



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Análisis genético de *Donax trunculus* mediante marcadores mitocondriales

Análise xenética de *Donax trunculus* mediante marcadores mitocondriais

Genetic analysis of *Donax trunculus* using mitochondrial markers

Andrés Marta Castiñeiras

Septiembre, 2018

*Josefina Méndez Felpeto
Ana Nantón Varela*



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Dña. JOSEFINA MÉNDEZ FELPETO, Doctora en Biología y Catedrática de Universidad, y la Doctora en Biología Dña. ANA NANTÓN VARELA, del área de Genética del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias

INFORMAN:

Que el presente Trabajo Fin de Grado titulado “Análisis genético de *Donax trunculus* mediante marcadores mitocondriales” que presenta el alumno Andrés Marta Castiñeiras, ha sido elaborado bajo nuestra supervisión y, considerándolo finalizado, damos nuestro visto bueno para su presentación y defensa ante el tribunal calificador.

A Coruña, 11 de Septiembre de 2018

Fdo. Josefina Méndez Felpeto

Fdo. Ana Nantón Varela

RESUMEN

El género *Donax* está representado por *Donax trunculus*, *Donax vittatus*, *Donax variegatus* y *Donax semistriatus*. En la costa de Galicia *D. trunculus* representa un importante recurso pesquero, que actualmente está experimentando un proceso de regresión poblacional. Con el objetivo de contribuir a la conservación y gestión de este recurso se llevó a cabo la identificación de 33 individuos procedentes de Sidi Salem (Argelia) como *D. trunculus* mediante el marcador molecular ADNr 5S. Posteriormente se realizó el análisis de las muestras a partir del gen mitocondrial COI para su comparación con otras localidades de la Península Ibérica (Vilarrube, Fuengirola y Maresme). En Sidi Salem los valores de diversidad observados fueron similares a los de las demás localidades y los resultados de la diferenciación poblacional mostraron la existencia de estructura genética en la región analizada.

Palabras clave: *Donax trunculus*, marcadores moleculares, genética de poblaciones

RESUMO

O xénero *Donax* está representado por *Donax trunculus*, *Donax vittatus*, *Donax variegatus* e *Donax semistriatus*. Na costa de Galicia *D. trunculus* representa un importante recurso pesqueiro, que actualmente está experimentando un proceso de regresión poblacional. Co obxectivo de contribuir na conservación e xestión deste recurso levouse a cabo a identificación de 33 individuos procedentes de Sidi Salem (Argelia) como *D. trunculus* mediante o marcador molecular ADNr 5S. Posteriormente realizouse o análise das mostras a partir do xen mitocondrial COI para a súa comparación con outras localidades da Península Ibérica (Vilarrube, Fuengirola e Maresme). En Sidi Salem os valores de diversidade observados foron similares aos das demais localidades e os resultados da diferenciación poblacional mostraron a existencia de estrutura xenética na rexión analizada.

Palabras clave: *Donax trunculus*, marcadores moleculares, xenética de poboacións

ABSTRACT

The genus *Donax* is represented by *Donax trunculus*, *Donax vittatus*, *Donax variegatus* and *Donax semistriatus*. On Galicia's coast *D. trunculus* represents an important fishing resource which actually is experiencing a population regression process. With the objective of contribute to the conservation and management of this resource it has been accomplished the identification of 33 samples from Sidi Salem (Argelia) as *D. trunculus* through the molecular marker ADNr 5S. After that the analysis of samples was done using the mitochondrial gene COI for its comparison with other localitiess from the Iberian Peninsula (Vilarrube, Fuengirola and Maresme). The diversity values observed in Sidi Salem were similar to those obtained in other localities and the results of population differentiation showed the existence of genetic structure in the analysed region.

Key words: *Donax trunculus*, molecular markers, population genetic

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1 Material de estudio	8
3.2 Extracción de ADN genómico	8
3.3 Identificación de las muestras	8
3.4 Amplificación del gen COI	9
3.5 Diversidad genética y diferenciación poblacional.....	9
4. RESULTADOS.....	11
5. DISCUSIÓN	13
6. CONCLUSIONES.....	15
7. BIBLIOGRAFÍA.....	16
ANEXOS	21

1. INTRODUCCIÓN

Los moluscos bivalvos del género *Donax* son un componente importante de la macrofauna de playas arenosas en zonas templadas, tropicales y subtropicales, convirtiéndolas en los organismos dominantes de este tipo de ambientes (Ansell, 1983). El conocimiento de los bancos naturales de moluscos bivalvos sometidos a explotación está experimentando un gran avance.

El interés del estudio de las especies de *Donax* 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 variar desde unos pocos individuos en un año hasta miles en el siguiente. 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 factores pueden ser: salinidad, temperatura, granulometría del sedimento o contenido en materia orgánica, 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, siendo 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 apenas hay grandes mareas (Mazé & Laborda, 1988). En el Atlántico habita en la zona intermareal, en playas de arena fina expuestas al oleaje. Dado que es un gran excavador, vive enterrado en estos bancos arenosos, a una profundidad que 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, que coincide con el contenido en materia orgánica (Gaspar *et al.*, 1999).

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



Figura 1. Coquina *D. trunculus*.

Su alimentación consiste en el filtrado de material orgánico, que resuspende gracias a sus largos sifones, por lo que puede ser utilizado como bioindicador para medir el estado de las aguas en las que se encuentra (Hafsaoui *et al.*, 2016). Su fecundación es externa y el

desove tiene lugar entre los meses de marzo y agosto (Gaspar *et al.*, 1999), alcanza la madurez durante el primer año, siendo su esperanza de vida entre 3 y 5 años.

La coquina *D. trunculus* es explotada con fines comerciales en varios países como España (Ramón *et al.*, 2005; Molares *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 fundamentalmente al banco de Vilarrube - Cedeira.

Atendiendo a las estadísticas de la Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia (<http://www.pescadegalicia.gal>), en los ocho primeros meses del año 2018 la coquina ha sido el bivalvo que alcanzó el mayor precio medio (41,42 €/kg). Sin embargo, la cantidad (473,44 kg) que se vendió en las lonjas de la comunidad resultó de las más bajas (Tabla 1).

Tabla 1. Nivel de capturas (kg) y valor económico (€) de moluscos bivalvos descargados en las lonjas gallegas durante los primeros ocho meses del 2018. Datos recogidos del Servicio de Estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia (<https://www.pescadegalicia.gal>).

Especie	kg	Importe €	Media €/kg
Almeja babosa	505379,89	7212417,79	14,27
Almeja bicuda	5725,79	26122,45	4,56
Almeja fina	203300,46	5888462,69	28,96
Almeja rubia	324454,1	2756314,12	8,5
Almeja japonesa	2149964,45	20340125,65	8,46
Ameixón	34653,97	188809,56	5,45
Berberecho	734259,72	4464956,36	6,08
Birollo	4912	16690,2	3,4
Coquina	473,44	24907,65	41,42
Carneiro	59625,79	288764,21	4,84
Cornicha	4471,4	24907,65	5,57
Longueirón	41690,75	323879,68	7,77
Longueirón viejo	33268,04	184900,7	5,56
Navaja	382662,7	3716354,54	9,71
Ostra plana	31466,68	164234,67	5,22
Ostra rizada	119874,01	114046,39	0,95
Reló	187699,7	403345,83	2,15
Vieira	71676	381985,86	5,33
Volandeira	38585,15	177089,07	4,59
Zamburiña	15297,95	106795,07	6,98

La producción de coquina entre los años 2007-2018 se muestra en la Figura 2. Se alcanzó el valor más alto de recogida en 2008 con 16003,96 kg, cantidad que descendió ligeramente hasta 2012 (13119,15 kg). Sin embargo, en la transición 2012-2013 se produjo un gran descenso (8385,1 en 2013) que se continuó en el tiempo hasta la actualidad (473 kg en 2018). Este descenso en la cantidad recogida concuerda con el aumento del precio de la coquina, pasando de 25,21 €/kg en 2013 a 41,42 €/kg en 2018.

Análisis genético de *Donax trunculus* mediante marcadores mitocondriales

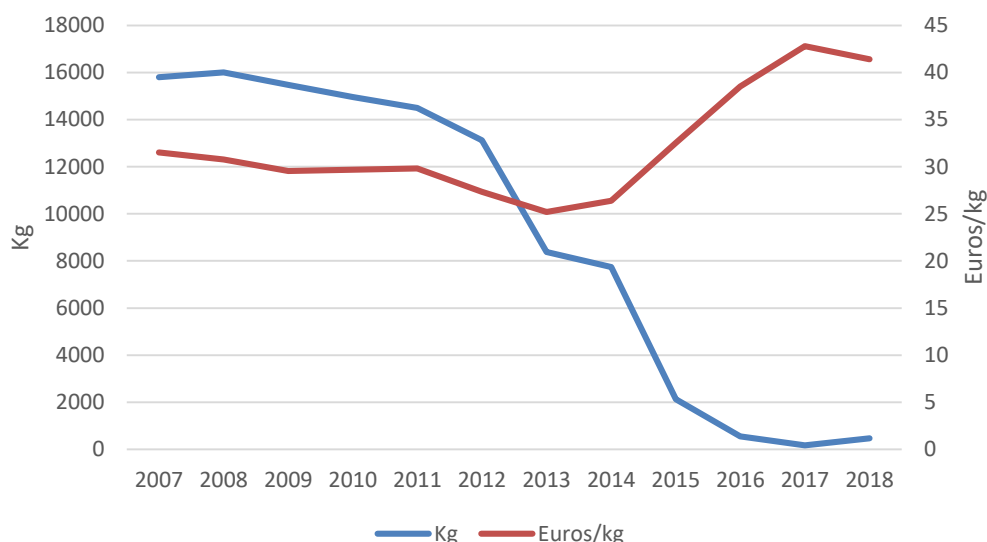


Figura 2. Progresión de la producción (kg) y el precio (€/kg) de coquina durante los años 2007-2018. Datos recogidos del Servicio de Estadística de la Consellería do Mar. Xunta de Galicia (<https://www.pescadegalicia.gal>).

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 o la realización de construcciones próximas (como paseos marítimos) que alteran el funcionamiento ecológico del banco o el tipo de sustrato de éste. 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 estudios genéticos que permitan caracterizar y evaluar la variación genética de este recurso, con el objetivo de obtener datos que ayuden a evitar la pérdida de variabilidad genética y mejorar su gestión sostenible (Allendorf *et al.*, 2008).

Para una conservación y gestión adecuada de los bancos naturales es necesario conocer las características genéticas de los individuos que componen las diferentes localidades. En relación a *D. trunculus*, se han desarrollado estudios genético-poblacionales que aportan datos sobre la composición genética de la especie en Galicia (Nantón *et al.*, 2017; Fernández-Pérez *et al.*, 2018).

La diversidad genética permite a las poblaciones adaptarse a cambios o presiones medioambientales, siendo imprescindible para la supervivencia de la especie. Un componente importante de la variabilidad genética de una especie se debe 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, las prácticas de repoblación y de la acuicultura en los recursos naturales (Morvezen *et al.*, 2016).

La ausencia o existencia de estructura poblacional conlleva diferentes planes de acción para la gestión del recurso. En ausencia de división poblacional no cabría esperar impacto genético debido a repoblaciones con individuos del medio natural, aunque no ocurre lo mismo en caso de haber división poblacional (Johnson, 2000). En ese caso, la población no se comporta como una única unidad lo que conlleva importantes consecuencias en su

explotación y recuperación, por lo que los individuos empleados para la repoblación y/o gestión sostenible del recurso deben pertenecer a la misma población genética.

Para realizar estudios genéticos suele recurrirse 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 el genoma.

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 (polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados 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 especies, visualizando simplemente la longitud del fragmento en una electroforesis en gel de agarosa sin necesidad de análisis posteriores.

EL ADN mitocondrial (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 y 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 (Avise, 2004) que por norma general son neutras o deletéreas, con muy pocas mutaciones de carácter adaptativo. Normalmente 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 herencia doblemente 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, 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 secuenciación directa de productos obtenidos por PCR. El ADNmt es utilizado en muchos estudios de identificación de especies, en genética de poblaciones o filogeografía (Avise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987; Galtier *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

- 1.- Identificar si los ejemplares muestreados en la localidad de Sidi Salem de Argelia corresponden a la especie *D. trunculus*.
- 2.- Analizar la diversidad genética y la diferenciación poblacional entre individuos de esta localidad frente a los individuos pertenecientes a las localidades de Vilarrube, Fuengirola y Maresme, empleando el marcador mitocondrial COI, con el fin de aportar conocimientos para una gestión pesquera adecuada y conservación de la especie.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Material de estudio

En este trabajo se han analizado un total de 33 individuos procedentes de Sidi Salem, localidad situada en el Golfo de Annaba, en la costa de Argelia (África). Además, para los análisis de diversidad genética y diferenciación poblacional se emplearon secuencias de individuos procedentes de tres localidades de la Península Ibérica: Vilarrube (VI), Fuengirola (FU) y Maresme (MA), ya disponibles en el laboratorio (Figura.3).

Los individuos de Sidi Salem se individualizaron mediante la retirada de sus valvas y posterior conservación en etanol al 96%.

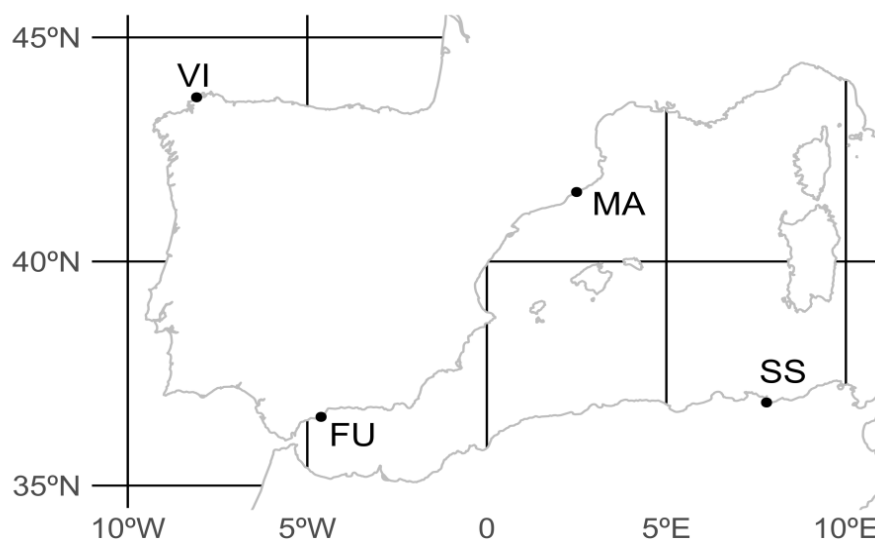


Figura 3. Localización de las localidades utilizadas. VI (Vilarrube), FU (Fuengirola), MA (Maresme) y SS (Sidi Salem).

3.2 Extracción de ADN genómico

Debido a que las muestras estaban conservadas en etanol al 96%, se mantuvieron en agua destilada durante 20 min para rehidratarlas y eliminar restos de etanol. La extracción de ADN genómico total se realizó a partir de tejido muscular siguiendo el método descrito por Walsh *et al.* (1991) empleando Chelex 100™ (Sigma-Aldrich). Se retiró aproximadamente un 1 mm³ de tejido somático (músculo del pie) de cada individuo y se introdujo en 100 µl de Chelex 100™ al 10% (g/ml) en agua milliQ estéril. Se incubaron a 100 °C durante 20 min. Tras la incubación los tubos se centrifugaron 1 min a 13000 g, siendo el sobrenadante la fase recogida. Para la cuantificación del ADN se empleó un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Technologies, Inc.).

3.3 Identificación de las muestras

La especie *D. trunculus* puede compartir nicho ecológico con otras del género *Donax* (*D.semistriatus*, *D.variegatus* y *D.vittatus*), por lo que fue preciso identificar los individuos

pertenecientes a la localidad de Sidi Salem. Para ello se procedió a la utilización del método basado en la amplificación del marcador nuclear ADN_r 5S desarrollado por el grupo Xenomar (Pereira *et al.*, 2012).

La 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 miliQ estéril. Los cebadores empleados fueron descritos por Fernández-Tajes y Méndez (2007) (5SF: -5' CGTCCGATCACCGAAGTTAA-3' y 5SR:-5' ACCGGTGTTCACGTCAT-3'). La reacción de amplificación se llevó 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 resultantes se determinó por comparación con el marcador molecular XIV de Roche™ de peso conocido (100-1500 pares de bases) en una electroforesis en gel de agarosa al 2%. El proceso de migración se observó mediante los colorantes azul de bromofenol y xileno cianol incluidos en el tampón de carga. La electroforesis se realizó con un voltaje situado entre 80 y 90 V, dejándose migrar hasta que el azul de bromofenol alcanzó los 2/3 del gel. Para finalizar se tiñó el gel por inmersión con bromuro de etidio (0,5 µg/ml en 1x TAE) durante 30 min y se visualizó en un transiluminador Gel Doc XR (Bio-Rad).

3.4 Amplificación del gen COI en los individuos de Sidi Salem

La amplificación del gen COI de las 33 muestras procedentes de Sidi Salem se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl con ~100 ng de ADN, 0,75 U de *Taq* ADN polimerasa, tampón de la polimerasa 1x, 0,25 mM de cada dNTP, 0,6 µM de cada cebador y 1,5 mM de MgCl₂. Los cebadores utilizados para la amplificación del COI fueron específicos, descritos por Nantón (2016) (COIDtr-F: 5'-CCTTGTGGGGCTGGTCTATA-3' y COIDtr-R: 5'- CAGCCACCAACAGGAAAGAC-3'). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad) que consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min; 34 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 56 °C y 45 s a 72 °C; seguidos de una extensión final a 72 °C durante 3 min. La longitud de los fragmentos, la observación del proceso de migración y la electroforesis en gel de agarosa se determinó de igual forma que en la identificación por ADN_r 5S.

3.5 Análisis de diversidad genética y diferenciación poblacional

Las secuencias obtenidas de todos los individuos se editaron con el programa BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999) eliminando los extremos con lectura poco fiable. Una vez editadas, las secuencias se sometieron a un análisis BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997) para verificar su identidad. A continuación, se alinearon con Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implementado en BioEdit.

La identificación de haplotipos se llevó a cabo con el programa DNAsp versión 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009). Este programa también se ha utilizado para estimar la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π). Se entiende por diversidad haplotípica (h) la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar en una localidad sean diferentes y se calcula a partir de la siguiente ecuación (Nei, 1987):

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

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

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. Se calcula a través de la ecuación (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 , π_{ij} es la proporción de nucleótidos diferentes entre los tipos i y j .

Las frecuencias haplotípicas se calcularon mediante el programa Arlequín versión 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010).

Para analizar los cambios demográficos dentro de las poblaciones se utilizó el test F_s de Fu (Fu, 1997) implementado en el DnaSP versión 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2009). 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 en relación al nivel de diversidad estimado.

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

Un valor negativo de F_s evidencia un exceso de haplotipos, esperable en un evento de expansión poblacional reciente o selección purificadora. Un valor positivo evidencia un déficit de haplotipos, lo cual se espera en una situación de cuello de botella reciente o un evento de sobredominancia. La significación del estadístico se obtuvo por simulación coalescente (10000 réplicas).

La estima de diferenciación poblacional se calcularon a través del Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) (Excoffier y Lischer, 2010) mediante el programa Arlequín, también utilizado para la estima de los valores de F_{st} por pares de localidades en base a las frecuencias haplotípicas. En los casos en que se realizaron test múltiples, los valores de significación se ajustaron mediante la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

4. RESULTADOS

Identificación de individuos de Sidi Salem

El protocolo desarrollado para la identificación de la especie (amplificación del marcador ADNr 5S) indicó que todos los individuos pertenecían a la especie *D. trunculus*.

Análisis de secuencias

Se llevó a cabo la secuenciación del producto de PCR del gen COI de *D. trunculus* obteniéndose una secuencia de 532 pares de bases. Después de eliminar la secuencia de los cebadores y las regiones de alineamiento dudoso, se obtuvo una secuencia de 422 pares de bases. Mediante el alineamiento se han identificado 61 haplotipos definidos por 58 sustituciones nucleotídicas o sitios variables (Anexo I).

En el Anexo II se muestran todos los haplotipos de las 4 localidades analizadas. El haplotipo 3 fue el más abundante (24,41%), estando representado en todas las localidades y sumando un total de 31 individuos. Las localidades con más haplotipos fueron Maresme con 17 y Fuengirola con 23. La localidad de Sidi Salem presenta un total de 16 haplotipos, seguida por Vilarrube con 14. Únicamente hubo un haplotipo en común entre las cuatro localidades (haplotipo 3). Vilarrube y Maresme presentan dos haplotipos en común (3 y 30), Maresme y Fuengirola tres (3, 19 y 29), y Vilarrube y Fuengirola también presentaron tres (3, 36 y 49). Los haplotipos restantes son privados o característicos de cada localidad, presentes en 1 (haplotipo único) o 2 individuos. Las localidades que presentaron un mayor número de haplotipos privados fueron Fuengirola (18) y Sidi Salem (14), y la que menos Vilarrube (9).

Análisis de diversidad genética

En la Tabla 2 se refleja el nivel de variación de cada localidad medido a través de la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π). El valor más elevado de diversidad haplotípica se encuentra en Fuengirola (0,949) y el más bajo en Vilarrube (0,886). En cuanto a la diversidad nucleotídica el valor más elevado se encontró en Sidi Salem (0,0082) y el más bajo en Vilarrube (0,0052).

Tabla 2. Estimaciones de diversidad genética en COI.

Localidad	COI			
	n	Nh	h	π
Vilarrube	27	14	0,886	0,0052
Fuengirola	30	23	0,949	0,0078
Maresme	30	17	0,908	0,0063
Sidi Salem	33	16	0,909	0,0082
Total	120	61	0,949	0,0075

n: número de individuos analizados; Nh: número de haplotipos encontrados; h : diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica

En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos para el estadístico F_s de F_u para el gen COI. En todos los casos los valores han sido significativos, indicando un posible evento de expansión poblacional.

Tabla 3. Test F_s de F_u para el gen COI

Localidad	F_s de F_u
Vilarrube	-8,292*
Fuengirola	-21,109*
Maresme	-10,868*-
Sidi Salem	-6,308*
Total	-81,154*

*Diferenciación significativa $P < 0.05$

Análisis de diferenciación poblacional

La estructura genética de las localidades fue analizada mediante el análisis AMOVA (Tabla 4). El mayor porcentaje de variación se encontró dentro de las localidades (90,47%). El valor del índice de fijación F_{st} obtenido a partir de los haplotipos del gen COI fue de 0,0952, un valor próximo a cero.

Tabla 4. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) para COI.

Fuente de la variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% variación
Entre localidades	3	18,355	0,155 V_a	9,53
Dentro de localidades	116	170,862	1,472 V_b	90,47
TOTAL	119	189,217	1,628	

Índice de fijación F_{st} : 0,0952

g.l.: grados de libertad.

En la Tabla 5 se muestra el índice F_{st} por pares de localidades y su significación tras la corrección secuencial de Bonferroni. En las seis comparaciones realizadas, cinco mostraron un valor de F_{st} significativamente diferente de cero. Tras la corrección secuencial de Bonferroni, todas las combinaciones resultaron significativas excepto la pareja Sidi Salem-Fuengirola.

Tabla 5. Valores F_{st} por pares de localidades en COI (diagonal superior) y su P-valor correspondiente (diagonal inferior).

	Vilarrube	Fuengirola	Maresme	Sidi Salem
Vilarrube		0,028**	0,256**	0,081**
Fuengirola	0,042		0,114**	0,015
Maresme	<0,001	<0,001		0,091**
Sidi Salem	<0,001	0,1904	0,002	

* Diferenciación significativa ($P < 0,05$). ** Significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni.

5. DISCUSIÓN

Las especies de *Donax* en la costa europea tienen una morfología muy parecida, siendo necesaria la identificación molecular de los individuos. Para ello, los individuos de la localidad del Norte de África se identificaron mediante la amplificación por PCR del marcador ADNr 5S. La amplificación por PCR del marcador ADNr 5S es un procedimiento sencillo y económico para la identificación de *D. trunculus* (Pereira et al., 2012). Los resultados mostraron que se trataba de la especie *D. trunculus* por lo que se procedió a su análisis genético y comparación con individuos *D. trunculus* de tres localidades de la Península Ibérica (Fuengirola, Maresme y Vilarrube).

Con el fin de evaluar la diversidad genética y la estructura poblacional de los individuos de Sidi Salem y del resto de las localidades se procedió a la amplificación del marcador mitocondrial COI. Los resultados de los análisis correspondientes mostraron un nivel de polimorfismo moderado en esta localidad, encontrándose un total de 16 haplotipos. El número de haplotipos presentes en la localidad de Sidi Salem (16) se sitúa entre los valores observados para este marcador en otras localidades previamente estudiadas para esta especie (9 – 23) (Nantón, 2016). En todas las localidades, la mayoría de los haplotipos fueron privados, encontrándose en frecuencias bajas (uno o dos individuos) excepto: Hap1 con 5 individuos, Hap7 con 4 individuos y Hap5 con 3 individuos. En la comparación de las cuatro localidades tenidas en cuenta en este trabajo, se observó un mayor número de haplotipos privados en la zona del Mediterráneo (Fuengirola: 18, Sidi Salem: 14 y Maresme: 13) frente a la localidad del Atlántico (Vilarrube: 9).

Las estimas de diversidad haplotípica de las localidades estudiadas se situaron en un rango de 0,866 (VI) a 0,949 (FU). La variación entre el límite superior e inferior del rango es menos acusada que en otras especies de bivalvos, como se observa en otros estudios de berberecho, que mostraron un rango mucho más amplio (0,205-0,911, Tarnowska et al., 2010; 0,140-0,931, Krakau et al., 2012). Sin embargo, un rango más estrecho ha sido observado previamente tanto en *D. trunculus* (0,741-0,949, Nantón, 2016) como en otras especies de almeja (0,810- 1,000, Mao et al., 2011). Atendiendo a la diversidad nucleotídica, ésta varió entre 0,0052 (VI) y 0,0082 (SS), del orden de los observados previamente en esta especie (0,0040-0,0079) (Nantón, 2016). Al comparar con los bivalvos previamente mencionados, se observó que en berberechos los valores máximos fueron muy superiores (0,062-0,973, Tarnowska et al., 2010; 0,048-0,646, Krakau et al., 2012), mientras que esto no coincide con los obtenidos en la almeja *Ruditapes philippinarum*, donde el rango de diversidad nucleotídica resultó mucho menor (0,002-0,011, Mao et al., 2011). Los valores de diversidad genética encontrados en *D. trunculus* en comparación con otros bivalvos con los que coexiste pueden ser debidos a sesgos en el tamaño de muestra, aunque no puede descartarse que reflejen el impacto de la pesca. *D. trunculus* es una especie explotada continuamente por el sector pesquero, por lo que su diversidad genética ha podido verse erosionada.

La diferenciación poblacional fue evaluada mediante el análisis AMOVA, donde el índice de fijación F_{st} (0,0952) resultó ser significativamente diferente de 0, dando indicios de diferenciación genética entre las 4 localidades utilizadas. Los resultados de los análisis de F_{st} por pares de localidades que resultaron significativos tras la corrección secuencial de Bonferroni indicaron diferencias significativas entre todos los pares de poblaciones exceptuando la pareja Sidi Salem-Fuengirola. Las localidades que mostraron mayor distancia genética fueron Maresme y Vilarrube (0,256), mientras que las de menor distancia resultaron ser Vilarrube y Fuengirola (0,028).

La costa de las localidades utilizadas está bañada por aguas diferentes (Océano Atlántico y Mar Mediterráneo) por lo que su situación geográfica introduce las barreras físicas como posible causa de la diferenciación genética. Vilarrube está situada en el Atlántico Norte, Fuengirola en el Mar de Alborán y Maresme y Sidi Salem están en el Mediterráneo, presentando entre ellas las siguientes barreras geográficas: frente Almería-Orán, Estrecho de Gibraltar y Canal de Ibiza. Estos frentes oceanográficos podrían contribuir a la diferenciación genética entre localidades situadas a ambos lados de los mismos, lo cual ya ha sido observado en diferentes moluscos bivalvos como mejillones (Sanjuan *et al.*, 1994; Diz y Presa, 2008), ostras (Saavedra *et al.*, 1993) o vieiras (Ríos *et al.*, 2002).

El mar de Alborán está comprendido por el Estrecho de Gibraltar y una línea que uniría el Cabo de Gata (Almería) con el Cabo de Orán (Argelia). Esta zona actúa como transición entre el mar Mediterráneo y el océano Atlántico, produciéndose aquí la coincidencia de las diferentes masas de agua. Las condiciones particulares del mar de Alborán están determinadas por la reducida profundidad existente en la conexión con el océano Atlántico y los procesos volcánicos de la zona (300 m; Robles, 2010). Las condiciones hidrográficas en este punto constituyen una barrera que dificulta la dispersión de los organismos marinos (Tintore *et al.* 1988), como se ha sugerido en *M. galloprovincialis* (Quesada *et al.*, 1995).

El estrecho de Gibraltar y las barreras adyacentes podrían ser el factor responsable del aparente aislamiento genético de Vilarrube con respecto a las localidades situadas en la costa mediterránea. Sin embargo, también se encuentran diferencias entre las localidades situadas en el Mediterráneo, donde Sidi Salem y Fuengirola son genéticamente similares pero diferenciadas de la localidad de Maresme. Estas diferencias podrían ser debidas a la presencia del canal de Ibiza junto con el canal de Mallorca, donde el primero canaliza agua fría y salina hacia el sur y el segundo canaliza aguas cálidas hacia el norte. Este movimiento de masas de agua es de carácter estacional y provoca la aparición de remolinos en zonas como el Golfo de Valencia durante meses (Pinot *et al.*, 2002), lo cual podría impedir el flujo génico entre localidades.

6. CONCLUSIONES

- Los individuos pertenecientes a la localidad de Sidi Salem resultaron ser de la especie *D. trunculus*.
- Sidi Salem mostró 16 haplotipos de los cuales 14 fueron privados. Respecto a los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica, estos fueron altos y del orden de los observados en las demás localidades estudiadas.
- Los resultados de la diferenciación poblacional mostraron la existencia de estructura genética en la región analizada, siendo Sidi Salem y Fuengirola las únicas localidades que no mostraron diferenciación entre ellas.
- Esta contribución, mediante análisis genéticos, permite conocer un poco más la situación de esta especie en el Mediterráneo y añade resultados que ayudarán a una mejor gestión de este recurso de gran interés comercial para Galicia.

CONCLUSIÓNS

- Os individuos pertencentes á localidade de Sidi Salem resultaron ser da especie *D. trunculus*.
- Sidi Salem mostrou 16 haplotipos dos cales 14 foron privados. Respecto aos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica, estos foron altos e da orde dos observados nas demais localidades estudadas.
- Os resultados da diferenciación poblacional mostraron a existencia de estrutura xenética na rexión analizada, sendo Sidi Salem e Fuengirola as únicas localidades que non mostraron diferenciación entre elas.
- Esta contribución, mediante análises xenéticas, permite coñecer un pouco máis a situación de esta especie no Mediterráneo e engade resultados que axudarán a unha mellor xestión deste recurso de gran interés comercial para Galicia.

CONCLUSSIONS

- The samples from Sidi Salem showed to be of the species *D. trunculus species*.
- Sidi Salem displayed 16 haplotypes of which 14 were private. Regarding to the haplotypic and nucleotidic values, they were high and similar to those observed in the rest of the studied localities.
- The results of population differentiation showed the existence of genetic structure in the analysed region, being Sidi Salem and Fuengirola the only localities that did not show differentiation between each other.
- This contribution, through genetic analyses allow to know a little more about the situation of this species in the Mediterranean see, and add results that will help on a better management of this valuable commercial resource for Galicia.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Ahrens JB, Borda E, Barroso R, Paiva PC, Campbell AM, Wolf A, Nugues MM, Rouse GW & Schulze A (2013) The curious case of *Hermodice carunculata* (Annelida: Amphinomidae): evidence for genetic homogeneity throughout the Atlantic Ocean and adjacent basins. *Molecular Ecology* 22: 2280-2291.
- Allendorf FW, England PR, Luikart G, Ritchie PA y Ryman N (2008) Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology & Evolution* 23: 327-337.
- 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 (1983) The biology of the genus *Donax*. En: McLachlan A y Erasmus T (eds) *Sandy beaches as ecosystems*. Junk, The Hague pp. 607-636.
- Avise JC (2004) *Molecular markers, natural history and evolution* (2ª ed). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Avise 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.
- Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13: 729-744.
- Boissin E, Féral JP y Chenuil A (2008) Defining reproductively isolated units in a cryptic and syntopic species complex using mitochondrial and nuclear markers: the brooding brittle star, *Amphipholis squamata* (Ophiuroidea). *Molecular Ecology* 17: 1732-1744.
- Brown W, George M, Jr, Wilson A (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 4.
- Chícharo L, Chícharo A, Gaspar M, Alves. y 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.
- Diz AP y Presa P (2008) Regional patterns of microsatellite variation in *Mytilus galloprovincialis* from the Iberian Peninsula. *Marine Biology* 154: 277-286.
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite version 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.

Fernández-Pérez J, Nantón A, Arias-Pérez A, Freire R, Martínez-Patiño D, Méndez J (2018) Mitochondrial DNA analyses of *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia) population structure in the Iberian Peninsula, a bivalve with high commercial importance. Wiley.

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

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

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.

Hasfsaoui I, Draredja B, Lasota R, Como S y 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.

Johnson MS (2000) Measuring and interpreting genetic structure to minimize the genetic risks of translocations. *Aquaculture Research* 31: 133-143.

Kong L y Li Q (2009) Genetic evidence for the existence of cryptic species in an endangered clam *Coelomactra antiquata*. *Marine Biology* 156: 1507-1515.

Krakau M, Jacobsen S, Jensen KT, Reise K (2012) The cockle *Cerastoderma edule* at Northeast Atlantic shores: genetic signatures of glacial refugia. *Marine Biology* 159, 221-230.

Ladoukakis ED, Saavedra C, Magoulas A. y Zouros E (2002) Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. *Molecular Ecology* 11: 755-769.

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.

Marie AD, Lejeusne C, Karapatsiou E, Cuesta JA, 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.

Mazé RA y Laborda AJ (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.

Mao Y, Gao T, Yanagimoto T, Xiao Y (2011) Molecular phylogeography of *Ruditapes philippinarum* in the Northwestern Pacific Ocean based on COI gene. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 407, 171-181.

Molares J, Parada JM, Navarro-Pérez E y 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.

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.

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.

Nantón Varela A (2016) Desarrollo, evaluación y aplicación de marcadores moleculares para el análisis genético de la coquina *Donax trunculus*. Tesis doctoral, Universidade da Coruña.

Nei M (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.

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

Pinot J.M., López-Jurado J.L. y 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.

Quesada H, Beynon CM, Skibinski DO (1995) A mitochondrial DNA discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk: pleistocene vicariance biogeography and secondary intergradation. Molecular Biology and Evolution 12: 521-524.

Ramón M, Cano J, Peña JB y 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.

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.

Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. Evolution 43: 223-225.

Ríos C, Sanz S, Saavedra C y Pena JB (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.

- Robles, R. (2010). Conservación y desarrollo sostenible del mar de Alborán. UICN
- Rousset, F (2001) Inferences from spatial population genetics, en DJ Baldwin, M Bishop y L Cannings (eds.), Handbook of statistical genetics. John Wiley, Nueva York pp. 239-270.
- Rozas J (2009) DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. Pp. 337-350. In Posada, D. (ed.) Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series. Vol. 537. Humana Press, NJ, USA.
- Saavedra C, Zapata C, Guerra A y Alvarez G (1993) Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. Marine Biology 115: 85-95.
- Sanjuan A, Zapata C y Álvarez G (1994) *Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis* on the coasts of the Iberian Peninsula. Marine Ecology Progress Series 113: 131-146.
- Schuchert P (2014) High genetic diversity in the hydroid *Plumularia setacea*: a multitude of cryptic species or extensive population subdivision?. Molecular Phylogenetics and Evolution 76:1-9.
- Sotelo G, Posada D y Moran P (2009) Low-mitochondrial diversity and lack of structure in the velvet swimming crab *Necora puber* along the Galician coast. Marine Biology 159: 1039-1048.
- Tarnowska K, Chenuil A, Nikula R, Feral JP, Wolowicz M (2010) Complex genetic population structure of the bivalve *Cerastoderma glaucum* in a highly fragmented lagoon habitat. Marine Ecology Progress Series 406: 173-184.
- Thébaud O, Véron G y 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.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of regressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22(22):4673-80.
- Tintore J., Laviolette P.E., Blade I. y Cruzado A. (1988) A study of an intense density front in the eastern Alboran Sea: The Almeria-Orán front. Journal of Physical Oceanography 18:1384-1397.
- Urra J, García T, Gallardo-Roldán H, León E, Lozano M, Baro J, Rueda JL (2017) Discard analysis and damage assessment in the wedge clam mechanized dredging fisheries of the northern Alboran Sea (W Mediterranean Sea). Fisheries Research 187: 58-67.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a médium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10(4): 506-13.
- Wright S (1943) Isolation by distance. The university of Chicago.

Yuan Y, Kong L y Li Q (2013) Mitogenome evidence for the existence of cryptic species in *Coelomactra antiquata*. *Genes Genom* 35: 693-701.

Zeichen MM, Agnesi S, Mariani A, Maccaroni A y 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.

Anexo I: Sitios variables en los 61 haplotipos observados.

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

Anexo I: Sitios variables en los 61 haplotipos observados (continuación).

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

Análisis genético de *Donax trunculus* mediante marcadores mitocondriales

H	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	4	4	4	
A	8	8	9	0	1	3	3	4	4	4	4	5	5	6	6	7	7	8	8	8	0	3	5	7	7	9	0	2	2	
P	3	9	5	4	6	4	7	0	1	3	8	5	8	1	7	3	6	2	5	8	9	0	7	5	8	3	5	1	2	n
45	1
46	1
47	T	T	.	.	.	1
48	1
49	C	4
50	C	.	.	1
51	1
52	T	1
53	1
54	A	1
55	T	1
56	G	C	A	1
57	G	C	2
58	1
59	1
60	T	.	1
61	C	.	.	1

Anexo II: Frecuencias absolutas de los haplotipos observados.

Hap	Vilarrube	Maresme	Fuengirola	Sidi Salem	Total	Frecuencia absoluta %
1				5	5	4,17
2				1	1	0,83
3	8	1	7	8	24	20,00
4				1	1	0,83
5				3	3	2,50
6				2	2	1,67
7				4	4	3,33
8				1	1	0,83
9				1	1	0,83
10				1	1	0,83
11				1	1	0,83
12				1	1	0,83
13				1	1	0,83
14				1	1	0,83
15	1			1	2	1,67
16				1	1	0,83
17		1			1	0,83
18		8			8	6,67
19		2	1		3	2,50
20		1			1	0,83
21		1			1	0,83
22		1			1	0,83
23		5			5	4,17
24		2			2	1,67
25		1			1	0,83
26		1			1	0,83
27		1			1	0,83
28		1			1	0,83
29		1	1		2	1,67
30	5	1			6	5,00
31		1			1	0,83
32		1			1	0,83
33			1		1	0,83
34			1		1	0,83
35			1		1	0,83
36	1		1		2	1,67
37			1		1	0,83
38			1		1	0,83
39			1		1	0,83
40			1		1	0,83
41			1		1	0,83
42			1		1	0,83
43			1		1	0,83
44			1		1	0,83
45			1		1	0,83
46			1		1	0,83
47			1		1	0,83
48			1		1	0,83
49	2		2		4	3,33
50			1		1	0,83

Análisis genético de *Donax trunculus* mediante marcadores mitocondriales

Hap	Vilarrube	Maresme	Fuengirola	Sidi Salem	Total	Frecuencia absoluta %
51			1		1	0,83
52			1		1	0,83
53	1				1	0,83
54	1				1	0,83
55	1				1	0,83
56	1				1	0,83
57	2				2	1,67
58	1				1	0,83
59	1				1	0,83
60	1				1	0,83
61	1				1	0,83
Total	27	30	30	33	120	100,00