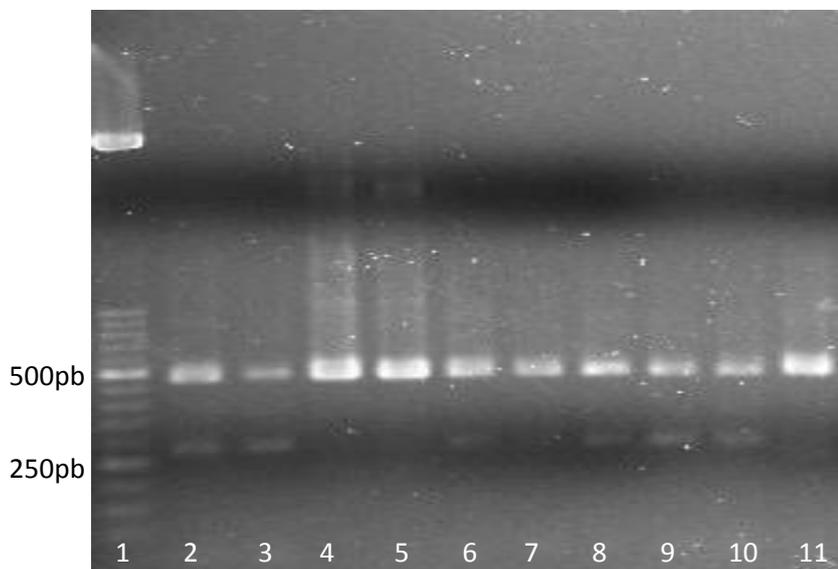


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del ADN_r 5S de varios individuos (carriles 2-11). Marcador de peso molecular en carril 1.

Para discriminar entre *D. vittatus*, *D. variegatus* y *D. semistriatus* se amplificó por PCR parte del gen COI en los mismos individuos y el producto de PCR de ~590 pb en todos los casos se sometió a digestión con la endonucleasa de restricción *AluI*. La Figura 5 muestra el patrón obtenido donde destaca una banda prominente de 270 pb compatible con el esperado en *D. vittatus* (270 pb, Tabla 2) según Nantón *et al* (2015).

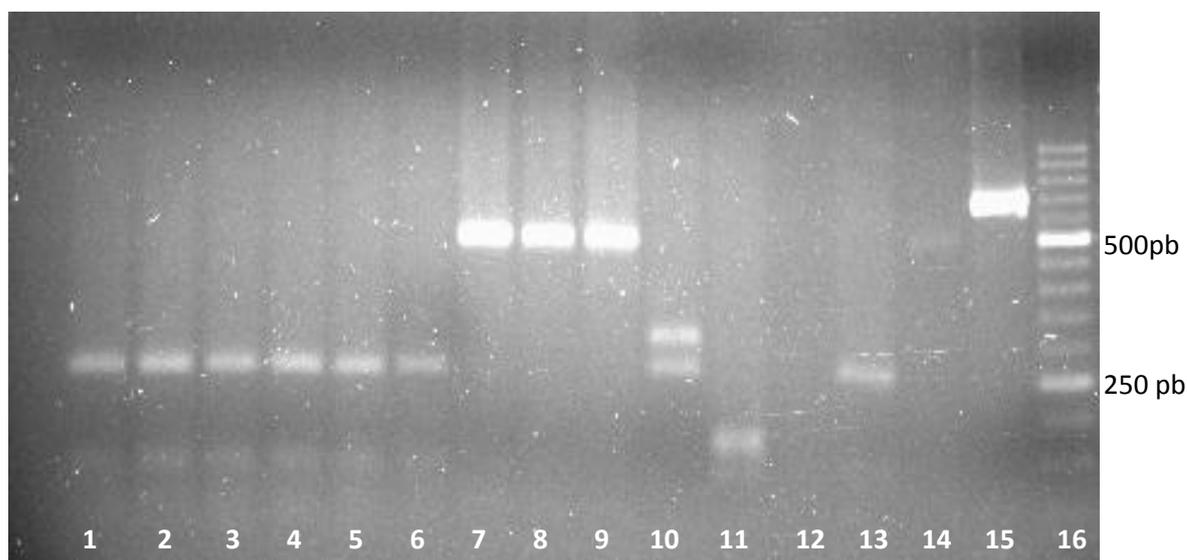


Figura 5. Productos de restricción del gen COI producidos por *AluI* en *D. vittatus* (carriles 1-6 y 13), *D. trunculus* (carriles 7-9 y 14), *D. variegatus* (carril 10), *D. semistriatus* (carril 11) y *D. trunculus* (14). Producto de PCR sin digerir y marcador de peso molecular en los carriles 15 y 16 respectivamente.

Tabla 2. Tamaños esperados en los productos de PCR de COI digeridos con *AluI* (Nantón *et al.*, 2015).

Especies	Tamaño fragmento (pb)
<i>D. trunculus</i>	91,505
<i>D. semistriatus</i>	24, 75, 142, 169, 189
<i>D. variegatus</i>	21, 274, 301
<i>D. vittatus</i>	18, 75, 91, 142, 270

4.2 Análisis genético poblacional

El producto de PCR del gen COI, se secuenció obteniéndose la secuencia nucleotídica de un fragmento de 518 pb tras eliminar la secuencia de los cebadores y las regiones de alineamiento dudoso. El alineamiento de las secuencias permitió identificar 38 haplotipos definidos por 36 sustituciones nucleotídicas (Tabla 3).

Tabla 3. Sitios variables localizados en los 34 haplotipos identificados en el gen COI. Todos los haplotipos son comparados con el haplotipo 1. n: número de cada haplotipo en la muestra global.

H	1 1 1 1 1 2 2 2 2 2 2 2 3 3 3 3 3 3 4 4 4 4 4 4 4 5 5 5																																					
A	1	2	6	1	8	8	8	9	9	1	2	2	7	9	1	2	3	7	8	8	9	1	3	3	6	7	9	1	4	6	7	8	8	1	1	1	n	
P	0	1	4	7	0	1	2	0	6	4	5	9	5	8	6	2	5	4	5	0	4	3	8	3	7	8	0	4	0	6	3	6	7					
1	T	T	T	T	G	C	C	A	T	G	T	T	A	A	T	T	T	A	T	T	C	T	A	A	C	C	T	C	C	C	T	C	C	A	G	3		
2	G	T	15
3	G	T	.	.	T	1
4	.	A	G	T	.	.	A	1	
5	.	A	G	T	1
6	G	T	.	A	1	
7	G	.	.	A	1
8	G	10
9	G	T	1
10	A	T	1
11	G	.	.	C	T	T	1
12	G	A	1
13	G	C	T	1
14	G	T	.	A	1
15	.	.	.	T	G	T	1
16	.	.	A	G	T	1
17	C	.	.	G	T	1
18	C	G	.	.	G	T	T	1
19	G	G	T	1
20	A	G	T	.	.	C	C	1	
21	G	T	A	1
22	T	C	1
23	C	G	1
24	C	G	C	1
25	G	.	.	T	1
26	.	.	.	T	G	1
27	.	A	G	T	T	1
28	A	G	2
29	T	1
30	G	.	.	C	1
31	G	T	T	1
32	G	T	1
33	.	A	G	T	1
34	.	.	.	G	C	.	.	T	.	T	1
35	A	.	A	G	T	1
36	.	A	G	1
37	G	A	1
38	C	.	.	G	1

En la Tabla 4 se muestran los haplotipos identificados por muestra. El haplotipo 2 fue el más abundante (23,44%), estando presente en ambas muestras con un total de 15 individuos. Corrubedo presentó un número de haplotipos mayor que Mira-Vagueira (23 y 14, respectivamente). Tres haplotipos fueron compartidos entre ambas regiones (haplotipos 1, 2 y 8) y el resto de los haplotipos fueron privados, presentes generalmente en solo uno o dos individuos. El número de haplotipos privados fue mayor en Corrubedo (20) que en Mira-Vagueira (14).

Tabla 4. Frecuencias absolutas de los 38 haplotipos del gen COI en las dos muestras analizadas.

Haplotipos	Corrubedo	Mira-Vagueira	TOTAL	%
Hap_1	1	2	3	4,69
Hap_2	8	7	15	23,44
Hap_3	1	0	1	1,56
Hap_4	1	0	1	1,56
Hap_5	1	0	1	1,56
Hap_6	1	0	1	1,56
Hap_7	1	0	1	1,56
Hap_8	4	6	10	15,62
Hap_9	1	0	1	1,56
Hap_10	1	0	1	1,56
Hap_11	1	0	1	1,56
Hap_12	1	0	1	1,56
Hap_13	1	0	1	1,56
Hap_14	1	0	1	1,56
Hap_15	1	0	1	1,56
Hap_16	1	0	1	1,56
Hap_17	1	0	1	1,56
Hap_18	1	0	1	1,56
Hap_19	1	0	1	1,56
Hap_20	1	0	1	1,56
Hap_21	1	0	1	1,56
Hap_22	1	0	1	1,56
Hap_23	1	0	1	1,56
Hap_24	0	1	1	1,56
Hap_25	0	1	1	1,56
Hap_26	0	1	1	1,56
Hap_27	0	1	1	1,56
Hap_28	0	2	2	3,12
Hap_29	0	1	1	1,56
Hap_30	0	1	1	1,56
Hap_31	0	1	1	1,56
Hap_32	0	1	1	1,56
Hap_33	0	1	1	1,56
Hap_34	0	1	1	1,56
Hap_35	0	1	1	1,56
Hap_36	0	1	1	1,56
Hap_37	0	1	1	1,56
Hap_38	0	1	1	1,56
TOTAL	33	31	64	100

Las relaciones entre los diferentes haplotipos se muestran en la red de haplotipos de la Figura 6. Ésta muestra una estructura centrada en los haplotipos comunes más frecuentes (haplotipos 1, 2 y 8) que representan los haplotipos ancestrales a partir de los cuales derivarían los demás. El número de cambios entre los haplotipos es bajo, entre uno y tres.

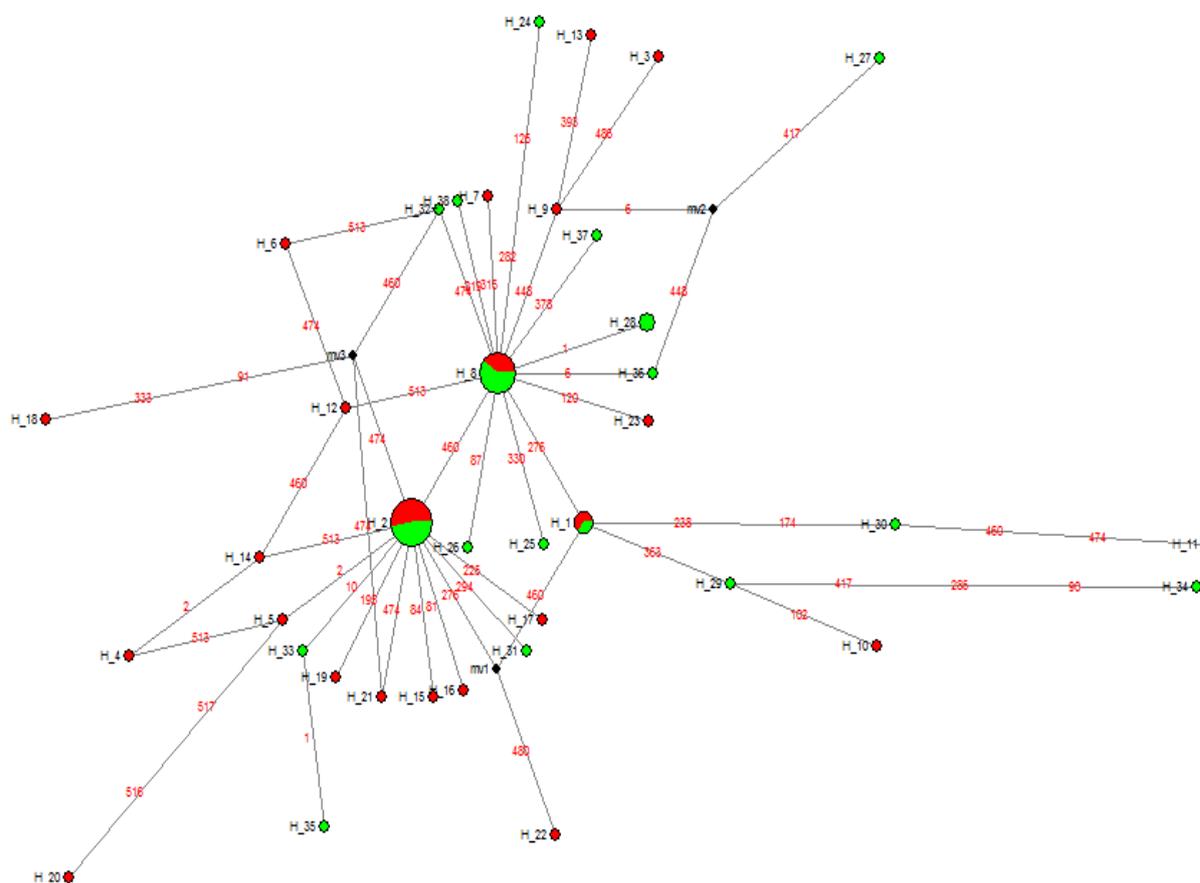


Figura 6. Red de haplotipos inferidas para el gen COI. Cada círculo representa un haplotipo y el tamaño es proporcional a su frecuencia relativa. Los colores indican el origen geográfico (Verde: Mira-Vagueira y rojo: Corrubedo). Los círculos negros representan haplotipos teóricos intermedios. Los números de las ramas indican la posición de los sitios variables.

El nivel de variación en cada una de las muestras analizadas, medido como diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π), se muestra en la Tabla 5. Ambas muestras presentan niveles elevados de diversidad haplotípica: 0,936 en Corrubedo, y 0,918 en Mira-Vagueira. En cuanto a la diversidad nucleotídica los valores fueron bajos pero también similares: 0,0049 en Corrubedo y 0,0043 en Mira-Vagueira.

Tabla 5. Estimaciones de diversidad genética en las secuencias del gen COI.

Localidad	n	Nh	h	π
Corrubedo	33	23	0,936	0,0049
Mira-Vagueira	31	18	0,918	0,0043
TOTAL	64	38	0,924	0,0047

n : Número de individuos analizados; Nh: Número de haplotipos identificados; h : Diversidad haplotípica; π : Diversidad nucleotídica

La diferenciación población se analizó mediante el análisis AMOVA (Tabla 6), el cual mostró que la totalidad de la variación se encuentra dentro de las muestras examinadas. El valor del índice de fijación F_{st} no fue significativamente distinto de cero, por lo que no se detecta diferenciación genética entre las muestras examinadas.

Tabla 6. Análisis molecular de la varianza (AMOVA).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes varianza	% variación
Entre localidades	1	0,35	-0,000356	-0,77
Dentro localidades	62	28,744	0,46361	100,77
TOTAL	63	29,094	0,46005	
Índice de fijación (F_{st})			- 0,00773	

g.l.: grados de libertad. * Diferenciación significativa ($P < 0,05$)

Los análisis de *mismatches* mostraron gráficos con una distribución unimodal, característica de procesos de expansión poblacional (Figura 7). Estos resultados están en consonancia con los valores observados en los estadísticos F_s de F_u , D de Tajima y R_2 de Ramos-Onsis (Tabla 7). Las dos muestras presentaron valores negativos y significativos en los estadísticos F_s de F_u y D de Tajima, así como, valores significativos del estadístico R_2 de Ramos-Onsis. La estructura en estrella inferida de la red de haplotipos (Figura 6) aporta igualmente evidencias adicionales de procesos de expansión poblacional.

Tabla 7. Test de neutralidad para cada muestra.

Muestra	F_s de F_u	P -valor	D de Tajima	P -valor	R_2	P -valor
Corrubedo	-23,224	0,000	-1,995	0,006	0,0436	0,000
Mira-Vagueira	-14,314	0,000	-1,907	0,011	0,0483	0,000
Todas secuencias	-48,518	0,000	-2,255	0,000	0,0287	0,000

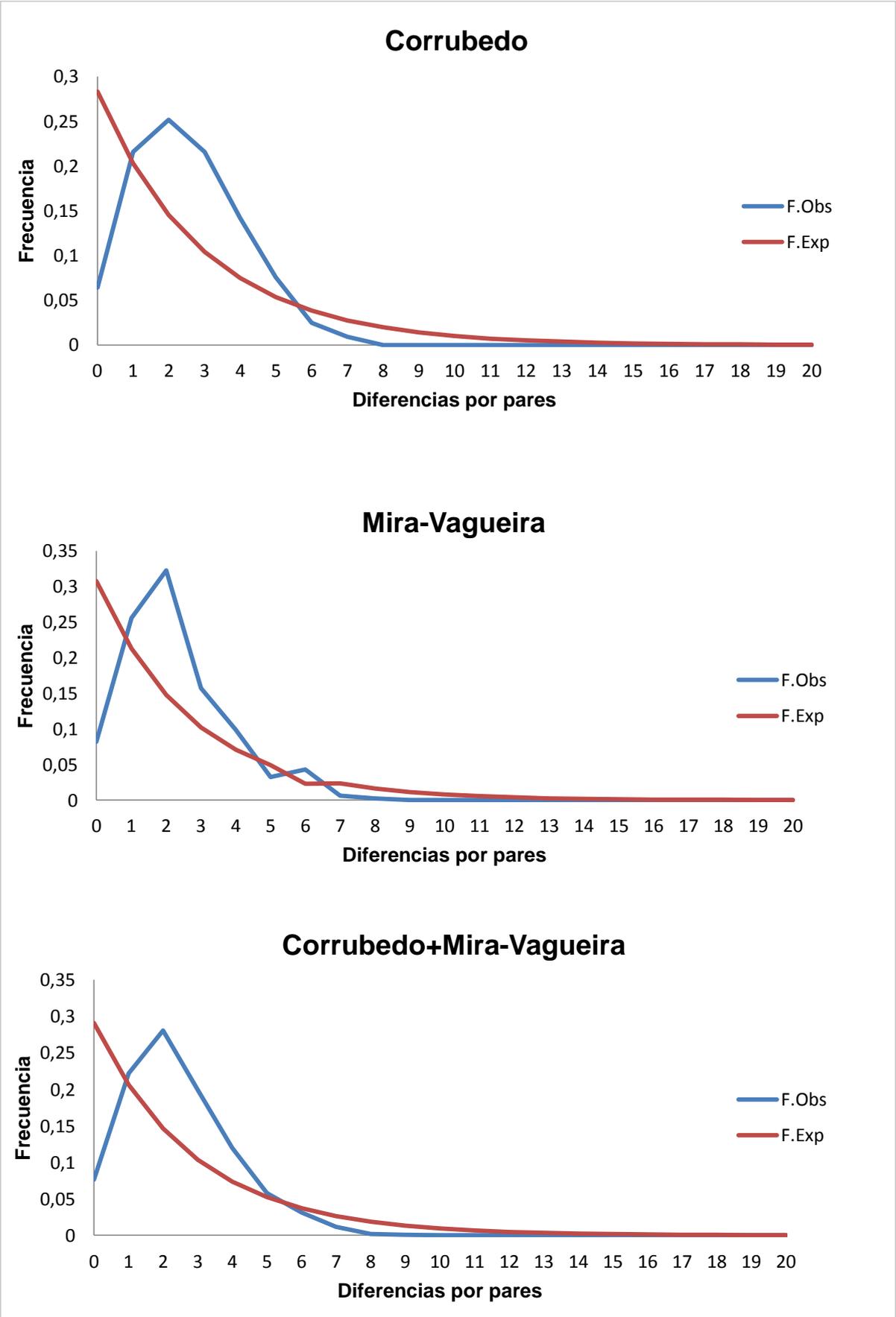


Figura 7. Distribución de *mismatches* para el gen COI en cada muestra y en la muestra global.

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizó un análisis genético de dos muestras de *Donax* de la costa atlántica de Galicia y Portugal empleando marcadores moleculares.

Debido a que las especies de *Donax* de la costa europea muestran una gran similitud morfológica, se procedió a la identificación molecular de las muestras. En primer lugar se utilizó el marcador nuclear ADNr 5S para descartar la presencia de *D. trunculus*, la especie mayoritaria y explotada comercialmente en el sur de Europa. La amplificación por PCR del ADNr 5S es un método sencillo y barato para la identificación de *D. trunculus* pero no permite diferenciar las demás especies del género presentes en la costa atlántica de la Península Ibérica. Por ello se procedió a la amplificación del marcador mitocondrial COI y su posterior análisis mediante digestión con la enzima de restricción *AluI* (PCR-RFLP). El patrón de bandas obtenido ha permitido confirmar que las muestras utilizadas pertenecían a *D. vittatus*.

Por otra parte, la secuenciación de parte del gen COI permitió llevar a cabo un análisis poblacional. El fragmento examinado resultó polimórfico en las dos muestras, identificándose un total de 38 haplotipos. La mayoría de los haplotipos fueron privados y se encontraron a baja frecuencia (uno o dos individuos), compartiendo las dos muestras únicamente tres de los haplotipos. De las dos muestras, Corrubedo presentó más haplotipos que Mira-Vagueira (23 y 18, respectivamente). El número de haplotipos presentes en las muestras examinadas es más alto que el identificado en el COI de *D. trunculus* de la costa atlántica de la Península Ibérica. De las 10 localidades examinadas en esta especie, dos mostraron 18 haplotipos pero en las demás el número osciló entre 9 y 15 (Nantón Varela, 2016). Las diferencias en el número de haplotipos resultan más marcadas al comparar con otros bivalvos de la misma área geográfica. En las poblaciones analizadas del berberecho *Cerastoderma edule* tan solo se detectaron de 4 a 7 haplotipos (Krakau *et al.*, 2012; Vergara-Chen *et al.*, 2014) y en la almeja babosa *Venerupis pullastra* de 5 a 11 (Pereira Fernández, 2013).

Las dos muestras de *D. vittatus* presentaron niveles elevados y similares de diversidad haplotípica (0,936 en Corrubedo y 0,918 en Mira-Vagueira). En *D. trunculus*, una localidad gallega mostró un valor similar (0,911) pero la diversidad haplotípica en las demás localidades examinadas fue menor (0,741-0,893). Como en el caso del número de haplotipos, las diferencias respecto *C. edule* (Vergara-Chen *et al.*, 2014) y *V. pullastra* (Pereira Fernández, 2013) fueron más marcadas al encontrarse valores de 0,450-0,754 y 0,231-0,623, respectivamente. En el caso de la diversidad nucleotídica, los valores fueron bajos en las dos muestras (0,0043 y 0,0049), encontrándose en el rango de *D. trunculus* (0,0040-0,0068) y por encima de los de *C. edule* (0,0013-0,0018) y *V. pullastra* (0,0004-0,003).

Los valores de diversidad genética que presenta *D. vittatus* en contraposición a otros bivalvos con los que coexiste pueden ser debidos a sesgos en el tamaño de muestra pero no puede descartarse que reflejen el impacto de la pesca. *D. vittatus*, a diferencia de *D. trunculus*, *C. edule* y *V. pullastra* no se encuentra sometida a una explotación continuada como ocurre en estas especies, por lo que su diversidad genética probablemente no ha sido erosionada.

Para evaluar la diferenciación poblacional se recurrió al análisis AMOVA, que no aportó indicios de diferenciación genética entre las dos muestras analizadas. Esto sugiere la existencia de elevado flujo génico entre las dos áreas, de modo que la totalidad de la variación se encuentra entre los individuos. Estos resultados están en consonancia con los datos proporcionados por el COI en *D. trunculus* (Nantón Varela, 2016), *V. pullastra* (Pereira Fernández, 2013) o *C. edule* (Krakau *et al.*, 2012) de la costa atlántica de la Península Ibérica. La ausencia de diferenciación genética en el medio marino puede ser debida a diferentes factores como la ausencia de barreras geográficas en los océanos que propicia un elevado flujo génico, además de la existencia de tamaños poblacionales grandes o la presencia de fase

larvaria planctónica (Ward, 2000; Launey *et al.*, 2002). No obstante, el hecho de que no se detecte estructura poblacional no significa necesariamente que esta no exista, ya que puede ocurrir que el marcador utilizado, el gen COI en este caso, no refleje la variación interpoblacional (Ward, 2000).

El análisis poblacional de las muestras también ha permitido realizar inferencias sobre la historia demográfica de *D. vittatus*. Diferentes evidencias como la existencia de valores elevados de diversidad haplotípica y valores bajos de diversidad nucleotídica, la estructura estrellada de la red de haplotipos con todos los haplotipos diferenciados por pocos pasos mutacionales y estrechamente relacionados con los más frecuentes, así como, los resultados del análisis de *mismatches*, los test F_s de F_u y D de Tajima y el estadístico R_2 de Ramos-Onsis sugieren un escenario de expansión poblacional debido al crecimiento rápido de una población ancestral con bajo tamaño efectivo (Avise, 2000).

A pesar que en *D. trunculus* se ha descrito la presencia de DUI (Theologidis *et al.*, 2008), los datos obtenidos en este trabajo no proporcionan evidencias de este tipo de herencia en *D. vittatus*. La existencia de DUI podría ser reconocida en la red de haplotipos por la presencia de dos haplogrupos claramente divergentes. No obstante, no puede descartarse que existan dos tipos de ADNmt en *D. vittatus* ya que los cebadores utilizados podrían haber amplificado únicamente un tipo, presumiblemente el tipo F por ser el tipo dominante en el tejido somático.

6. CONCLUSIONES

Del trabajo realizado se deducen las siguientes conclusiones:

1. La utilización de dos marcadores moleculares descritos previamente ha permitido corroborar la identidad de *D. vittatus* en dos muestras de la costa atlántica de la Península Ibérica.
2. Se aportan las primeras estimas de la diversidad genética de *D. vittatus*. Las dos muestras examinadas tienen valores altos de diversidad haplotípica y superiores a los de otros bivalvos explotados comercialmente con los que comparten distribución geográfica.
3. No se detectó diferenciación poblacional entre las muestras, pero es necesario examinar más marcadores moleculares para descartar la ausencia de estructura poblacional.
4. La historia demográfica inferida para las muestras sugiere un escenario de expansión poblacional.

CONCLUSIÓNS

Do traballo realizado dedúcense as seguintes conclusións:

1. A utilización de dous marcadores moleculares descritos previamente permitiu corroborar a identidade de *D. vittatus* en dúas mostras da costa atlántica da Península Ibérica.
2. Apórtanse as primeiras estimas da diversidade xenética de *D. vittatus*. As dúas mostras examinadas teñen valores altos de diversidade haplotípica e superiores ós de outros bivalvos explotados comercialmente cos que comparten distribución xeográfica.
3. Non se detectou diferenciación poboacional entre as dúas mostras, pero é necesario examinar mais marcadores moleculares para descartar a ausencia de estrutura poboacional.
4. A historia demográfica inferida para as mostras suxire un escenario de expansión poboacional.

CONCLUSIONS

In this work, the following conclusions were inferred:

1. The identity of two samples of *D. vittatus* from the Atlantic coast of the Iberian Peninsula was corroborated using two molecular markers previously described.

2. The first estimates of *D. vittatus* genetic diversity are provided here. The two samples examined showed high haplotype diversity and the values were higher than those of other commercially exploited bivalve with the same geographical distribution.
3. Evidences of population differentiation was not found, but to exclude the absence of population structure other molecular markers should be examined.
4. The inferred demographic history of samples corresponds to a scenario of population expansion.

7. BIBLIOGRAFIA

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1997). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.

Ansell AD, Lagardère F (1980). Observations on the biology of *Donax trunculus* and *D.vittatus* at Ile d'Oléron (French atlantic coast). *Marine Biology*, 57: 287-300.

Ansell AD (1983). The biology of the genus *Donax*. En: *Sandy beaches as ecosystems*. McLachlan A y Erasmus T (eds). University of Port Elisabeth pp: 607-636.

Asensio L, González I, Rojas M, García T, Martín R (2009). PCR-based methodology for the authentication of grouper (*Epinephelus marginatus*) in commercial fish fillets. *Food Control*, 20: 618-622.

Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.

Avice JC (2000). *Phylogeography: The history and formation of species* (2^a ed). Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Avice JC (2004). *Molecular markers, natural history and evolution* (2^a ed). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Ballard JWO, Whitlock MC (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13: 729-744.

Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.

Chícharo L, Chícharo A, Gaspar M, Alves F, Regala J (2002). Ecological characterization of dredged and non-dredged bivalve fishing areas off south Portugal. *Journal Marine of the Biological Association of the UK*, 82: 41-50.

Excoffier L, Lischer HEL (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.

Ferguson A, Taggart JB, Prodohl PA, McMeel O, Thompson C, Stone C, McGinnity P, Hynes RA (1995). The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology* 47: 103-126.

Galtier N, Nabholz B, Glémin S, Hurst GDD (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, 18: 4541-455.

Gaspar MB, Ferreira R, Monteiro CC (1999). Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca: Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fisheries Research*, 41: 309-316.

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.

Hartl DL, Clark AG (2007). *Principles of population genetics* (4^a ed). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Johnson MS (2000). Measuring and interpreting genetic structure to minimize the genetic risks of translocations. *Aquaculture Research*, 31: 133-143.
- Krakau M, Jacobson S, Jensen KT, Reise K (2012). The cockle *Cerastoderma edule* at Northeast Atlantic shores: genetic signatures of glacial refugia. *Marine Biology*, 159: 221-230.
- Lagardère F (1972). Les fonds de pêche de la côte ouest de l'île d'Oléron. Cartographie bionomique. II Remarques systématiques, biologiques et écologiques. *Téthys*, 3: 265–281.
- 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.
- Librado P, Rozas J (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Liu ZJ, Cordes JF (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.
- Nanton Varela A (2015). Desarrollo, evaluación y aplicación de marcadores moleculares para el análisis genético de la coquina *Donax trunculus*. Tesis doctoral, Universidade da Coruña.
- Nantón A, Freire R, Arias-Pérez A, Gaspar MB, Méndez J (2015). Identification of four *Donax* species by PCR-RFLP analysis of cytochrome c oxidase subunit I (COI). *European Food Research and Technology*. 240: 1129-1133
- Nei M (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 269-292.
- Maiga F, Pimenta J (2007). Estudo do crescimento de *Donax vittatus* na costa ocidental norte de Portugal. Dados científicos para a gestão de uma nova pescaria. *Relatórios científicos e técnicos*. Instituto de Investigação das Pescas e do Mar. Lisboa, Portugal.
- Molares J, Parada JM, Navarro-Pérez E, Fernández A (2008). Variabilidad interanual de las ventas de los principales recursos marisqueros de Galicia y su relación con las condiciones ambientales. *Revista Galega dos Recursos Mariños*, 2: 1-42.
- Morvezen R, Charrier G, Boudry P, Chauvaud L, Breton F, Strand O, Laroche J (2015). Genetic structure of a commercially exploited bivalve, the great scallop *Pecten maximus*, along the European coasts. *Conservation genetics*, 17: 57-67
- Pereira AM, Fernández-Tajes J, Gaspar MB, Méndez J (2012). Identification of the wedge clam *Donax trunculus* by a simple PCR technique. *Food Control*, 23: 268–270
- Pereira Fernández SM (2013). Estudio genético poblacional de la almeja babosa *Venerupis pullastra*. Tesis doctoral, Universidade da Coruña.
- Ramón M, Cano J, Peña JB, Campos MJ (2005). Current status and perspectives of mollusc (bivalves and gastropods) culture in the Spanish Mediterranean. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 21: 361–373.
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 2092-2100.

Rasmussen RS, Morrissey MT (2008). DNA-Based methods for the identification of commercial fish and seafood species. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 7: 280-295.

Rogers AR, Harpending H (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.

Rufino MM, Gaspar MB, Pereira AM, Maynou F, Monteiro CC (2010). Ecology of megabenthic bivalve communities from sandy beaches on the south coast of Portugal. *Scientia Marina*, 74: 163–178

Salas C, Tirado C, Manjón-Cabeza ME (2001). Sublethal foot-predation on Donacidae (Mollusca: Bivalvia). *Journal of Sea Research*, 46: 43–56

Tajima F (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

Thébaud O, Véron G, Fifas S (2005). Incidences des épisodes d'efflorescences de micro algues toxiques sur les écosystèmes et sur les pêcheries de coquillages en baie de Douarnenez. *Rapport Ifremer*, R.INT.DCB/DEM – DCB/STH/UDPP 05-010. Brest, France

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.

Vergara-Chen C, Rodrigues F, González-Wangüemert M (2015). Population genetics of *Cerastoderma edule* in Ria Formosa (southern Portugal): the challenge of understanding an intraspecific hotspot of genetic diversity. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 95: 371-379.

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.

Zeichen MM, Agnesi S, Mariani A, Maccaroni A, Ardizzone GD (2002). Biology and population dynamics of *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae) in the South Adriatic Coast (Italy). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 54: 971-982.