

Facultade de Ciencias
Departamento de Bioloxía
Área de Xenética

**Análisis genético de la coquina *Donax trunculus* mediante
marcadores microsatélite**

**Análise xenética da coquina *Donax trunculus* mediante
marcadores microsatélite**

**Genetic analysis of the wedge clam *Donax trunculus* using
microsatellite markers**

María Río Peña

Trabajo Fin de Grado

Fecha de defensa: 28 de junio de 2017

Dirigido por:

Dra. Josefina Méndez Felpeto

Dra. Ana Nantón Varela



RESUMEN

La coquina *Donax trunculus* se encuentra en las costas del Atlántico y del Mediterráneo, en la actualidad, es sobreexplotada comercialmente y sus bancos naturales están en recesión. En este trabajo se llevó a cabo la identificación de 40 individuos de Sidi Salem (Argelia) como *D. trunculus* mediante el marcador molecular 5S ADNr. Se realizó el estudio de la diversidad genética y diferenciación poblacional de individuos de esta especie de tres localidades de la Península Ibérica (Vilarrube, Fuengirola y Maresme) y una de Argelia (Sidi Salem).

Los resultados muestran que los siete *loci* microsatélite analizados resultaron polimórficos en las cuatro localidades estudiadas y que existen diferencias significativas entre la heterocigosidad esperada y la observada lo que sugiere la existencia de déficit de heterocigotos. Además, se encontraron diferencias significativas entre individuos de las cuatro localidades, lo que indica la existencia de estructura genética en estas regiones.

Palabras clave: *Donax trunculus*, marcadores microsatélite, análisis genético

RESUMO

A coquina *Donax trunculus* encóntrase nas costas do Atlántico e do Mediterráneo, na actualidade, é sobreexplotada comercialmente e os seus bancos naturais están en recesión. Neste traballo levouse a cabo a identificación de 40 individuos de Sidi Salem (Arxelia) como *D. trunculus* mediante o marcador molecular 5S ADNr. Realizouse o estudo da diversidade xenética e diferenciación poblacional de individuos desta especie de tres localidades da Península Ibérica (Vilarrube, Fuengirola e Maresme) e unha de Arxelia (Sidi Salem).

Os resultados mostran que os sete *loci* microsatélite analizados resultaron polimórficos nas catro localidades estudadas e que existen diferenzas significativas entre a heterocigosidade esperada e a observada o que suxire a existencia de déficit de heterocigotos. Ademáis, encontráronse diferenzas significativas entre individuos das catro localidades, o que indica a existencia da estrutura xenética nestas rexións.

Palabras clave: *Donax trunculus*, marcadores microsatélite, análise xenética

ABSTRACT

The wedge clam *Donax trunculus* is found on the Atlantic and Mediterranean coasts and it is currently overexploited commercially and its natural banks are in recession. In this research, the identification of 40 individuals of Sidi Salem (Algeria) as *D. trunculus* was carried out using the molecular marker 5S rDNA. It has been made the study of the genetic diversity and population differentiation of individuals of this species from three localities of the Iberian Peninsula (Vilarrube, Fuengirola and Maresme) and one from Algeria (Sidi Salem).

The results show that the seven analyzed *loci* microsatellite were polymorphic in the four localities studied and that there are significant differences between the expected heterozygosity and the observed one which suggests the presence of heterozygous déficit. In addition, significant differences were found between individuals from the four localities, which indicates the existence of genetic structure in these regions.

Key words: *Donax trunculus*, microstellite markers, genetic analysis

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO	6
MATERIAL Y MÉTODOS	7
Material de estudio	7
Extracción de ADN genómico	7
Identificación de las muestras	8
Amplificación de <i>loci</i> microsatélite	8
Análisis de diversidad genética y diferenciación poblacional	9
RESULTADOS	10
DISCUSIÓN	14
CONCLUSIONES	17
BIBLIOGRAFÍA	19

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de los bancos naturales de moluscos bivalvos sometidos a explotación está experimentando un gran avance en los últimos años gracias al incremento en el número de investigaciones llevadas a cabo. Sin embargo, los estudios disponibles sobre el género *Donax* son escasos y fragmentarios. Las especies de este género representan un recurso muy importante para el sector marisquero y son un componente importante de la macrofauna de las playas arenosas en zonas templadas, tropicales y subtropicales (Ansell, 1983).

El interés del estudio de las especies de este género se debe a la accesibilidad de su hábitat y a las grandes fluctuaciones de sus poblaciones, ya que los cambios estacionales y su abundancia pueden hacer variar entre unos pocos individuos en un año hasta miles en el próximo. Este hecho puede estar condicionado por las playas arenosas en las que habitan ya que están consideradas como ambientes muy dinámicos controladas por numerosos factores condicionando así la distribución espacial y su densidad. Estos pueden ser: salinidad, temperatura, granulometría del sedimento o contenido en materia orgánica, así como otros factores fundamentales como son la reproducción y la caracterización genética (Gosling, 2003). Todo ello, puede afectar a la dinámica y estructura de las poblaciones de estos bivalvos de interés comercial.

La coquina *Donax trunculus* (Linné, 1785) es un molusco bivalvo, perteneciente a la clase Bivalvia, orden Veneroida y familia Donacidae, y es una de las seis que constituyen la superfamilia Tellinacea. Es una especie que habita en aguas templadas del mar Negro, mar Mediterráneo y océano Atlántico, desde Senegal hasta la costa norte de Francia (Gaspar *et al.*, 1999). En el Mediterráneo habita en playas de arena fina y poco expuestas en las que prácticamente no hay grandes mareas (Mazé & Laborda, 1988), mientras que en la zona Atlántica habita en la zona intermareal y en playas de arena fina expuestas al oleaje. Ya que es un gran excavador vive enterrada en estos bancos arenosos, pero la profundidad varía de 0 a 2 m en el Mediterráneo y de 0 a 6 m en las costas del Atlántico, encontrándose densidades elevadas entre 0 y 3 m, coincidiendo con el contenido en materia orgánica (Gaspar *et al.*, 1999).

Presenta una concha sólida, de forma triangular, con una superficie lisa con bandas concéntricas y su coloración es variable desde blanquecina a un marrón claro en el exterior y de violácea a blanquecina en el interior (Figura 1).



Figura 1. Coquina *D. trunculus*.

Se alimenta filtrando el material orgánico resuspendido gracias a sus largos sifones, por lo que puede ser utilizado como bioindicador para medir el estado de las aguas donde se encuentra (Hafsaoui *et al.*, 2016). La fecundación es externa y el desove tiene lugar entre los meses de marzo y agosto (Gaspar *et al.*, 1999) y la madurez se alcanza durante el primer año de vida siendo su esperanza de vida entre 3 y 5 años.

Las especies del género *Donax* son explotadas con fines comerciales en varios países como España (Ramón *et al.*, 2005; Molaes *et al.*, 2008), Portugal (Gaspar *et al.*, 1999; Chícharo *et al.*, 2002), Francia (Thébaud *et al.*, 2005) e Italia (Zeichen *et al.*, 2002). En Galicia, actualmente la comercialización se reduce a la coquina *D. trunculus* y fundamentalmente del banco de Vilarrube - Cedeira.

Atendiendo a las estadísticas de la Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia (<http://www.pescadegalicia.gal>), en el año 2016 la coquina fue el bivalvo que alcanzó un mayor precio medio (38,52€/kg) pero una de las especies de las que menor cantidad (557 kg) se vendió en las lonjas de la comunidad (Tabla 1).

Tabla 1. Nivel de capturas (kg) y valor económico (€) de moluscos bivalvos descargados en las lonjas gallegas durante el año 2016. Datos recogidos del Servicio de Estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia (<http://www.pescadegalicia.gal>).

Especie	kg	Importe €	Medio €/kg
Almeja babosa	923.401	14.595.267	15,81
Almeja bicuda	11.902	55.162	4,63
Almeja fina	379.570	11.230.858	29,59
Almeja rubia	514.750	4.419.713	8,59
Almeja japonesa	2.618.161	22.286.238	8,51
Ameixón	72.248	257.578	3,57
Berbercho	2.028.558	9.308.746	4,59
Birollo	28.563	156.787	5,49
Coquina	557	21.461	38,52
Carneiro	103.902	438.183	4,22
Cornicha	2.969	15.750	5,30
Longueirón	29.886	236.965	7,93
Longueirón viejo	54.888	259.351	4,73
Navaja	540.530	5.129.618	9,49
Ostra plana	243.106	493.014	2,03
Ostra rizada	60.024	55.761	0,93
Rabioso	86	75	0,88
Reló	260.573	589.621	2,26
Vieira	70.872	335.865	4,74
Volandeira	102.208	385.434	3,77
Zamburiña	7.346	43.868	5,97
TOTAL	8.054.100	70.315.315	

La producción de coquina en los últimos diez años se muestra en la Figura 2. En el 2008 se alcanzó el valor más alto, con más de 15000 kg. Sin embargo, desde el año 2013 la producción empieza a tener un descenso muy acusado hasta que el año pasado no alcanza los 600 kg. Este descenso concuerda con el valor económico del bivalvo, ya que el precio por kg se disparó aproximándose a los 40 €/kg en el año 2016, mientras que en el 2013 superaba ligeramente los 25 €/kg.

Actualmente, el banco natural de Vilarrube-Cedeira presenta una explotación reducida debido al descenso que se ha detectado en la población natural.

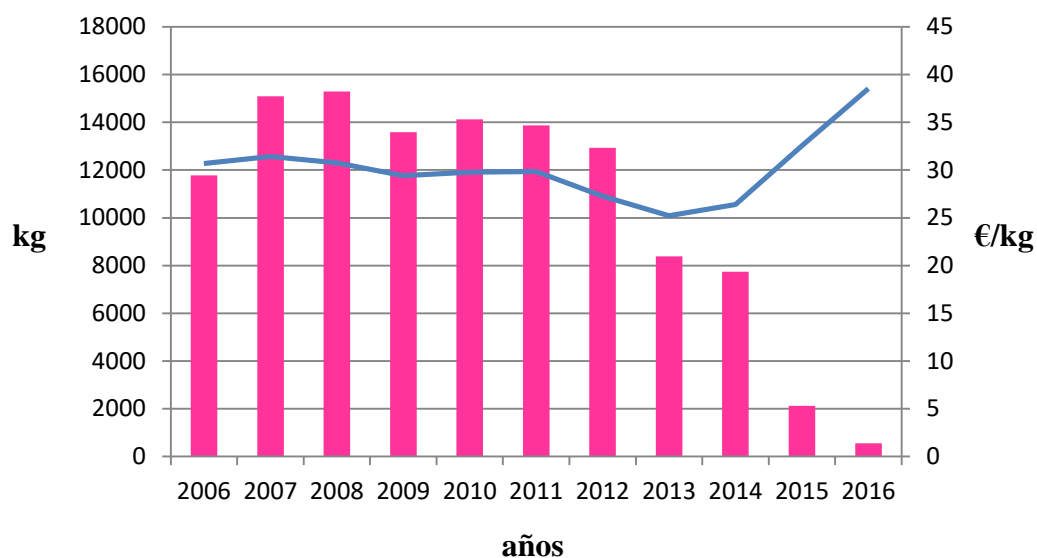


Figura 2. Progresión de la producción (en kg) y del precio por kilo (€/kg) de coquina durante los años 2006-2016. Datos recogidos del Servicio de Estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia (<http://www.pescadegalicia.gal>).

El descenso de producción de coquina en las costas gallegas podría relacionarse con la sobreexplotación a la que se ha visto sometida esta especie. Sin embargo, existen otros factores que podrían estar implicados como los movimientos de arena después de fuertes temporales, la realización de construcciones próximas (como paseos marítimos) que alteran el funcionamiento ecológico del banco o el tipo de sustrato de éste, entre otros. Estudios recientes (Marie *et al.*, 2016; Urra *et al.*, 2017) ponen de manifiesto que el descenso en la producción de coquina no es únicamente un problema en Galicia sino también en otras regiones del sur de la Península Ibérica. Por ello, existe un gran interés en la recuperación y gestión de los bancos naturales de *D. trunculus* para lo cual son importantes los estudios genéticos que permitan caracterizar y evaluar la variación genética de este recurso con el objetivo de obtener datos que permitan evitar la pérdida de variabilidad genética y mejorar su gestión sostenible (Allendorf *et al.*, 2008). Para ello, aparte de estudiar la diversidad y diferenciación poblacional de la especie también se podrían realizar programas de mantenimiento de las condiciones óptimas de su hábitat para aumentar las posibilidades de que los estudios genéticos resulten satisfactorios, así como, la recuperación de la especie a través de prácticas de cultivo en criadero (Ward, 2006).

Para una conservación y gestión adecuada de los bancos naturales es necesario conocer las características genéticas de los individuos que componen las diferentes localidades. Recientemente (Nantón, 2015) se han desarrollado estudios genético poblacionales que aportan datos sobre la composición genética de la coquina de Galicia.

Los marcadores moleculares son herramientas que posibilitan los estudios genéticos necesarios para el análisis de poblaciones naturales. Dentro de los diferentes tipos de marcadores destacan los microsatélites. Se encuentran tanto en procariotas como eucariotas, y están ampliamente distribuidos por el genoma especialmente en la eucromatina de eucariotas y en las regiones codificantes y no codificantes del ADN nuclear y de los orgánulos (Carneiro Vieira *et al.*, 2016; Abdul-Muneer, 2014). Consisten en secuencias cortas (de 1 a 6 bases nucleotídicas) repetidas en tándem un elevado número de veces, con una alta tasa de variación en el número de copias entre individuos. Debido a la elevada tasa de polimorfismo que suelen presentar, se han convertido, en los últimos años, en uno de los marcadores más utilizados en identificación de especies, estudios de poblaciones, estudios de conservación y manejo de especies en peligro de extinción, análisis de parentesco, análisis de paternidad, etc. Estos marcadores se caracterizan por presentar herencia mendeliana simple, ser codominantes y altamente polimórficos (Chistiakov *et al.*, 2006). Este elevado polimorfismo es debido a la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN y la recombinación desigual (Oliveira *et al.*, 2006).

Las ventajas que ofrecen los microsatélites se deben, en parte, a la posibilidad de la amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) con resultados fáciles de analizar, fiables y repetitivos, siendo además muy abundantes en los genomas nucleares de todos los eucariotas.

En cuanto a los inconvenientes, uno de ellos es que resulta necesario aislarlos de novo para cada especie, ya que es preciso conocer las secuencias que flanquean a los motivos microsatélite para el diseño de cebadores (González, 2003). La utilización de los cebadores de una especie para amplificar por PCR microsatélites en especies cercanas suele resultar difícil y puede provocar la aparición de alelos nulos, debido a sustituciones, deleciones e inserciones en las secuencias que corresponden a los sitios de unión de los cebadores específicos. Esto puede implicar la asignación errónea de individuos heterocigóticos como homocigóticos, y puede suponer a la larga la acumulación de grandes errores en los análisis de datos si los alelos nulos son abundantes (González, 2003).

Como se ha señalado previamente, para abordar cualquier problema de mejora en un banco natural sometido a explotación, es necesario realizar estudios genéticos que informen de la situación de los individuos de las localidades. Los análisis de diversidad genética y diferenciación entre las localidades objeto de estudio pueden contribuir a la gestión sostenible del recurso y proponer acciones para su recuperación de la producción y/o aumento de la misma.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es el estudio de la diversidad genética y la estructura poblacional de la coquina *D. trunculus* mediante marcadores microsatélite en las playas de la costa de la Península Ibérica (Vilarrube, Fuengirola, Maresme) y del norte de África (Sidi Salem).

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio

Un total de 185 individuos de *D. trunculus* han sido analizados, 40 procedentes de Sidi Salem, localidad situada en el Golfo de Annaba, en la costa de Argelia (África), obtenidos en 2016 tras una colaboración con la Universidad Badji-Mokhart de Annaba. Además, para los análisis de diversidad genética y diferenciación poblacional se emplearon los genotipos de individuos procedentes de tres localidades de la Península Ibérica: Vilarrube (45), Fuengirola (50), Maresme (50) ya disponibles en el laboratorio (Fig. 3). En el laboratorio se diseccionó cada uno de los ejemplares y se conservaron en etanol 96% para su posterior utilización.

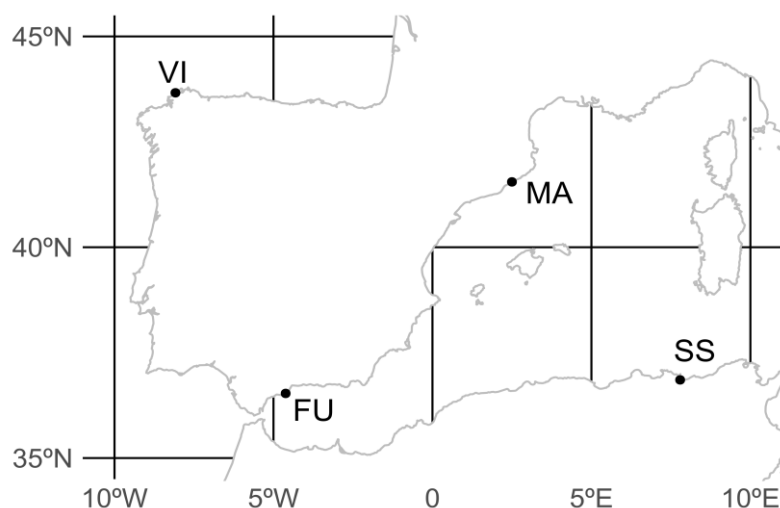


Figura 3. Mapa de las diferentes localidades estudiadas: VI (Vilarrube), FU (Fuengirola), MA (Maresme) y SS (Sidi Salem).

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico total de los 40 individuos de Sidi Salem se realizó a partir de un fragmento (aprox. 1 mm³) de músculo del pie siguiendo el método descrito por Walsh *et al.* (1991). Se hicieron dos lavados de 10 minutos de las muestras en agua milliQ estéril para eliminar el etanol. Las secciones de tejido se secaron al aire y posteriormente se introdujeron cada uno en un tubo eppendorf con 100 µl de Chelex 100TM (Sigma-Aldrich) al 10% (g/ml) en agua miliQ estéril y se incubaron 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.).

Identificación de las muestras

En la Península Ibérica y la costa de África la especie *D. trunculus* puede compartir nicho ecológico con otras del género *Donax* (*D. semistriatus*, *D. variegatus*, *D. striatus* y *D. vittatus*). Para su identificación se procedió al empleo de un método que se basa en la amplificación del marcador nuclear 5S ADNr desarrollado por el grupo Xenomar (Pereira *et al.*, 2012).

Esta amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl que contenía 150 ng de ADN genómico extraído a partir de tejido muscular, 0,75 U de *Taq* ADN polimerasa, tampón de la polimerasa 1x, 0,25 mM de dNTPs, 0,6 µM de cada cebador y agua milliQ estéril. Se emplearon los cebadores descritos por Fernández-Tajes y Méndez (2007) (5SF: –5' CGTCCGATCACCGAAGTTAA 3'– y 5SR: – 5' ACCGGTGTTTTCAACGTCAT 3'–). Además se amplificaron individuos control de las especies *D. semistriatus*, *D. vittatus* y *D. variegatus*, disponibles en el laboratorio. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad) que consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 94°C, seguida de 34 ciclos de desnaturalización de 30 s a 94°C, un alineamiento de 30 s a 55°C y una extensión de 40 s a 72°C, y una extensión final de 7 min a 72°C. La longitud de los fragmentos se determinó por comparación con el marcador XIV de Roche™ de peso molecular conocido (100-1500 pb) en una electroforesis en un gel de agarosa al 2%. El proceso de migración de la electroforesis se observó mediante los colorantes azul de bromofenol y xileno cianol incluidos en el tampón de carga. La electroforesis se realizó a unos 90 V y se dejó migrar hasta que el azul de bromofenol alcanzó los 2/3 del gel Finalmente, se tiñó por inmersión con bromuro de etidio (0,5 µg/ml en 1xTAE) durante 30 min y se visualizó en un transiluminador Gel Doc XR (Bio-Rad).

Amplificación de loci microstélite

Para el total de 185 individuos se amplificaron 7 loci microsatélite polimórficos incluidos en la *Multiplex* 1 (Tabla 2) descrita por Nantón *et al.* (2014). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 12,5 µl con 80 ng de ADN extraído con Chelex, 1x Qiagen *Multiplex PCR Master Mix* (HotStarTaq®, tampón, MgCl₂ 3 mM y mezcla de dNTPs) y la mezcla de cebadores correspondiente. El programa de PCR consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 90 s a 57°C, 90 s a 72°C; y una extensión final de 10 min a 72°C. Se llevó a cabo en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad).

Los individuos analizados se genotiparon para los 7 loci amplificados empleando el programa GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems).

Tabla 2. Características de los 7 loci microsatélite incluidos en la *Multiplex 1*.

<i>Locus</i>	Motivo microsatélite	Secuencia cebadores (5'-3')	MgCl ₂ (mM)	T ^a (°C)
Dtr53	(GT) ₃ AT (GT) ₃ AGA GG GT GG AT TT (GT) ₁₁	F: GGAGAGCAAATGTTATGACAAG R: ACATGGGCTTAGGACAGTT	2,5	60
Dtr70	(TGTC) ₅	F: CCCCTTTTCTGGGCATTATT R: TGCGCTTACAAGAAATGTGG	1,5	60
Dtr86	(GACA) ₄	F: TCAAATTAGAGAGCGGACCAA R: CCATATTGTGGTATGGGAGACA	1,5	60
Dtr126	(GACA) ₄ GATT (GACA) ₃ GATG (GACA) ₂	F: CCCAATGGCCTCAAATAGTG R: CCCATCATGATCAGTAATCACC	1,5	60
Dtr174	(ACAG) ₃	F: GCAATGTAAAGTTGCGTTGTG R: CTTTGCTTTTCTTTGGTACCTAGC	1,5	60
Dtr199	(ACAG) ₅	F: GGACACATGATGATAAAGGACA R: TCCATCCCAGTGCTACTTACC	1,5	60
Dtr323	(AAC) ₃	F: AGAACCAACCACACAACAGCCTA R: AGATGATTTGGCGGAAGATG	1,5	60

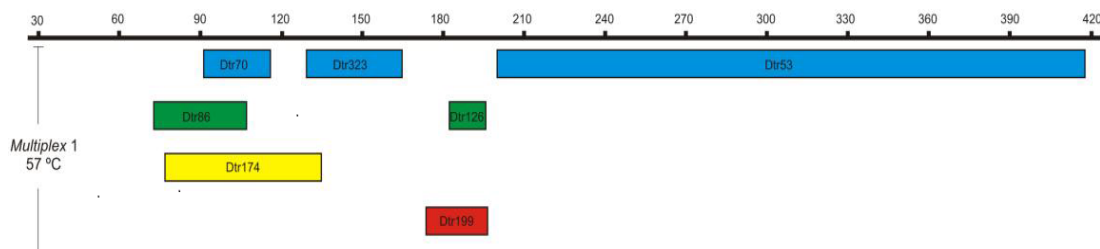


Figura 4. Distribución de los 7 loci microsatélite en la *Multiplex 1*. La longitud de las bandas es proporcional al rango de tamaño de los alelos.

Análisis de diversidad genética y diferenciación poblacional

A partir de los genotipos identificados para cada uno de los individuos se calculó el número de alelos, la heterocigosidad observada (*H_o*) y la heterocigosidad esperada insesgada de Nei (1978) (*H_e*) utilizando el programa Genepop v.4.5 (Rousset *et al.*, 2008). La riqueza alélica se determinó con el programa Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2001). Con el programa Genetix v.4.05 (Belkhir *et al.*, 2004) se calculó el coeficiente de endogamia según Weir y Cockerham (*F_{is} W&C*) (Weir & Cockerham, 1984) para determinar la existencia de deficiencia/exceso de heterocigotos. También se calcularon los tests para determinar la bondad de ajuste de las proporciones genotípicas al equilibrio Hardy-Weinberg (HW) y a las condiciones de equilibrio de ligamiento de los loci con el programa Genepop v.4.6 (Rousset *et al.*, 2008). El nivel de significación se determinó mediante el método de cadena de Markov empleando 10000

dememorizations, 5000 *batches* y 5000 iteraciones por *batch*. La frecuencia de alelos se calculó usando el programa MicroChecker (Van Oosterhout *et al.*, 2004), y ésta se estimó según el método de Brookfield 1 (Brookfield, 1996). En los casos en que se realizaron tests múltiples los valores de significación se ajustaron utilizando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

El grado de diferenciación poblacional se evaluó mediante el índice de fijación F_{st} de Weir & Cockerham (1984) por *locus*, global y por pares de localidades empleando el programa Genetix v.4.05 (Belkhir *et al.*, 2004). Los valores de significación se evaluaron mediante la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

RESULTADOS

En este trabajo se identificaron individuos de Sidi Salem mediante electroforesis en gel de agarosa en el que se observa producto de PCR del 5S ADNr de varios de ellos (Figura 5).

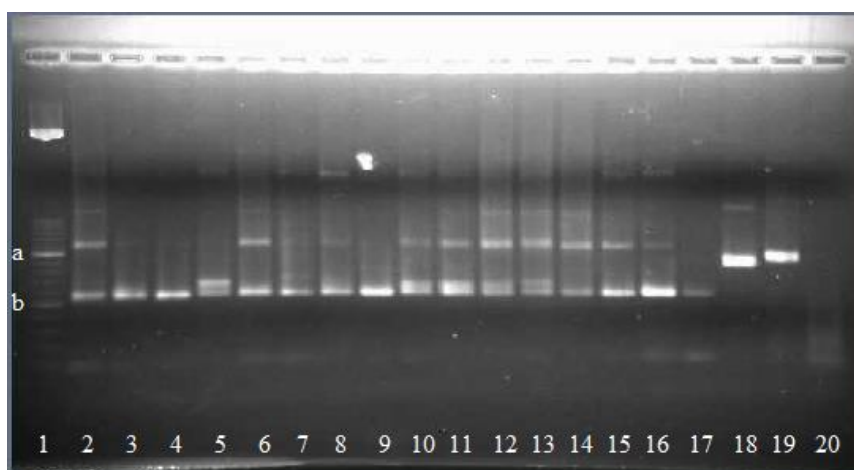


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR del 5S ADNr de varios individuos de Sidi Salem (carriles 2-17). Controles de *D. variegatus* y *D. vittatus* (carriles 18 y 19). Marcador de peso molecular XIII de Roche en carril 1 [(a): 500pb, (b): 250pb]. Control negativo (carril 20).

Dado que se identificaron todos los individuos de la localidad de Sidi Salem analizados como *D. trunculus* se procedió a estudiar su diversidad genética junto con los individuos pertenecientes al resto de las localidades.

En la Tabla 3 se muestran las características de los 7 *loci* microsatélite estudiados en este trabajo.

Tabla 3. Características de los 7 *loci* analizados por localidades. VI: Vilarrube; FU: Fuengirola; MA: Maresme y SS: Sidi Salem.

		Dtr53	Dtr70	Dtr86	Dtr126	Dtr174	Dtr199	Dtr323
VI	<i>N</i>	39	45	34	38	41	44	45
	<i>Na</i>	18 (1)	6	10 (1)	5	9	5 (1)	4
	<i>He</i>	0,842	0,749	0,835	0,622	0,601	0,322	0,222
	<i>Ho</i>	0,821	0,644*	0,618*	0,316**	0,244**	0,318	0,156
	<i>Fis W&C</i>	0,025	0,141	0,264	0,496	0,597	0,012	0,301
	<i>Rs</i>	14,055	5,358	8,847	4,405	7,610	4,222	2,976
FU	<i>N</i>	48	50	37	39	43	44	50
	<i>Na</i>	18	7	10 (1)	11	8	8 (3)	5
	<i>He</i>	0,801	0,755	0,795	0,782	0,789	0,703	0,254
	<i>Ho</i>	0,688	0,640	0,784	0,564**	0,233**	0,432**	0,220
	<i>Fis W&C</i>	0,143	0,154	0,014	0,281	0,708	0,389	0,135
	<i>Rs</i>	13,155	6,225	8,291	8,691	7,266	6,793	3,814
MA	<i>N</i>	45	50	36	43	22	49	49
	<i>Na</i>	25 (6)	6	11 (2)	13 (2)	8 (1)	6 (1)	3
	<i>He</i>	0,909	0,732	0,853	0,819	0,871	0,228	0,190
	<i>Ho</i>	0,733**	0,660	0,694*	0,372**	0,000**	0,225	0,163
	<i>Fis W&C</i>	0,195	0,099	0,188	0,548	1,000	0,016	0,140
	<i>Rs</i>	18,460	5,121	10,035	10,498	8,000	4,387	2,824
SS	<i>N</i>	36	35	36	31	32	36	40
	<i>Na</i>	22 (1)	6	13 (3)	8 (1)	8 (2)	4 (1)	6 (1)
	<i>He</i>	0,928	0,749	0,883	0,690	0,788	0,424	0,425
	<i>Ho</i>	0,806*	0,600	0,556**	0,161**	0,094**	0,306	0,275*
	<i>Fis W&C</i>	0,134	0,201	0,374	0,769	0,883	0,282	0,355
	<i>Rs</i>	17,829	5,596	11,576	7,665	7,495	3,797	4,701

N: número de muestras; *Na*: número de alelos (alelos privados); *He*: heterocigosidad esperada insesgada de Nei; *Ho*: heterocigosidad observada; *Fis W&C*: coeficiente de endogamia según Weir y Cockerman; (*): significativo para $\alpha=0,05$; (**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni; *Rs*: riqueza alélica por localidad basada en un tamaño muestral mínimo de 22 individuos.

En las cuatro localidades todos los *loci* resultaron polimórficos, el número de alelos varió entre 3 (Dtr323) y 25 (Dtr53), ambos en la localidad de Maresme. Se detectaron un total de 28 alelos privados, 3 en Vilarrube, 4 en Fuengirola, 12 en Maresme y 9 en Sidi Salem; seis de los *loci* (excepto Dtr70) presentaron alelos privados en al menos una localidad.

La H_e y la H_o presentaron ambas un rango muy amplio, entre 0,190 (MA-Dtr323) y 0,928 (SS-Dtr53), y entre 0,156 (VI-Dtr323) y 0,821 (Vi-Dtr53), respectivamente.

Los valores de riqueza alélica variaron entre 2,824 (MA-Dtr323) y 18,460 (MA-Dtr53). Ninguno de los tests de desequilibrio de ligamiento realizados para todos los pares de *loci* en cada una de las localidades resultó significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni, por lo que se podría aceptar la hipótesis nula de que los *loci* analizados segregan de forma independiente.

Diecisiete de las 28 combinaciones *locus*-localidad no mostraron desviaciones del equilibrio HW después de la corrección secuencial de Bonferroni. De las 11 combinaciones en desequilibrio, 8 se concentraron en los *loci* Dtr126 y Dtr174 apareciendo en todas las localidades. Todas las combinaciones que no se ajustaron al equilibrio presentaron valores F_{is} positivos (entre 0,014 y 1,000), indicando la existencia de déficit de heterocigotos.

Los individuos pertenecientes a la localidad de Sidi Salem los valores de polimorfismo resultaron iguales en todas las localidades estudiadas. Con respecto a la heterocigosidad esperada, los datos reflejan una gran similitud entre Sidi Salem y las demás localidades. La heterocigosidad observada muestra valores más altos en esta localidad que en Vilarrube y Maresme, y más bajos que en Fuengirola.

En Sidi Salem los *loci* Dtr126 y Dtr174 presentaron desviaciones del equilibrio HW, como en todas las demás localidades, además del *locus* Dtr86. En cuanto a los coeficientes de endogamia, se observó que en esta localidad, en general, son más altos que en las demás localidades, siendo esta diferencia más acentuada con Vilarrube. Los valores de riqueza alélica son similares en todas las localidades, sin embargo Sidi Salem para el *locus* Dtr53 presenta una mayor riqueza alélica que Fuengirola y Vilarrube, y algo menor que la localidad del Maresme. Con respecto al *locus* Dtr86 la riqueza alélica mostró valores más altos que en cualquiera de la otras localidades.

El programa MicroChecker sugirió la presencia de alelos nulos en las 11 combinaciones *locus*-localidad que no se encontraron en equilibrio HW (Tabla 3). Los *loci* Dtr70 y Dtr323 no mostraron evidencias de alelos nulos en ninguna localidad. El *locus* Dtr126 mostró una frecuencia de alelos nulos superior a 0,2 en dos localidades (Maresme y Sidi Salem) y el *locus* Dtr174 en todas. Con el fin de que no interfirieran en el análisis de la diversidad genética y diferenciación poblacional se eliminaron para el resto de los análisis los *loci* Dtr126 y Dtr174 (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia alelos nulos por *locus* en cada población.

	Dtr53	Dtr86	Dtr126	Dtr174	Dtr199
Vilarrube	-	-	0,185	0,219	-
Fuengirola	-	-	0,117	0,308	0,155
Maresme	0,087	-	0,242	0,460	-
Sidi Salem	-	0,169	0,308	0,384	-

Los análisis de diferenciación entre localidades se llevaron a cabo con los 5 *loci* microsatélite elegidos.

En la Tabla 5, tras la utilización del programa Genetix se refleja que el índice de fijación *Fst* global fue de 0,051, significativamente distinto de cero ($P < 0,05$). Los valores *Fst* por *locus* oscilaron entre -0,006 (Dtr70) y 0,341 (Dtr199), siendo este último el que alcanza valores más elevados.

Tabla 5. Valores *Fst* por *locus* y global y P-valores.

Locus	<i>Fst</i>	P-valor
Dtr53	0,045	0,000*
Dtr70	-0,006	0,880
Dtr86	0,015	0,016*
Dtr126	0,029	0,010*
Dtr174	0,048	0,000*
Dtr199	0,341	0,000*
Dtr323	0,017	0,073
GLOBAL	0,051	0,000*

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

Los valores *Fst* por pares de localidades y sus correspondientes P-valores se reflejan en la Tabla 6. Los 6 tests realizados por pares de localidades resultaron significativos tras la corrección secuencial de Bonferroni. Los valores oscilaron entre 0,011 y 0,104.

Tabla 6. Valores del índice de fijación *Fst* por pares de localidades (sobre la diagonal) y P-valores correspondientes (bajo la diagonal).

	Vilarrube	Fuengirola	Maresme	Sidi Salem
Vilarrube		0,099**	0,011**	0,011**
Fuengirola	0,000		0,104**	0,080**
Maresme	0,020	0,000		0,013**
Sidi Salem	0,032	0,000	0,013	

(**) significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni

La significación más elevada resultó entre Fuengirola y Maresme. Con respecto a la localidad de Sidi Salem la significación resultó más elevada frente a Fuengirola.

DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó la diversidad genética y la diferenciación poblacional de un total de 185 individuos de la coquina *D. trunculus* en tres localidades de la Península Ibérica y una de Argelia. Los 7 *loci* microsatélite analizados resultaron polimórficos en las cuatro localidades estudiadas, con un número de alelos que varió entre 3 (Dtr323) y 25 (Dtr53). Se detectaron 28 alelos privados, de los cuales 12 corresponden al Maresme y 9 a la localidad de Sidi Salem. El rango de heterocigosidad esperada (0,190-0,928) obtenido para *D. trunculus* en este trabajo fue mayor que las estimas aportadas en un estudio de la misma especie en la Península Ibérica ($He = 0,658-0,937$) (Rico *et al.*, 2017). Sin embargo, el rango de heterocigosidad observada (0,156-0,821) fue similar a las estimas aportadas en el citado trabajo ($Ho = 0,203-0,923$) (Rico *et al.*, 2017). Estos resultados son similares a los observados en otras especies de moluscos bivalvos como la pinna *Atrina pectinata* (Ning *et al.*, 2015), el mejillón *Mytilus galloprovincialis* (Li *et al.*, 2011), la almeja *Ruditapes decussatus* (Arias-Pérez *et al.*, 2016) o la almeja roja *Tegillarca granosa* (Wang *et al.*, 2013).

En cuanto a la riqueza alélica destacan los valores del *locus* Dtr53 que son altos en todas las localidades y bastante más altos que en los demás *loci*. Las estimas de riqueza alélica observadas en este trabajo fueron similares a las observadas en la almeja *Venerupis pullastra* en un estudio con microsatélite en localidades de la costa Atlántica de la Península Ibérica (Pereira, 2013).

Los tests de desequilibrio de ligamiento realizados para los pares de *loci* no resultaron significativos, lo que indica que los *loci* segregan de forma independiente. Once combinaciones *locus*-localidad mostraron desviaciones del equilibrio HW después de la corrección secuencial de Bonferroni. Ocho de ellas se concentraron en los *loci* Dtr126 y Dtr174 en todas las localidades. Todas las combinaciones que mostraron desequilibrio presentaron valores de *Fis* positivos, lo que indica existencia de déficit de heterocigotos. Este déficit es común en moluscos bivalvos, y ha sido detectado anteriormente en especies como ostras (Launey *et al.*, 2002), mejillones (Astanei *et al.*, 2005), longueirón (Arias-Pérez *et al.*, 2012) o berberecho (Martínez *et al.*, 2015), y en el caso de la coquina ha sido observado por Nantón *et al.* (2014) y Marie *et al.* (2016).

Existen varios factores que pueden explicar el déficit de heterocigotos mencionado, entre ellos, el efecto Walhund, la endogamia y la existencia de alelos nulos. El efecto Walhund consiste en una reducción de la heterocigosidad como consecuencia de la subdivisión poblacional, temporal o espacial. Se observa cuando una muestra comprende una mezcla de individuos de dos o más poblaciones que difieren en las frecuencias de los alelos de un *locus*, lo que provoca desviaciones del equilibrio HW (Astanei *et al.*, 2005). En este trabajo todos los *loci* analizados presentaron déficit de heterocigotos y los valores *Fst* por pares mostraron diferenciación genética significativa para todas las localidades, por lo que el efecto Walhund parece no ser una causa relevante del déficit de heterocigotos observado.

Otro factor que puede contribuir al déficit de heterocigotos es la endogamia. Dada la gran dispersión larvaria que presentan los bivalvos, se podría pensar que este factor no es el principal causante del déficit de heterocigotos observado. Pero si se observan los

datos de este estudio se puede ver que todos los valores F_{is} son positivos y algunos bastante altos (en MA en un *locus* es 1). No obstante, la endogamia debería afectar a todos los *loci* por igual, generando una deficiencia de heterocigotos uniforme entre *loci* (Astaneï *et al.*, 2005), sin embargo, los datos obtenidos en este trabajo muestran que los déficit (valores de F_{is}) se distribuyen heterogéneamente entre los *loci*. Así que, la endogamia parece no haber sido el factor principal que provocase el déficit de heterocigotos.

La presencia de alelos nulos es otra posible causa del déficit de heterocigotos observado. Es muy común y elevada en *D. trunculus* y en general en muchas especies de bivalvos analizados con marcadores basados en el ADN como los microsatélites (Gardeström *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2014). El rango de frecuencias de alelos nulos en este trabajo osciló entre 0,087 (MA-Dtr53) y 0,460 (MA-Dtr174). En Sidi Salem las frecuencias de alelos nulos de los *loci* Dtr126 y Dtr174 son de las más altas (0,308 y 0,384, respectivamente). Puesto que las frecuencias observadas de alelos nulos coinciden con los *loci* que presentan déficit de heterocigotos, parece que estos alelos podrían ser la principal causa del déficit de heterocigotos observado. Dado que la presencia de alelos nulos en elevada frecuencia, mayor a 0,2, puede conducir a una sobreestimación tanto de los valores F_{st} como de las distancias genéticas (Chapuis & Estoup, 2007), se recomienda realizar los análisis de diferenciación sin los *loci* con estas características.

Con respecto a la diferenciación poblacional, los análisis realizados en este estudio mostraron un F_{st} global de 0,051, (significativamente distinto de cero). Los valores F_{st} por locus variaron entre -0,006 y 0,341, cinco de los siete valores resultaron significativos para $\alpha=0,05$. Los valores F_{st} por pares resultaron significativos tras la corrección secuencial de Bonferroni.

La situación geográfica de las cuatro localidades estudiadas en este trabajo es muy diferente, Vilarrube está situada en el Atlántico Norte y las demás en el Mediterráneo con barreras geográficas entre ellas (estrecho de Gibraltar, frente Almería-Orán y el Canal de Ibiza). La existencia de estos frentes oceanográficos podría contribuir a la diferenciación genética entre localidades situadas a ambos lados de las barreras, lo cual ya ha sido observado en diferentes moluscos bivalvos como mejillones (Sanjuan *et al.*, 1994; Diz & Presa, 2008), ostras (Saavedra *et al.*, 1993) o vieiras (Ríos *et al.*, 2002).

La diferenciación genética entre regiones del Atlántico y Mediterráneo ha sido observada previamente en otros moluscos bivalvos como el mejillón (Diz & Presa, 2008) o la vieira (Ríos *et al.*, 2002). En estas especies no se encontró diferenciación entre las localidades del Atlántico y Fuengirola, mientras que en la zamburiña *Mimachlamys varia* (Fernández-Moreno *et al.*, 2008) o la volandeira *Aequipecten opercularis* (Arias *et al.*, 2010) se observó diferenciación entre localidades del Atlántico y Fuengirola, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

El análisis de los valores de F_{st} por pares de localidades mostraron que Fuengirola y Maresme son las localidades que presentan mayor distancia genética (0,104), mientras que las de menor distancia son Vilarrube y Sidi Salem y Vilarrube y Maresme (0,011).

La localidad Sidi Salem presenta mayor diferenciación genética con Fuengirola, esto puede deberse a la presencia del frente Almería-Orán. La diferenciación entre Vilarrube y Maresme es bastante pequeña y muy similar, lo que resulta extraño ya que están bastante alejadas geográficamente y hay barreras geográficas entre ellas. Probablemente, estos resultados no son concluyentes debido al escaso número de *loci* analizados. Fuengirola es la localidad que mayor distancia genética presenta con todas las demás y esto se podría deber a la influencia del mar de Alborán conjuntamente con el estrecho de Gibraltar y el frente Almería-Orán, además de la presencia del canal de Ibiza.

Entre algunas localidades hay barreras geográficas, climáticas y existen corrientes marinas que podrían influir en la dispersión de las larvas ya que son planctónicas y son pasivamente desplazadas por corrientes de agua (Seed, 1969). Sin embargo, si se encuentran con algún tipo de barrera es muy difícil que puedan traspasarla y, frecuentemente, por ello existen diferencias en las distancias genéticas (Durán *et al.*, 2004).

El estrecho de Gibraltar es una zona que conecta el océano Atlántico y el mar Mediterráneo y representa uno de los límites biogeográficos más estudiados del ambiente marino, debido tanto a las propiedades físicas del pasado como a su situación actual. Durante los últimos millones de años se ha visto afectado por diferentes procesos geológicos y climáticos que han influido en la presencia y distribución de la fauna (Duggen *et al.*, 2003; Duggen *et al.*, 2004; Krijgsman *et al.*, 1999). Actualmente se mantiene esta barrera en el estrecho de Gibraltar, entre el Atlántico y el Mediterráneo debido a que su composición y sus propiedades físicas (por ejemplo, su densidad) son distintas, lo que permite el intercambio de aguas (Bryden *et al.*, 1994). La existencia de esta barrera biogeográfica podría contribuir a la diferenciación genética observada en este trabajo entre Vilarrube y el resto de localidades estudiadas.

Además en la región estudiada destaca la existencia del frente oceanográfico Almería-Orán. Los estudios realizados por Tintore *et al.* (1988) muestran que esta barrera está formada por dos masas de agua de distintas características físicas y composición, como densidad, temperatura o salinidad, y está controlado por la posición geográfica y por la fuerza del Giro del Alborán oriental. Este frente constituye una barrera para la dispersión de organismos marinos. Algunos estudios en moluscos bivalvos, como el mejillón, han sugerido que el frente Almería-Orán contribuye a la existencia de diferenciación genética entre las localidades situadas a los dos lados del frente (Diz & Presa, 2008), como podría ser el caso de FU y MA, y FU y SS. Además, el Canal de Ibiza y el Frente Balear también podrían contribuir a la diferenciación observada entre estas localidades.

El canal de Ibiza genera un efecto disruptivo en la circulación y el encierro del Mediterráneo en la cuenca noroeste (Pinot *et al.*, 2002). El estudio de Schunter *et al.* (2011) en crustáceos mostró dos grupos genéticamente distintos, con una clara división entre las discontinuidades oceanográficas del Canal de Ibiza y el frente Almería-Orán.

Sin embargo, también se observó conectividad con localidades próximas. Este fenómeno es un efecto estacional, lo que podría explicar que algunas especies estén o no genéticamente divididas por el canal de Ibiza dependiendo de los tiempos de reproducción. El canal de Ibiza ha sido raramente considerado en los análisis de poblaciones, aunque ha sido objeto de estudios oceanográficos desde hace muchos años, como el de Fernández *et al.* (2005) y parece que junto con el frente Balear podría actuar como una barrera significativa para el flujo de genes (García-Merchán *et al.*, 2012).

Por tanto el patrón de diferenciación genética observado en las poblaciones estudiadas podrá estar influenciado por todas las barreras oceanográficas mencionadas.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden sacar tras la realización de este trabajo son estas:

1. Todos los individuos analizados fueron identificados como *D. trunculus* mediante la amplificación del marcador nuclear 5S ADNr.
2. El análisis de la diversidad genética de las cuatro localidades mostró que los siete *loci* analizados resultaron polimórficos. El número de alelos osciló entre 3 y 25, ambos en la localidad de Maresme. Se identificaron 28 alelos privados (3 en Vilarrube, 4 en Fuengirola, 12 en Maresme y 9 en Sidi Salem).
3. Los análisis de diferenciación poblacional por pares de localidades mostraron valores significativos tras la corrección secuencial de Bonferroni, lo que sugiere la existencia de diferenciación genética entre las cuatro localidades estudiadas.

CONCLUSIÓNS

As conclusións que se poden sacar trala realización deste traballo son estas:

1. Todos os individuos analizados foron identificados como *D. trunculus* mediante a amplificación do marcador nuclear 5S ADNr.
2. A análise da diversidade xenética das catro localidades amosa que os sete *loci* analizados resultaron polimórficos. O número de alelos oscilou entre 3 e 25, ambos na localidade de Maresme. Identificáronse 28 alelos privados (3 en Vilarrube, 4 en Fuengirola, 12 en Maresme e 9 en Sidi Salem).

3. As análises de diferenciación poblacional por pares de localidades mostraron valores significativos trala corrección secuencial de Bonferroni, o que suxire a existencia de diferenciación xenética nas catro localidades estudadas.

CONCLUSIONS

The conclusions that can be drawn after the completion of this research are these:

1. All the individuals analyzed were identified as *D. trunculus* by amplification of the 5S rDNA nuclear marker.
2. Analysis of the genetic diversity of the four localities showed that the seven *loci* analyzed were polymorphic. The number of alleles ranged from 3 to 25, both of them from the locality of Maresme. 28 private alleles were identified (3 in Vilarrube, 4 in Fuengirola, 12 in Maresme and 9 in Sidi Salem).
3. The analysis of population differentiation by pairs of localities showed significant values after the Bonferroni's secuencial correction, this suggests the existence of genetic differentiation at the four studied localities.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul-Muneer P.M. (2014). Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics Research International*. 2014: 1-11.
- Allendorf F.W., England P.R., Luikart G., Ritchie P.A. & Ryman N. (2008). Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology & Evolution*. 23: 327-337.
- Ansell A.D. (1983). The biology of the genus *Donax*. En: McLachlan A y Erasmus T (eds) *Sandy beaches as ecosystems*. Junk, The Hague, pp. 607-636.
- Arias A., Freire R., Méndez J. & Insua A. (2010). Isolation and characterization of microsatellite markers in the queen scallop *Aequipecten opercularis* and their application to a population genetic study. *Aquatic Living Resources*. 23: 199-207.
- Arias-Pérez A., Fernández-Tajes J., Gaspar M.B. & Méndez J. (2012). Isolation of microsatellite markers and analysis of genetic diversity among east Atlantic populations of the sword razor shell *Ensis siliqua*: A tool for population management. *Biochemical Genetics*. 50: 397-415.
- Arias-Pérez A., Cordero D., Borrell Y., Sánchez J.A., Blanco G., Freire R., Insua A. & Saavedra C. (2016). Assessing the geographic scale of genetic population management with microsatellites and introns in the clam *Ruditapes decussatus*. *Ecology and Evolution*. 6(10): 3380-3404.
- Astanei 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.
- 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*.
- Brookfield J.F.Y. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*. 5: 453-455.
- Bryden H.L., Candela J. & Kinder T.H. (1994). Exchange through the strait of Gibraltar. *Progress in Oceanography*. 33: 201-248.
- Carneiro Vieira M.L., Santini L., Lima Diniz A. & de Freitas Munhoz C. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and molecular biology*. 39(3): 312-328.

- Chapuis M.P. & Estoup A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 621-631.
- 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 of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 82: 41-50.
- Chistiakov D.A., Hellemans B. & Volckaert F.A.M. (2006). Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. 255: 1-29.
- Diz A.P. & Presa P. (2008). Regional patterns of microsatellite variation in *Mytilus galloprovincialis* from the Iberian Peninsula. *Marine Biology*. 154: 277-286.
- Duggen S., Hoernle K., Van den Bogaard P. & Harris C. (2004). Magmatic evolution of the Alboran region: the role of subduction in forming the western Mediterranean and causing the Messinian Salinity Crisis. *Earth and Planetary Science Letters*. 218: 91-108.
- Duggen S., Hoernle K., Van den Bogaard P., Rupke L. & Morgan J.P. (2003). Deep roots of the Messinian salinity crisis. *Nature*. 422: 602-606.
- Duran S., Palacin C., Becerro M.A., Turon X. & Giribet G. (2004). Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Molecular Ecology*. 13: 3317-3328.
- Fernández V., Dietrich D.E., Haney R.L. & Tintore J. (2005). Mesoscale, seasonal and interannual variability in the Mediterranean Sea using a numerical ocean model. *Progress in Oceanography*. 66: 321-340.
- Fernández-Moreno M., Arias-Pérez A., Freire R. & Méndez J. (2008). Genetic analysis of *Aequipecten opercularis* and *Mimachlamys varia* (Bivalvia: Pectinidae) in several Atlantic and Mediterranean localities, revealed by mitochondrial PCR-RFLPs: a preliminary study. *Aquaculture Research*. 39: 474-481.
- Fernández-Tajes J., Méndez J. (2007). Identification of the razor clam species *Ensis arcuatus*, *E. siliqua*, *E. directus*, *E. macha*, and *Solen marginatus* using PCR-RFLP analysis of the 5S rDNA region. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7278-7282.
- García-Merchán V.H., Robainas-Barcia A., Abelló P., Macpherson E., Palero F., García-Rodríguez M., Gil de Sola L. & Pascual M. (2012). Phylogeographic patterns of decapod crustaceans at the Atlantic–Mediterranean transition. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 62: 664-672.

Gardeström J., Pereyra R.T. & André C. (2008). Characterization of six microsatellite loci in the Baltic blue mussel *Mytilus trossulus* and cross-species amplification in North Sea *Mytilus edulis*. *Conservation Genetics*. 9: 1003-1005.

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

González E.G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*. 59(2-3): 377-388.

Gosling E. (2003). Bivalve molluscs: biology, ecology and culture. *Fishing News Books*, Oxford, pp. 1-443.

Goudet J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. *Institut d'Ecologie, Université de Lausanne, Dorigny, Switzerland*.

Hasfsaoui I., Draredja B., Lasota R., Como S. & Magni P. (2016). Population dynamics and secondary production of *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) in the Gulf of Annaba (Northeast Algeria). *Mediterranean Marine Science*. 17(3): 738-750.

Hoarau G., Boon E., Jongma D.N., Ferber S., Palsson J., Van der Veer H.W., Rijnsdorp A.D., Stam W.T. & Olsen J.L. (2005). *Proceedings of the Royal Society B*. 272: 497-503.

Krijgsman W., Langereis C.G., Zachariasse W.J., Boccaletti M., Moratti G., Gelati R., Iaccarino S., Papani G. & Villa G. (1999). Late Neogene evolution of the Taza-Guercif Basin (Rifian Corridor, Morocco) and implications for the Messinian salinity crisis. *Marine Geology*. 153: 147-160.

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. *The American Genetic Association*. 93: 331-338.

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.

Marie A.D., Lejeusne C., Karapatsiou E., Cuesta J.A., Drake P., Macpherson E., Bernatchez L. & Rico C. (2016). Implications for management and conservation of the population genetic structure of the wedge clam *Donax trunculus* across two biogeographic boundaries. *Nature-Scientific Reports*. 6: 39152.

Martínez L., Freire R., Arias-Pérez A., Méndez J. & Insua A. (2015). Patterns of genetic variation across the distribution range of the cockle *Cerastoderma edule* inferred from microsatellites and mitochondrial DNA. *Marine Biology*. 162: 1393-1406.

Mazé R.A. & Laborda A.J. (1988). Aspectos de la dinámica de población de *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae) en la ría de El Barquero (Lugo, NW España). *Investigación Pesquera Barcelona*. 52 (3): 299-312.

Molares J., Parada J.M., 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.

Nantón 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., Arias-Pérez A., Méndez J. & Freire R. (2014). Characterization of nineteen microsatellite markers and development of multiplex PCRs for the wedge clam *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia). *Molecular Biology Reports*. 41: 5351-5357.

Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.

Ning Y.F., Li Z.B., Shangguan J.B., Huang Y.S., Jiang P.D., Xu A.L. & Yuan Y. (2015). Development and characterization of microsatellite markers for molecular genetic diversity in *Atrina pectinata*. *Genetics and Molecular Research*. 14 (3): 8290-8293.

Oliveira E.J., Padua J.G., Zucchi M.I., Vencovsky R. & Vieira M.L.C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 29: 294-307.

Pereira S.M. (2013). Estudio genético poblacional en la almeja babosa *Venerupis pullastra*. Tesis doctoral, Universidade da Coruña.

Pereira A.M., Fernández-Tajes J., Gaspar M.B. & Méndez J. (2012). Identification of the wedge clam *Donax trunculus* by a simple PCR technique. *Food control*. 23: 268-270.

- Pinot J.M., López-Jurado J.L. & Riera M. (2002). The Canales experiment (1996–1998). Interannual, seasonal and mesoscale variability of the circulation in the Balearic Channels. *Progress in Oceanography*. 55: 335-370.
- Qiu Y., Lu H., Zhu J., Chen X., Wang A. & Wang Y. (2014). Characterization of novel EST-SSR markers and their correlations with growth and nacreous secretion traits in the pearl oyster *Pinctada martensii* (Dunker). *Aquaculture*. 420: S92-S97.
- Ramón M., Cano J., Peña J.B. & Campos M.J. (2005). Current status and perspectives of mollusc (bivalves and gastropods) culture in the Spanish Mediterranean. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*. 21: 361-373.
- Rice W.R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43: 223-225.
- Rico C., Cuesta J.A., Drake P., Macpherson E., Bernatchez L. & Marie A.D. (2017). Null alleles are ubiquitous at microsatellite loci in the Wedge Clam (*Donax trunculus*). *PeerJ*. 5: E3188
- Ríos C., Sanz S., Saavedra C. & Pena J.B. (2002). Allozyme variation in populations of scallops, *Pecten jacobaeus* (L.) and *P. maximus* (L.) (Bivalvia: Pectinidae), across the Almeria-Oran front. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 267: 223-244.
- Rousset F. (2008). GENEPOP v.4.6: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 8: 103-106.
- Saavedra C., Zapata C., Guerra A. & Alvarez G. (1993). Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*. 115: 85-95.
- Sanjuan A., Zapata C. & Álvarez G. (1994). *Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis* on the coasts of the Iberian Peninsula. *Marine Ecology Progress Series*. 113: 131-146.
- Schunter C., Carreras-Carbonell J., Macpherson E., Tintore J., Vidal-Vijande E., Pascual A., Guidetti P. & Pascual M. (2011). Matching genetics with oceanography: directional gene flow in a Mediterranean fish species. *Molecular Ecology*. 20: 5167-5181.
- Seed R. (1969). The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lamellibranchiata) on exposed rocky shores: I. Breeding and settlement. *Oecology*. Sep; 3(3-4): 277-316.

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. In: *Rapport Ifremer. R.INT.DCB/DEM – DCB/STH/UDPP 05-010. Brest, France*. 88.

Tintore J., Laviolette P.E., Blade I. & Cruzado A. (1988). A study of an intense density front in the eastern Alboran Sea: The Almeria-Oran front. *Journal of Physical Oceanography*. 18: 1384-1397.

Urrea J., García T., Helena Gallardo-Roldán H., Estefanía León E., Lozano M., Baro J. & Rueda J.L. (2017). Discard analysis and damage assessment in the wedge clam mechanized dredging fisheries of the northern Alboran Sea (WMediterranean Sea). *Fisheries Research*. 187: 58-67.

Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M. & Shipley P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4: 535-538.

Walsh P.S., Metzger D.A. & Higuchi R. (1991). Chelex-100 as medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 10: 506-513.

Wang Y.J., Zeng Q.G. & Xu L.N. (2013). Population structure of the blood clam (*Tegillarca granosa*) in China based on microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*. 12 (2): 892-900.

Ward R.D. (2006). The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fisheries Research*. 80: 9-18.

Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38: 1358-1370.

Zeichen M.M., Agnesi S., Mariani A., Maccaroni A. & Ardizzone G.D. (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.

REFERENCIAS WEB

Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta De Galicia. (s.f.). *Plataforma tecnolóxica da pesca*. Recuperado en Junio de 2017, de <http://www.pescadegalicia.gal> .