



Facultade de Ciencias

Grao en Bioloxía

Departamento de Bioloxía

Área de Xenética

Análise xenética de proxenitores e semente da coquina *Donax trunculus*.

Análisis genético de progenitores y semilla de la coquina *Donax trunculus*.

Genetic analysis of broodstock and offspring of the wedge clam *Donax trunculus*.

María Alejandre Souto

Traballo de Fin de Grao

Data de defensa: 26 de febreiro de 2019

Dirixido pola Dra. Josefina Méndez Felpeto

Codirixido pola Dra. Ana Nantón Varela

RESUMEN

La coquina *Donax trunculus* representa un recurso pesquero importante en Galicia, y su producción ha descendido en los últimos años. Una posible estrategia para aumentar la producción de los bancos naturales es la repoblación con semilla producida en criadero. En este trabajo se analiza genéticamente una experiencia de cultivo en criadero empleando marcadores microsatélite. Para ello se analizaron tres grupos de muestras: reproductores, semilla e individuos del banco natural de Vilarrube, del que proceden los reproductores. Tras la amplificación de los 11 *loci* empleados y el genotipado de los individuos analizados en este estudio, se llevaron a cabo los análisis de diversidad y diferenciación genética.

Los resultados mostraron que todos los *loci* amplificados en este trabajo resultaron polimórficos en los tres grupos de muestras estudiadas. Respecto a los análisis de diferenciación, no se observaron diferencias significativas entre los reproductores y los individuos del banco natural, por lo que los individuos utilizados en el criadero constituyen una muestra genéticamente representativa de la localidad de la que proceden. Por el contrario, la semilla obtenida mostró diferencias significativas tanto con los reproductores como con el banco natural. La existencia de estas diferencias sugiere la posible modificación genética en el banco natural en caso de sembrarse esta semilla. Sin embargo, esta modificación estará condicionada por la proporción entre la semilla sembrada y el tamaño del banco natural.

Palabras clave: *Donax trunculus*, microsatélite, análisis genético, semilla.

RESUMO

A cadelucha *Donax trunculus* representa un recurso pesqueiro importante en Galicia, e a súa produción descendeu nos últimos anos. Unha posible estratexia para aumentar a produción dos bancos naturais é a repoboación con semente producida en criadeiro. Neste traballo analízase xenéticamente unha experiencia de cultivo en criadeiro empregando marcadores microsatélite. Para iso analizáronse tres grupos de mostras: reproductores, semente e individuos do banco natural de Vilarrube, do que proceden os reproductores. Trala amplificación dos 11 *loci* empregados e o xenotipado dos individuos analizados neste estudo, leváronse a cabo as análises de diversidade e diferenciación xenética.

Os resultados mostraron que tódolos *loci* amplificados neste traballo resultaron polimórficos nos tres grupos de mostras estudadas. Con respecto á análise de diferenciación, non se observaron diferenzas significativas entre os reproductores e os individuos do banco natural, polo que os individuos utilizados no criadeiro constitúen unha mostra xenéticamente representativa da localidade da que proceden. Pola contra, a semente obtida mostrou diferenzas significativas tanto cos reproductores coma co banco natural. A existencia destas diferenzas suxire a posible modificación xenética no banco natural no caso de sembrar esta

semente. Sen embargo, esta modificación estará condicionada pola proporción entre a semente sembrada e o tamaño do banco natural.

Palabras clave: *Donax trunculus*, microsatélite, análise xenética, semente.

ABSTRACT

The wedge clam *Donax trunculus* represents an important fishing resource in Galicia, and its production has declined in recent years. A possible strategy to increase the production of natural beds is the restocking with seed obtained in hatchery. In this research, a hatchery experience is genetically analyzed using microsatellite markers. In order to do this, three groups of samples were analyzed: broodstock, seed and individuals from natural bed of Vilarrube, from which the broodstock come. After the amplification of the 11 *loci* used and the genotyping of the individuals analyzed in this research, the analysis of genetic diversity and differentiation were carried out.

The results showed that all *loci* amplified in this research were polymorphic in the three groups of samples studied. Regarding the differentiation analyzes, no significant differences were observed between the broodstock and the individuals from the natural bed, so that the individuals used in the hatchery constitute a genetically representative sample of the locality from which they come. On the contrary, the seed obtained showed significant differences with both the broodstock and the natural bed. The existence of these differences suggests the possible genetic modification in the natural bed in case of sowing this seed. However, this modification will be conditioned by the proportion between the seed sown and the size of the natural bed.

Key words: *Donax trunculus*, microsatellite, genetic analysis, seed

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVO.....	7
MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
Material de estudio.....	8
Extracción de ADN genómico.....	8
Amplificación de <i>loci</i> microsatélite.....	8
Análisis de diversidad genética y diferenciación por grupos.....	9
RESULTADOS.....	11
DISCUSIÓN.....	14
CONCLUSIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	19

INTRODUCCIÓN

Donax trunculus (Linné, 1758), denominada comúnmente coquina, es una especie de molusco bivalvo cuya clasificación taxonómica la incluye dentro de la familia Donacidae y en la superfamilia Tellinacea. Posee una concha de naturaleza calcárea con forma de triángulo escaleno (Bucquoy *et al.*, 1898), las valvas son casi simétricas y su superficie exterior es lisa con bandas concéntricas. La coloración es variable apareciendo ejemplares en tonos amarillo, tostado y violáceo. El interior de las valvas también presenta una coloración variable, con tonos entre blanquecinos y violáceos.



Figura 1. *Donax trunculus*. (Fotografía obtenida de www.animalbase.uni-goettingen.de.)

Su vida media está entre los 3 y los 5 años, alcanzando su madurez durante el primer año. Presenta una fecundación externa con un desove que se produce entre la primavera y el verano (marzo – agosto) (Gaspar *et al.*, 1999). Utiliza sus largos sifones para alimentarse mediante la filtración del material orgánico resuspendido, de forma que se puede utilizar como un bioindicador para medir el estado de las aguas en las que vive (Hafsaoui *et al.*, 2016).

Dentro del género *Donax* se han descrito aproximadamente 64 especies, de las cuales en torno a un 77% se encuentran en aguas tropicales, un 22% habitan en aguas templadas y solo un 5% se distribuyen en áreas de agua fría (Ansell, 1983). En lo que respecta a *D. trunculus*, ésta se extiende a lo largo del Atlántico, desde Senegal hasta Francia, por el Mar Negro y por todo el Mediterráneo (Bayed y Guillou, 1985).

En la zona Atlántica habita entre las líneas de bajamar y pleamar, en playas expuestas a las mareas y a la acción del oleaje (Gaspar *et al.*, 1999), mientras que en las zonas mediterráneas habita en playas poco expuestas y de arena fina, donde no hay grandes mareas (Mazé y Laborda, 1988). Vive enterrada en los bancos arenosos, encontrándose entre los 0 y 2 metros de profundidad en la costa mediterránea y entre los 0 y 6 metros de profundidad en la costa atlántica (Gaspar *et al.*, 1999).

La coquina *D. trunculus* se explota con fines comerciales en diferentes países europeos como España, Portugal, Italia, Francia y Turquía (Gaspar *et al.*, 1999; Chícharo *et al.*, 2002; Zeichen *et al.*, 2002; Thébaud *et al.*, 2005; Ramón *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2008 y Özden *et al.*, 2009). Para el sector marisquero gallego, la coquina representa un recurso marisquero importante dado su alto valor de cotización en lonja. Los datos de comercialización de los recursos pesqueros en Galicia pueden obtenerse a través de la Plataforma Tecnológica de Pesca de la Xunta de Galicia (<http://www.pescadegalicia.gal>). En lo que respecta a los moluscos bivalvos, esta plataforma proporciona estadísticas referentes al precio medio de venta y a la cantidad vendida en las lonjas de la comunidad (Tabla 1). Así, en el año 2018 la coquina *D. trunculus* fue el bivalvo que alcanzó el precio medio más alto (43,43 €/kg) pero uno de los tres que se vendió en menor cantidad (604,34 kg).

Tabla 1. Capturas (kg) y valor económico (€) de moluscos bivalvos comercializado en las lonjas de la comunidad gallega a lo largo del año 2018. Datos obtenidos del Servicio de Estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia (<http://www.pescadegaliia.gal>).

Especie	kg	Importe €	Medio €/kg
<i>Almeja babosa</i>	901.279,46	12.861.623,01	14,27
<i>Almeja bicuda</i>	7.113,97	31.095,89	4,37
<i>Almeja fina</i>	346.317,72	10.277.085,64	29,68
<i>Almeja rubia</i>	536.202,17	4.792.258,28	8,94
<i>Almeja japonesa</i>	3.389.501,60	31.365.639,29	9,25
<i>Almejón</i>	36.313,17	201.796,86	5,56
<i>Berbercho</i>	2.479.193,11	15.431.018,08	6,22
<i>Birollo</i>	5.207,00	17.318,25	3,33
Coquina	604,34	26.251,62	43,43
<i>Carneiro</i>	100.795,59	517.627,97	5,14
<i>Cornicha</i>	5.408,75	29.841,79	5,52
<i>Longueirón</i>	45.257,25	352.681,87	7,79
<i>Longueirón viejo</i>	48.106,79	279.838,49	5,82
<i>Marolo</i>	6,40	7,96	1,24
<i>Navaja</i>	552.298,40	5.718.093,87	10,35
<i>Ostra plana</i>	109.798,41	244.524,02	2,23
<i>Ostra rizada</i>	186.127,93	183.347,44	0,99
<i>Rabioso</i>	4.261,40	2.463,99	0,58
<i>Reló</i>	281.795,72	720.247,12	2,56
<i>Saltó</i>	10,25	5,13	0,50
<i>Vieira</i>	116.179,00	610.576,25	5,26
<i>Volandeira</i>	215.276,30	735.658,38	3,42
<i>Zamburiña</i>	20.395,20	142.347,01	6,98
TOTAL	9.387.449,98	84.541.348,21	

La evolución de la producción de coquina a lo largo de la última década se puede observar en la Figura 2. La producción alcanzó el valor más alto en el año 2008, superando los 16.000 kg, pero en los años sucesivos la producción ha ido descendiendo hasta llegar a un valor inferior a los 200 kg en el año 2017, aumentando hasta los 600 kg en el último año. El descenso de producción de los bancos naturales conlleva que se reduzca su explotación, limitándose ésta

únicamente al banco de Vilarrube (Cedeira-A Coruña). Aún así, en los últimos 4 años, también se redujo la extracción en este banco de forma considerable.



Figura 2. Evolución de la producción (kg) de *D. trunculus* y su precio (€) en la última década. Los datos fueron obtenidos en la plataforma del Servicio de Estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia (<http://www.pescadegalicia.gal>).

Este descenso en la producción puede deberse a la sobreexplotación de la especie o a factores físicos tales como las corrientes marinas, o los gradientes de temperatura. La actividad antropogénica es otro factor que puede provocar este descenso, pues la construcción de diversas estructuras como diques o puertos, pueden llevar a la alteración del hábitat natural de la coquina. Cabe señalar que los bancos naturales gallegos no son los únicos que muestran un descenso. El estudio realizado por Marie *et al.* (2016) ha demostrado que diferentes poblaciones del Golfo de Cádiz y el mar Mediterráneo están en alto riesgo de extinción a largo plazo; a excepción de la población protegida del Parque Nacional de Doñana, cuya población parece tener potencial evolutivo.

Debido a que en el sector marisquero la coquina constituye un recurso importante y observado el riesgo que corren las poblaciones, ha aumentado el interés en incrementar su producción y promover la gestión sostenible de los bancos naturales de esta especie. El incremento de la producción de los bancos naturales puede realizarse mediante técnicas de repoblación con semilla producida en criadero o con el traslado de individuos adultos de unos bancos a otros. Para ello es necesario conocer la variabilidad genética de las poblaciones para evaluar en qué medida puede verse afectada (Allendorf *et al.*, 2008), ya que las técnicas de repoblación pueden alterar la composición genética de las poblaciones salvajes, dando lugar a la pérdida de variabilidad genética o pérdida de la adaptación a diversas condiciones ambientales (Ward, 2006).

El uso y la conservación de los recursos naturales requiere la evaluación genética de los mismos. Así, en la gestión de poblaciones, tanto naturales como en cautividad, la conservación de la diversidad genética constituye un objetivo

primordial. A corto plazo, ésta es relevante para el mantenimiento de la productividad de las poblaciones, ya que está relacionada con el éxito reproductivo de las mismas; mientras que a largo plazo contribuye al potencial adaptativo de las poblaciones (Frankham *et al.*, 2002 y Allendorf *et al.*, 2008). Asimismo, la evaluación de la diferenciación genética es esencial para valorar el riesgo genético de programas de repoblación (Ward, 2006).

Con el fin de evaluar genéticamente los recursos naturales se emplean marcadores moleculares. Así, en los años 90, los marcadores genéticos se hicieron muy populares para la identificación de la estructura y la variación genética de las poblaciones (Abdul-Munir, 2014). Los avances en genética molecular han conducido al uso generalizado de los marcadores moleculares, siendo uno de los más comunes los microsatélites.

Los microsatélites constituyen segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases que se repiten en tándem y aleatoriamente en el genoma. Presentan características que los convierten en una valiosa herramienta para estudios genéticos, como la presencia de un alto grado de polimorfismo, una herencia mendeliana simple, expresión codominante y la capacidad de ser reproducibles y automatizables (Aranguren *et al.*, 2005). El elevado grado de polimorfismo de estos marcadores está relacionado con su hipermutabilidad, lo que da lugar a que estos marcadores presenten una alta variabilidad en especies y poblaciones (Chistiakov *et al.*, 2006). Estas características han propiciado que los microsatélites sean uno de los marcadores más utilizados en trabajos de conservación y gestión de especies (Chistiakov *et al.*, 2006 y González, 2003).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es el análisis de la diversidad genética y la diferenciación poblacional en una experiencia de cultivo en criadero de la coquina *D. trunculus* empleando marcadores microsatélite para evaluar genéticamente el proceso de obtención de semilla en criadero.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio

Para la realización de este estudio se analizaron un total de 104 individuos reproductores de la coquina *D. trunculus* procedentes del banco natural de Vilarrube, 101 semillas que fueron obtenidas por desove masivo en el criadero del Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo, donde se mantuvieron hasta alcanzar un tamaño mínimo de 1.000 μm , y 50 individuos del banco natural de Vilarrube. Los genotipos de los individuos procedentes de la localidad de Vilarrube utilizados para los análisis de diversidad y diferenciación genética, ya estaban disponibles en el laboratorio.

Los individuos reproductores fueron introducidos para su conservación en etanol al 96% una vez producido el desove, al igual que las semillas. Una vez en el laboratorio y mediante la observación de tejido gonadal al microscopio óptico, se sexaron los individuos reproductores. Para ello, se rehidrató una porción de tejido gonadal (aproximadamente 2 mm^3) en 500 μl de 1xPBS (tampón fosfato alcalino). Tras 10 min, aproximadamente, se disgregó el tejido y se montó en el portaobjetos con la ayuda de unas pinzas.

Extracción de ADN genómico

Siguiendo el método descrito por Walsh *et al.* (1991) se llevó a cabo la extracción de ADN genómico con el uso de la resina Chelex 100TM (Sigma-Aldrich). Para los individuos reproductores se introdujo un fragmento de pie de aproximadamente 1 mm^3 en 100 μl de Chelex 100TM al 10% (g/ml) en agua milliQ estéril y se incubó a 100°C durante 20 min. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 2 min y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Para las semillas se fragmentó todo el individuo con ayuda de unas tijeras y posteriormente se empleó el mismo protocolo de extracción.

Amplificación de *loci* microsatélite

Para todos los individuos, reproductores y semilla, se amplificaron 11 *loci* microsatélite polimórficos incluidos en las *Multiplex 1* (Nantón *et al.*, 2014) y *Multiplex 2'* (Nantón, 2016) (Tabla 2). Estas amplificaciones se llevaron a cabo en mezclas con un volumen final de 12,5 μl que contenían 80 ng de ADN extraído, la mezcla de cebadores correspondiente a cada una de las PCRs *multiplex*, y 1x *Qiagen Multiplex PCR Master Mix* (tampón, mezcla de dNTPS, MgCl_2 3 mM y HotStartTaq®).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MyCyclerTM (Bio-Rad). El programa de amplificación para la *Multiplex 1* consistió en una desnaturalización inicial durante 15 min a 95°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1,5 min a 57°C, 1,5 min a 72°C seguidos de una extensión final de 10 min a 72°C. Para la *Multiplex 2'* el programa de amplificación es similar, con una desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min; 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1,5 min a 60°C, 1,5 min a 72°C seguidos de una extensión final de 10 min a 72°C.

Tabla 2. Características de los 11 *loci* microsatélite de la *Multiplex 1* y *Multiplex 2'* (Nantón *et al.* 2014 y Nantón, 2016).

Locus	Motivo microsatélite	Fluorocromo	MgCl₂ (mM)	T^a (°C)
Dtr53	(GT) ₃ AT(GT) ₃ AGAGGGTGGATTT(GT) ₁₁	FAM	2,5	57
Dtr70	(TGTC) ₅	FAM	1,5	57
Dtr86	(GACA) ₄	VIC	1,5	57
Dtr126	(GACA) ₄ GATT(GACA) ₃ GATG(GACA) ₂	VIC	1,5	57
Dtr174	(ACAG) ₃	NED	1,5	57
Dtr199	(ACAG) ₅	PET	1,5	57
Dtr323	(AAC) ₃	FAM	1,5	57
Dtr47	(TG) ₈	VIC	2,0	60
Dtr90	(AGAC) ₅ ATAT(GGAT) ₂ GGTTGGAC(AGAC) ₃	PET	1,5	60
Dtr108	(GACA) ₄	NED	1,5	60
Dtr117	(ATC) ₇	FAM	1,5	60

Los productos de PCR obtenidos tras las correspondientes amplificaciones se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en tampón 1xTAE. Para cada muestra se aplicaron 5 µl de producto de PCR y 1 µl de tampón de carga que contiene los colorantes azul de bromofenol y xileno cianol. Con el objetivo de determinar la longitud de los fragmentos de ADN se utilizó el marcador *DNA Molecular Weight Marker XIII* (Roche Applied Science). A continuación, se tiñó el gel con bromuro de etidio (0,5 µg/ml en 1xTAE) durante 30 min y se visualizó en un transiluminador Gel Doc XR System (Bio-Rad). La secuenciación de los productos de PCR fue realizada en los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña.

El genotipado para los 11 *loci* amplificados mediante PCR se realizó empleando el programa GeneMapper v.3.7 (Applied Biosystems). Para poder añadir a las plantillas del programa los alelos nuevos y rectificar posibles errores de genotipado, se realizó una revisión y edición manual de los genotipos asignados por el programa. Los datos obtenidos en el genotipado se exportaron en formato Excel y se generaron los formatos de archivos necesarios para los análisis estadísticos usando el programa Microsatellite Toolkit (Park, 2001).

Análisis de diversidad genética y diferenciación por grupos

Una vez genotipados todos los individuos para cada uno de los *loci* se realizaron los análisis de diversidad y diferenciación genética. El número de alelos (*Na*), la heterocigosidad observada (*Ho*), la heterocigosidad esperada (*He*) insesgada de Nei (Nei, 1978) y el coeficiente de endogamia según Weir y Cockerman (*Fis W&C*) (Weir & Cockerman, 1984) se estimaron con el programa Genetix v.4.03 (Belkhir *et al.*, 2004). Con el programa Fstat v.2.9.3.2 (Goudet, 2001) se calcularon los valores de riqueza alélica (*Rs*) por *locus* y por grupo. Los tests para determinar la bondad de ajuste al equilibrio Hardy-Weinberg (HW) y a las condiciones de equilibrio de ligamiento se llevaron a cabo con el programa Genepop v.4.6 (Rousset, 2008). La significación se determinó mediante el método de cadena de Markov utilizando 10.000 *dememorizations*, 5.000 *batches* y 5.000 iteraciones por *batch*.

Mediante el índice de fijación F_{st} de Weir & Cockerham (1984) global, por *locus* y por pares de grupos, se evaluó el grado de diferenciación de las muestras. Esta evaluación se realizó empleando el programa Genetix v.4.03, en el cual se determinó el nivel de significación de F_{st} mediante un método no paramétrico basado en permutaciones (10.000 permutaciones).

Cuando se llevaron a cabo tests estadísticos múltiples, los valores de significación se ajustaron utilizando la corrección secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

RESULTADOS

La diversidad genética de *D. trunculus* se analizó mediante las dos PCRs *multiplex* detalladas en el apartado de material y métodos. En la Tabla 3 se muestran las características de los 11 *loci* microsatélite estudiados en este trabajo.

Tabla 3. Características de los 11 *loci* analizados por muestras

Reproductores						
Locus	N	Na	He	Ho	Fis W&C	Rs
Dtr126	76	12(6)	0,756	0,329**	0,568	8,655
Dtr53	94	24(6)	0,876	0,809**	0,078	17,634
Dtr70	97	5	0,725	0,711	0,019	4,981
Dtr174	97	8(1)	0,566	0,371**	0,346	5,665
Dtr199	103	7(2)	0,322	0,330	-0,027	4,224
Dtr323	104	5(1)	0,251	0,231	0,083	4,419
Dtr86	88	9(2)	0,792	0,546**	0,313	7,316
Dtr117	89	12(1)	0,804	0,550**	0,316	8,572
Dtr47	101	5	0,589	0,594	-0,008	4,655
Dtr90	99	10	0,752	0,616**	0,182	9,285
Dtr108	100	8	0,320	0,080**	0,751	6,197
Semilla						
Locus	N	Na	He	Ho	Fis W&C	Rs
Dtr126	69	9(3)	0,663	0,203**	0,696	7,343
Dtr53	88	17	0,834	0,648**	0,225	13,057
Dtr70	96	6	0,634	0,583**	0,080	5,315
Dtr174	81	5	0,678	0,432**	0,364	4,418
Dtr199	100	5	0,366	0,430	-0,175	3,784
Dtr323	99	3	0,124	0,091*	0,270	2,562
Dtr86	93	10(2)	0,822	0,667**	0,190	9,228
Dtr117	86	8	0,650	0,767**	-0,181	6,516
Dtr47	100	5	0,597	0,620	-0,039	4,532
Dtr90	87	9	0,647	0,540*	0,165	6,667
Dtr108	101	5	0,142	0,089**	0,372	3,538
Banco natural: Vilarrube						
Locus	N	Na	He	Ho	Fis W&C	Rs
Dtr126	38	5	0,622	0,316**	0,496	8,255
Dtr53	37	15	0,832	0,811	0,025	15,162
Dtr70	45	6	0,750	0,644*	0,141	5,277
Dtr174	40	9(2)	0,612	0,225**	0,635	6,550
Dtr199	44	5	0,322	0,318	0,012	4,106
Dtr323	46	3	0,198	0,130*	0,344	3,162
Dtr86	34	10(2)	0,835	0,618*	0,264	9,896
Dtr117	49	14(3)	0,841	0,633*	0,250	9,459
Dtr47	50	6(1)	0,605	0,600	0,008	4,658
Dtr90	49	9	0,740	0,796	-0,076	7,968
Dtr108	49	7(1)	0,458	0,122**	0,735	5,362

N: número de muestras; *Na*: número de alelos (alelos privados); *He*: heterocigosidad esperada insagrada 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.

Los 11 *loci* microsatélite analizados resultaron polimórficos en todos los grupos, con un número de alelos por *locus* que varió entre 3 (Dtr323) y 24 (Dtr53). Se detectaron un total de 33 alelos privados, 19 en los reproductores, 5 en las semillas y 9 en el banco natural de Vilarrube. Nueve *loci* presentaron alelos privados al menos en uno de los tres grupos, a excepción de Dtr70 y Dtr90 que no presentaron alelos privados en ninguno de los tres grupos. La *Ho* por *locus* varió entre 0,080 (Dtr108-Reproductores) y 0,811 (Dtr53-Vilarrube) y la esperada insesgada de Nei entre 0,124 (Dtr323-Semilla) y 0,876 (Dtr53-Reproductores); mientras que los valores de *Rs* por *locus* y grupo variaron entre 2,562 (Dtr323-Semilla) y 17,634 (Dtr53-Reproductores).

Dado que los tests de desequilibrio de ligamiento realizados para todos los pares de *loci* en cada uno de los grupos no resultaron significativos tras la corrección secuencial de Bonferroni, no se puede rechazar la hipótesis nula de que los *loci* analizados segregan de forma independiente. De las 33 combinaciones *locus*-grupo, 16 de ellas no mostraron desviaciones del equilibrio HW tras la corrección secuencial de Bonferroni y tres *loci* (Dtr47, Dtr199 y Dtr323) no se alejaron del equilibrio HW en ninguno de los tres grupos. Todas las combinaciones que no se ajustaron al equilibrio, a excepción del *locus* Dtr117 en el grupo de semilla, presentaron valores *Fis* positivos (entre 0,078 y 0,751) lo que indica la existencia de un déficit de heterocigotos.

En las 17 combinaciones *locus*-grupo que no se encontraron en equilibrio HW (Tabla 3), el programa MicroChecker sugirió la presencia de alelos nulos. Tres de los 11 *loci* analizados, Dtr126, Dtr174 y Dtr108, mostraron una frecuencia de alelos nulos superior a 0,2 al menos en uno de los tres grupos (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia estimada de alelos nulos en las combinaciones *locus*-grupo en desequilibrio HW.

	Reproductores	Semilla	B.N. Vilarrube
Dtr126	0,242	0,275	0,185
Dtr53	0,034	0,099	-
Dtr70	-	0,029	-
Dtr174	0,123	0,144	0,236
Dtr86	0,135	0,083	-
Dtr117	0,138	-0,073	-
Dtr90	0,076	0,062	-
Dtr108	0,181	0,045	0,228

Los análisis de diferenciación por grupos se realizaron sin los *loci* Dtr126, Dtr174 y Dtr108, ya que la presencia de alelos nulos con una frecuencia mayor a 0,2 puede conducir a sobreestimar los valores *Fst* (Chapuis & Estoup, 2007).

Con el programa Genetix se obtuvieron los valores de *Fst* global y por *locus*, reflejados en la Tabla 5. En ella se observa que el índice de fijación *Fst* global fue de 0,023, un valor significativo ($P < 0,05$). Los valores de fijación *Fst* por *locus* oscilaron entre 0,002 (Dtr53) y 0,089 (Dtr86).

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

Locus	Fst	P-valor
Dtr53	0,002	0,085
Dtr70	0,042	0,000*
Dtr199	0,006	0,132
Dtr323	0,010	0,153
Dtr86	0,089	0,000*
Dtr117	0,024	0,000*
Dtr47	0,026	0,009*
Dtr90	0,014	0,035*
GLOBAL	0,023	0,000*

(*): significativo para $\alpha=0.05$

En la Tabla 6 se reflejan los valores *Fst* por pares de grupos y sus *P-valor* correspondientes. Tras la corrección secuencial de Bonferroni las combinaciones resultaron significativas, a excepción de la comparación entre reproductores y banco natural de Vilarrube.

Tabla 6. Índice de fijación *Fst* por pares de grupos (sobre la diagonal) y *P-valor* correspondientes (bajo la diagonal).

	Reproductores	Semilla	B.N. Vilarrube
Reproductores		0,032**	0,003
Semilla	0,000		0,036**
B.N. Vilarrube	0,858	0,000	

(**): significativo tras la corrección secuencial de Bonferroni.

Los valores del índice de fijación *Fst* oscilaron entre 0,003 y 0,036, siendo la significación entre Vilarrube y semilla la más elevada.

DISCUSIÓN

La recuperación de las poblaciones naturales de moluscos bivalvos puede llevarse a cabo mediante la repoblación con individuos adultos o con la siembra de semilla producida en criadero (Lallias *et al.*, 2010). Sin embargo, cuando se llevan a cabo este tipo de estrategias debe realizarse una evaluación genética del recurso para minimizar los posibles efectos genéticos adversos introducidos por las prácticas de criadero.

En este trabajo se aportan estimas de diversidad y diferenciación genética de *D. trunculus* en una experiencia de cultivo en criadero, para lo que se analizaron 3 grupos de muestras: reproductores, semilla y población natural de Vilarrube, de donde proceden los reproductores.

Los 11 *loci* microsatélite analizados resultaron polimórficos en todos los grupos. Los rangos de *He* y *Ho* obtenidos en este estudio (*He*: 0,124-0,876; *Ho*: 0,080-0,811) fueron similares a los observados en otros trabajos previos en esta especie (Marie *et al.*, 2016, Nantón *et al.*, 2017 y Rico *et al.*, 2017). Además, las estimas obtenidas en este trabajo fueron similares también a las observadas en estudios de otras especies de bivalvos como *Venerupis pullastra* (Pereira, 2013) o *Margaritifera marocana* (Sousa *et al.*, 2018). Respecto a las estimas de *Rs* aportadas por este estudio (2,562-17,634) son inferiores a las observadas anteriormente en esta especie (1,000-35,905) (Nantón *et al.*, 2017).

Respecto al equilibrio HW, dieciséis de las combinaciones *locus*-localidad no mostraron desviaciones del equilibrio en alguno de los 3 grupos, mientras que los *loci* Dtr47, Dtr199 y Dtr323 no se alejaron del equilibrio HW en ningún caso. Todas las combinaciones que no se ajustaron al equilibrio, a excepción del *locus* Dtr117 en el grupo de semilla, presentaron valores *Fis* positivos, lo que indica la existencia de un déficit de heterocigotos. Este déficit de heterocigotos es habitual en moluscos bivalvos y, ha sido documentado en diferentes estudios previos en esta especie (Nantón *et al.*, 2014, 2017; Marie *et al.*, 2016 y Rico *et al.*, 2017), así como en otros bivalvos como es el caso de la almeja babosa (Pereira, 2013), el berberecho (Martínez *et al.*, 2015), el longueirón (Arias-Pérez *et al.*, 2012), el mejillón (Astanei *et al.*, 2005), la nacra (González-Wanguemert *et al.*, 2014) o la ostra (Launey *et al.*, 2002).

La existencia del déficit de heterocigotos puede ser explicada por distintos factores. La endogamia es uno de ellos, pero es improbable que sea la causante del déficit observado dada la fertilización externa y la extensa dispersión larvaria que presentan la mayoría de los bivalvos, como es el caso de la coquina. Además, para ser la causante de este déficit, la endogamia debería afectar de forma homogénea a todos los *loci*, lo que generaría un déficit de heterocigotos uniforme entre los mismos (Astanei *et al.*, 2005). Sin embargo, en este trabajo, los valores *Fis* positivos obtenidos presentan una distribución heterogénea entre los *loci*, por lo que es muy poco probable que la endogamia sea la principal causa del déficit de heterocigotos observado.

El efecto Wahlund es otro de los factores que puede contribuir a este déficit y se define como una reducción de la heterocigosidad causada por una subdivisión en grupos que presentan frecuencias alélicas diferentes para uno o más *loci* (Passamonti *et al.*, 1999). En este caso, el efecto Wahlund podría descartarse como la causa de este déficit, ya que en este trabajo los valores *Fst* por pares no evidencian diferenciación genética en todos los grupos.

Además, este déficit puede ser causado por la presencia de alelos nulos, que son aquellos alelos que, debido a una mutación en el punto de hibridación del cebador no amplifican por PCR (Aranguren *et al.*, 2005). Dado que uno de los alelos no amplifica, el individuo heterocigoto es genotipado como homocigoto para el alelo que sí amplifica. Este tipo de alelos están presentes en muchos grupos taxonómicos (Dakin & Avise, 2004) pero suelen ser frecuentes en moluscos (Astaneï *et al.*, 2005). En los *loci* Dtr126, Dtr174 y Dtr108 se estimaron las frecuencias de alelos nulos más altas (0,275, 0,236 y 0,228 respectivamente), coincidiendo estos *loci* con los que presentan déficit de heterocigotos, por lo que estos alelos pueden ser la principal causa del déficit que se observa en este trabajo. Dado que una frecuencia de alelos nulos superior a 0,2 puede provocar una sobreestimación de los valores *Fst* (Chapuis & Estoup, 2007), en los análisis de diferenciación genética, los *loci* Dtr126, Dtr174 y Dtr108 han sido excluidos.

En cuanto a los análisis de diferenciación genética, el *Fst* por pares no mostró, tras la corrección secuencial de Bonferroni, diferencias significativas entre los reproductores y el banco natural de Villarube, hecho que también se observó en el trabajo de Nantón (2016) de la misma especie y en el estudio sobre la especie *Ruditapes decussatus* de Borrell *et al.* (2014). Esto sugiere que los individuos usados como reproductores en el criadero constituyen una muestra representativa del banco natural del que proceden. Sin embargo, en este trabajo se han observado diferencias significativas entre los grupos de semilla y reproductores, tal como se observó en un estudio de la misma especie (Nantón, 2016) y en un estudio de la especie *R. decussatus* (Borrell *et al.*, 2014). Además, tras la corrección secuencial de Bonferroni, en el *Fst* por pares se observaron diferencias significativas entre las muestras de semilla y banco natural, dichas diferencias fueron observadas en un estudio en la misma especie (Nantón, 2016) y en los estudios de *V. pullastra* (Pereira, 2013) y *R. decussatus* (Borrell *et al.*, 2014). Diferencias significativas entre muestras de semilla y banco natural también se han visto en otros estudios sobre organismos marinos sometidos a cultivo en criadero (Lallias *et al.*; 2010 y Wachirachaikarn *et al.*, 2011).

La diferenciación de la semilla respecto al banco natural y a los reproductores podría deberse principalmente a la baja variación genética que contienen las semillas. Esto es posible que se deba a una representación inadecuada del conjunto de genes del banco natural en los reproductores, lo cual puede darse debido a la madurez de los mismos, o a la calidad fisiológica de los espermatozoides y de los huevos en el desove en criadero, ya que no todos los huevos o espermatozoides contribuyen al conjunto genético de la siguiente generación (Borrell *et al.*, 2014).

Otra causa factible de esta diferenciación es el posible régimen de selección que se da en el criadero, el cual difiere con respecto al del ambiente natural (Pereira, 2013 y Borrell *et al.*, 2014). La adaptación a las condiciones del medio natural se

ve disminuida puesto que se favorece la adaptación a las condiciones en cautividad promovido por la selección que se produce en el criadero (Allendorf *et al.*, 2013).

Así mismo, la existencia de diferenciación genética entre la semilla obtenida en criadero y el banco natural de los reproductores, podría sugerir una modificación genética temporal del banco natural si se procede a la siembra de la semilla obtenida en criadero, ya que éstas no representarían bien el conjunto genético del banco natural. Sin embargo, esta diferenciación genética entre poblaciones en cautividad y poblaciones naturales no siempre implica que el conjunto de genes se vea significativamente afectado, pues la diversidad genética puede ser similar en ambas poblaciones (Yu *et al.*, 2006).

Por tanto, en los casos en los que la semilla obtenida en criadero sea empleada para la repoblación de bancos naturales se espera que el impacto ocasionado sea bajo, ya que estará condicionado por la proporción de semilla que se siembra respecto al tamaño poblacional del banco natural.

CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo las conclusiones que se pueden extraer son las siguientes:

1. Los análisis de diversidad genética mostraron que todos los *loci* analizados en este trabajo resultaron ser polimórficos en los 3 grupos estudiados (reproductores, semilla y banco natural), con un número de alelos que osciló entre 3 y 24.
2. Los reproductores utilizados en criadero resultaron ser una muestra genéticamente representativa del banco natural del que se obtuvieron (Vilarrube). Sin embargo, la semilla analizada mostró diferenciación significativa respecto a los reproductores y al banco natural.
3. El uso de semilla obtenida en criadero para la repoblación de bancos naturales no siempre implica una modificación de la diversidad genética de los mismos puesto que va a depender de la proporción entre la semilla que se siembra y el tamaño del banco natural.

CONCLUSIÓNS:

Tras a realización deste traballo as conclusións que se poden extraer son as seguintes:

1. As análises de diversidade xenética mostraron que tódolos *loci* analizados neste traballo resultaron ser polimórficos nos 3 grupos estudados (reproductores, semente e banco natural), cun número de alelos que oscilou entre 3 e 24.
2. Os reproductores empregados no criadeiro resultaron ser unha mostra xenéticamente representativa do banco natural do que se obtiveron (Vilarrube). Sen embargo, a semente analizada mostrou diferenciación significativa respecto ós reproductores e ó banco natural.
3. O uso da semente obtida en criadeiro para a repoboación de bancos naturais non sempre implica unha modificación da diversidade xenética dos mesmos posto que vai depender da proporción entre a semente que se sembre e o tamaño do banco natural.

CONCLUSIONS:

After completion of this research, the conclusions that can be drawn are the following:

1. The analysis of the genetic diversity showed that all the *loci* analyzed in this research were polymorphic in the 3 groups (broodstock, seed and natural bed) with a number of alleles ranged from 3 to 24.
2. The broodstock used in the hatchery was a genetically representative sample of the natural bed from where they came (Vilarrube). However, the

seed analyzed showed significant differentiation from the broodstock and the natural bed.

3. The use of the seed obtained in hatchery in the restoration of natural beds does not always cause a modification of the genetic diversity, since it will depend on the proportion between the seed that is sown and the size of the natural bed.

BIBLIOGRAFÍA

Abdul-Muneer PM (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 FW, England PR, Luikart G, Ritchie PA & Ryman N (2008) Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology & Evolution*. **23**, 327-337.

Allendorf FW, Luikart G & Aitken SN (2013) *Conservation and the genetics of populations* (2nd edition) Wiley-Blackwell Publishing, West Sussex, UK.

Ansell AD (1983) The biology of genus *Donax*. En McLachlan A y Erasmus T (eds) *Sandy beaches as ecosystems*. Junk, The Hague, pp. 607-636.

Aranguren Mendez JA, Roman R, Isea W, Villasmi Y & Jordana J (2005) Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: Una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. **13(1)**, 30-42.

Arias-Pérez A, Fernández-Tajes J, Gaspar MB & Méndez J (2012) Isolation of microsatellite markers and analysis of genetic diversity among east Atlantic populations of the sword razor shell *Ensis siliqua*: A tool for population management. *Biochemical Genetics*. **50**, 397-415.

Astane I, Gosling E, Wilson J & Powell E (2005) Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Molecular Ecology*. **14**, 1655-1666.

Bayed A & Guillou J (1985) Contribution a l'étude des populations du genre *Donax*: la population de *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) de Mehdiya (Maroc). *Annales de l'Institut Oceanographique*. **61**, 139-147.

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*.

Borrell YJ, Arias-Pérez A, Freire R, Valdés A, Sánchez JA, Méndez J, Martínez D, López J, Carleos C, Blanco G, & Insua AM (2014) Microsatellites and multiplex PCRs for assessing aquaculture practices of the grooved carpet shell *Ruditapes decussatus* in Spain. *Aquaculture* **426**, 49-59.

Bucquoy E, Dautzenberg P & Dollfus G (1898) Les mollusques marins du Rousillon. *II Pélécy-podes. Avec Atlas de 99 planches en Phototypie*. J.B. Bailliére and Fils, Paris. Tomo 2.

Chapuis MP & 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 DA, Hellemans B & Volckaert FAM (2006) Microsaellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture*. **255**, 1-29.

Dakin EE & Avise JC (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* **93**,504-509.

Frankham R, Ballou JD & Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics* Cambridge University Press, Cambridge.

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

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

González-Wanguemert M, Costa J, Basso L, Duarte C, Serrão E, & Hendriks I (2014) Highly polymorphic microsatellite markers for the Mediterranean endemic fan mussel *Pinna nobilis*. *Mediterranean Marine Science*. **16(1)**, 31-35.

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.

Lallias D, Boudry P, Lapegue S, King JW & Beaumont AR (2010) Strategies for the retention of high genetic variability in European flat oyster (*Ostrea edulis*) restoration programmes. *Conservation Genetics* **11**, 1899-1910.

Launey S, Ledu C, Boudry P, Bonhomme F & Naciri-Graven Y (2002) Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *Journal of Heredity*. **93**, 331-338.

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.

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 RA & 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.
- Morales J, Parada JM, Navarro-Pérez E & Fernández A (2008) Variabilidad interanual de las ventas de los principales recursos marisqueros de Galicia y su relación con las condiciones ambientales. *Revista Galega dos Recursos Mariños (Artículos e Informes técnicos)*. **2**, 1-42.
- Nantón A (2016) 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.
- Nantón A, Arias-Pérez A, Freire R, Fernández-Pérez J, Nóvoa S & Méndez J (2017) Microsatellite variation in *Donax trunculus* from the Iberian Peninsula, with particular attention to Galician estuaries (NW Spain): *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. **197**, 27-34.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. **89**, 583-590.
- Özden Ö, Erkan N & Deval M (2009) Trace mineral profiles of the bivalve species *Chamela gallina* and *Donx trunculus*. *Food Chemistry*. **113(1)**, 222-226.
- Park S (2001) Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection. Tesis doctoral, Universidad de Dublin.
- Passamonti M, Mantovani B, Scali V (1999) Allozymic analysis of some Mediterranean Veneridae (Mollusca: Bivalvia): preliminary notes on taxonomy and systematics of the family. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. **79**, 899-906.
- Pereira SM (2013) Estudio genético poblacional en la almeja babosa *Venerupis pullastra*. Tesis doctoral, Universidade da Coruña.
- Ramón M, Cano J, Peña JB & Campos MJ (2005) Current status and perspectives of mollusc (bivalves and gastropods) culture in the Spanish Mediterranean. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*. **21**, 361-373.
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. **43**, 223-225.
- Rico C, Cuesta JA, Drake P, Macpherson E, Bernatchez L & Marie AD (2017) Null alleles are ubiquitous at microsatellite loci in the Wedge Clam (*Donax trunculus*). *PeerJ*. **5**, E3188

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.

Sousa R, Teixeira A, Santos A, Benaissa H, Varandas S, Ghamizi M, Priés V, Froufe E & Lopes-Lima M (2018) Oued Bouhlou: A new hope for the Moroccan pearl mussel. *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems*. **28**, 247–251.

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/STHUDPP 05-010. Brest, France*. 88.

Wachirachaikarn A, Prakoon W, Nguyen TTT, Prompakdee W & Na-Nakorn U (2011) Loss of genetic variation of *Phalacronotus bleekeri* (Gunther, 1864) in the hatchery stocks revealed by newly developed microsatellites. *Aquaculture* **321**, 298-302.

Walsh PS, Metzger DA & Higuchi R (1991) Chelex-100 as médium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. **10**, 506-513.

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

Weir BS & Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. **38**, 1358-1370.

Yu DH & Chu KH (2006) Genetic variation in wild and cultured populations of the Pearl oyster *Pinctada fucata* from southern China. *Aquaculture* **258**, 220-227.

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

REFERENCIAS WEB

Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta De Galicia. (s.f.). *Plataforma tecnolóxica da pesca*. Recuperado en Febrero de 2018, de <http://www.pescadegalicia.gal> .