



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Diversidad y estructura genética de  
*Striostrea prismatica* Gray, 1825  
(Bivalvia: Ostreidae) en el Pacífico  
oriental tropical**

**Tesis**

**que para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias en Biosistemática  
y Manejo de Recursos Naturales y  
Agrícolas**

**Presenta**

**MARTÍN ALONSO ARÉCHIGA PALOMERA**

**Zapopan, Jalisco**

**noviembre de 2018**



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Diversidad y estructura genética de *Striostrea prismatica* Gray, 1825 (Bivalvia: Ostreidae) en el Pacífico oriental tropical**

**Tesis**

**que para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

**Presenta**

**Martín Alonso Aréchiga Palomera**

**Director**

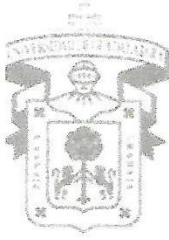
**Dr. Ernesto López Uriarte**

**Codirector**

**Dra. Luz Patricia Castro Félix**

**Zapopan, Jalisco**

**noviembre de 2018**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

## Diversidad y estructura genética de *Striostrea prismatica* Gray, 1825 (Bivalvia: Ostreidae) en el Pacífico oriental tropical

Por

Biól. Martín Alonso Aréchiga Palomera

Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Aprobado por:

Dr. Ernesto López Uriarte  
Director de tesis e integrante del jurado

Fecha



Dra. Luz Patricia Castro Félix  
Codirector de tesis e integrante del jurado

19/09/18  
Fecha



Dr. Pedro Cruz Hernández  
Asesor del comité Particular e integrante del jurado

12/09/18  
Fecha



Dr. Miguel Ángel Muñoz Castro  
Asesor del comité Particular e integrante del jurado

03/10/18  
Fecha



Dra. Martha Isabel Torres Morán  
Asesor del comité Particular e integrante del jurado

03/10/18  
Fecha

*A mis padres*

## **AGRADECIMIENTOS**

Esta tesis fue escrita gracias al apoyo del Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la beca asignada **CVU: 779399**. Así mismo, se le agradece a la Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas (BIMARENA), tanto a la coordinadora, la Dra. Patricia Zarazua, como a todo el cuerpo académico involucrado en mi ingreso al posgrado y a todos los profesores de las asignaturas y seminarios que asistí.

Un especial agradeciendo a mis directores de tesis, el Dr. Ernesto López y la Dra. Patricia Castro, al Dr. Pedro Cruz, que dio asesoría importante en la elaboración de este escrito, así como al Dr. Miguel Muñiz y la Dra. Isabel Torres, por sus puntuales sugerencias y correcciones al documento.

Un profundo agradecimiento a los integrantes y compañeros de laboratorio, que, sin ellos, esta tesis no pudiese haberse escrito, a la Dra. Anne Santerre, con su vasta experiencia técnica y científica... y con alguno de sus reactivos y comida que me regaló, a la Dra. Rosario, que en muchas ocasiones le intervine con el uso de la campana de extracción. A Ahtziri (que guardó bien su desesperación en mis lentos pipeteos), a Andrés que me apoyó bastante en la elaboración de geles, PCR's y demás, a Karen, que me ayudó tanto como lo hizo Andrés, aunque al final se desapareció, a Josema, que incondicionalmente y sin saberlo me ayudó con las extracciones de ADN. A Alexis, Brenda, Itzel, Chema y Fernanda, que de alguna forma aportaron algo en esta tesis y tenían que estar mencionados en este apartado.

A casi todos mis compañeros de generación, en especial al grupo de "Estadística" de WhatsApp: Giovanni (que apoyó con la elaboración del mapa de distribución), Hosmer, Enrique y Kirey (con sus importantes comentarios en alguno de los seminarios que compartimos), y todos los demás que de alguna forma influenciaron en el presente, a Sara, Mariela, Gerardo y Alejandra. Fuera del prestigioso grupo, a Judith, con sus importantes sugerencias y apoyo en alguno de los análisis genéticos y a Adahaly, que ambos me dieron asilo académico en esta etapa final, un especial agradecimiento.

Y finalmente, aunque no un apoyo académico, pero sí emocional, a Natali y a mi familia: mis padres, mi Hermana y a Maya, el mejor agradecimiento sobre todos los demás.

<b>ÍNDICE</b>	
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	1
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	6
<b>III. ÁREA DE ESTUDIO</b> .....	6
3.1. Golfo de California .....	7
3.2. Pacífico Transicional Mexicano .....	7
3.3. Pacífico Centroamericano.....	8
<b>IV. TRABAJO DE CAMPO</b> .....	9
<b>V. Capítulo I. Transferibilidad a <i>Striostrea prismatica</i> de marcadores SSR y EST-SSR desarrollados en especies de la familia Ostreidae.</b> .....	11
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	13
2.1. Muestras y extracción de ADN .....	13
2.2. Selección de marcadores SSR y EST-SSR .....	13
2.3. Pruebas de amplificación por PCR .....	13
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	15
<b>4. CONCLUSIONES</b> .....	19
<b>VI. Capítulo II. Diversidad y estructura genética del ostión de roca <i>Striostrea prismatica</i> Gray, 1825 (Bivalvia: Ostreidae) en el Pacífico oriental tropical inferidas con ISSR.</b> .....	20
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	20
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
2.1 Área de estudio y obtención de muestras .....	23
2.2. Extracción de ADN y amplificación PCR-ISSR.....	23
2.3 Análisis de datos.....	24
<b>3. RESULTADOS</b> .....	27
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	32
<b>5. CONCLUSIÓN</b> .....	39
<b>VII. CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	40
<b>VIII. RECOMENDACIONES</b> .....	41
<b>IX. LITERATURA CITADA</b> .....	42
<b>X. ANEXOS</b> .....	54
Anexo 1. Extracción de ADN por kit comercial.....	54

Anexo 2. Protocolo de electroforesis .....	55
Anexo 3. Patrones de amplificación para los siete marcadores ISSR empleados en el presente estudio.....	56

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro I.** Localidades seleccionadas para el análisis de la diversidad y estructura genética del ostión de roca, *Striostrea prismatica* en el Pacífico oriental tropical. ....10

### Capítulo 1

**Cuadro 1.** Marcadores microsatélites SSR y EST-SSR seleccionados para el análisis de la transferibilidad en el ostión de roca *Striostrea prismatica* .....14

### Capítulo 2

**Cuadro 1.** Características de los iniciadores y fragmentos generados en el ostión de roca, *Striostrea prismatica*. ....27

**Cuadro 2.** Índices de diversidad genética para siete localidades de ostión de roca, *Striostrea prismatica*. ....28

**Cuadro 3.** Diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) entre pares de localidades (debajo de la diagonal) y flujo genético ( $Nm$ ) entre localidades (sobre la diagonal) de *Striostrea prismatica* del Pacífico oriental tropical. ....28

**Cuadro 4.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) en el ostión de roca, *Striostrea prismatica*. ....29



## LISTA DE FIGURAS

**Figura I.** Localidades de muestreo de *Striostrea prismatica* para el análisis genético. ....9

### Capítulo 1

**Figura 1.** Pruebas de transferibilidad a *Striostrea prismatica* de marcadores SSR y EST-SSR desarrollados en otras especies de ostión de la familia Ostreidae. ....17

### Capítulo 2

**Figura 1.** Determinación del número de grupos genéticos ( $\Delta K$ ) con el programa Structure Harvester. ....30

**Figura 2.** Distribución de grupos genéticos en las localidades de *Striostrea prismática*, cada color representa un grupo genético. Cada individuo está representado por una barra vertical, los colores representan el porcentaje de asignación a cada grupo genético. ....30

**Figura 3.** Dendograma UPGMA de distancias genética de Nei (1978) en localidades de *Striostrea prismatica*. ....31

**Figura 4.** Prueba de Mantel. Distancias geográficas y distancias genética de Nei (1978) entre localidades de *Striostrea prismatica*. MonteCarlo basado sobre 999 réplicas, con una  $P= 0.009$ . ....31

## RESUMEN

*Striostrea prismática* es un molusco bivalvo de la familia Ostreidae que habita en el sublitoral rocoso desde la costa de Baja California Sur en México, hasta la localidad de Máncora en Perú. Es un recurso tradicional de la pesca artesanal y su cultivo en condiciones de laboratorio se explora recientemente. La sobrepesca, la contaminación y el cambio climático pueden causar cambios en la diversidad genética y en la estructura genética poblacional de los bancos ostrícolas. Por lo anterior, es importante conocer los niveles y la distribución de la variación genética en su rango de distribución geográfica. Con este objetivo, se realizaron pruebas de transferibilidad cruzada en *S. prismatica* de microsatélites en secuencias no codificantes (SSR) y microsatélites en secuencias que se expresan (SSR-EST) desarrollados en especies de ostiones de la familia Ostreidae. Los resultados de la transferibilidad fueron más bajos de lo esperado debido probablemente a la distancia filogenética de *S. prismatica* con las especies de ostión utilizadas. La poca eficiencia de las PCRs y la falta de reproducibilidad cuando la amplificación fue positiva, descartaron el uso de los microsatélites para llevar a cabo el análisis genético. Por su parte, los marcadores dominantes ISSR (secuencias repetidas intersimples) fueron lo suficientemente reproducibles y polimórficos para detectar la diversidad y diferenciación en *S. primatica*. Se evaluaron siete localidades de la costa del Pacífico oriental tropical en tres ecorregiones marinas: i) Golfo de California con Mazatlán (Mz), Tizate (Ti) y Quimixto (Qm); ii) Pacífico transicional mexicano con Punta Peñitas (Pe) y Boca de Iguanas (Ig); y iii) Pacífico centroamericano con Puerto Ángel, Oaxaca (Ox) y El Salvador (ES). Se obtuvieron 103 loci polimórficos ISSR. Los niveles de variación genética en *S. prismatica* fueron moderados ( $P= 100\%$ ,  $H_T= 0.2354$ ,  $I= 0.394$ ), Tizate fue la localidad con los índices de variación genética ( $P= 59.49\%$ ,  $H= 0.153$ ,  $I= 0.237$ ) significativamente más bajos ( $P<0.05$ ), mientras que Puerto Ángel presentó los índices de diversidad genética más altos ( $P=80.58\%$ ,  $H= 0.227$ ,  $I= 0.354$ ). La diferenciación genética se considera moderada ( $G_{ST}= 0.182$  y  $F_{ST}= 0.1381$ ) y Puerto Ángel y El Salvador fueron las localidades más diferenciadas. Los resultados del AMOVA muestran que la mayor parte de la variación molecular existe dentro de las localidades (78%,  $\Phi_{PT}= 0.215$ ,  $P= 0.001$ ). El análisis de Mantel ( $R^2= 0.874$ ,  $P= 0.009$ ) sugiere aislamiento por distancia. El método de agrupamiento Bayesiano indicó que la especie se encuentra estructurada en tres componentes genéticos o poblaciones ( $K=3$ ), la asignación de estos componentes corresponde a las tres ecorregiones marinas que comprende el estudio; sin embargo, la diferenciación  $F_{ST}$  entre pares de localidades resultó significativa ( $P<0.001$ ), lo que

sugiere la existencia de subpoblaciones o parches genéticos. En conclusión, *S. prismatica* presenta niveles adecuados de diversidad genética y se encuentra genéticamente estructurada. Las diferencias en el hábitat se manifiestan en parches genéticos conectados a través de migración de las larvas ( $Nm= 1.2$  a  $2.32$ ), la cual se encuentra determinada por la distancia geográfica. Lo anterior, aporta información básica del estado actual que guardan las poblaciones de *S. prismatica* en el Pacífico oriental tropical a nivel genético, considerando su uso hacia la conservación, manejo y aprovechamiento de dicho recurso pesquero.

## ABSTRACT

*Striostrea prismatica* is a bivalve mollusk of the Ostreidae family that inhabits the rocky sub-littoral, from the coast of Baja California Sur in Mexico, to the locality of Máncora in Perú. It is a traditional fishery resource, and its culture under laboratory conditions has been recently explored. Overfishing, pollution and climate change can cause changes in the genetic diversity and population genetic structure of oyster banks. Therefore, it is important to know the levels and distribution of genetic variation of *S. prismatica* in its geographical distribution range. With this objective in mind, cross-transferability tests of microsatellites in non-coding sequences (SSR) and microsatellites in expressed sequences tag (SSR-EST) developed in oyster species of the Ostreidae family were carried out in *S. prismatica*. The results of transferability were lower than expected, this is probably due to the phylogenetic distance of *S. prismatica* with the oyster species used in the study. The low efficiency of the PCRs and the lack of reproducibility when amplification was positive, discarded the use of SSRs to carry out the genetic analysis. On the other hand, the dominant multilocus markers ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) were sufficiently reproducible and polymorphic to detect genetic diversity and differentiation in *S. prismatica*. Seven localities of the tropical eastern Pacific coast were evaluated in three marine ecoregions: i) Gulf of California with three localities ii) Mexican transitional Pacific with two localities: Punta Peñitas (Pe) and Boca de Iguanas (Ig); and iii) the Central American Pacific with two localities. A total of 103 polymorphic ISSR loci were detected. The levels of genetic variation in *S. prismatica* were moderate ( $P= 100\%$ ,  $HT= 0.2354$ ,  $I= 0.394$ ), Tizate in the Gulf of California was the locality with the significantly lowers genetic diversity indices ( $P= 59.49\%$ ,  $H= 0.153$ ,  $I= 0.237$ ) ( $P<0.05$ ), while Puerto Ángel in the Central American Pacific presented the highest genetic diversity indices ( $P= 80.58\%$ ,  $H= 0.227$ ,  $I= 0.354$ ). Genetic differentiation is considered moderate ( $GST= 0.182$  y  $FST= 0.1381$ ) and Puerto Ángel and El Salvador were the most differentiated localities. The results of the AMOVA show that most of the molecular variation exists within the localities (78%,  $\Phi_{PT}= 0.215$ ,  $P= 0.001$ ). Mantel analysis ( $R^2= 0.874$ ,  $P= 0.009$ ) suggests isolation by distance. The Bayesian grouping method indicated that the species is structured in three genetic components or populations ( $K= 3$ ), the allocation of these components correspond to the three marine ecoregions included in the study, nevertheless, the  $F_{ST}$  differentiation between pairs of localities was significant ( $P<0.001$ ), which suggests the existence of subpopulations or genetic patches. In conclusion, *S. prismatica* presents adequate levels of genetic diversity and a positive genetic structuring.

Differences in habitat are manifested in genetic patches connected through migration of larvae ( $Nm= 1.2$  to  $2.32$ ), which is determined by geographical distance. The above, provides basic information on the current state of *S. prismatica* in the tropical eastern Pacific at the genetic level, the findings described here should be used for the conservation, management and exploitation of this fishery resource.

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El ostión de roca *Striostrea prismatica* (Gray, 1825), es un molusco bivalvo (Mollusca, Bivalvia, Ostreidae) que se distribuye desde La Paz, Baja California (México) hasta Mancora, Tumbes (Perú) (Poutiers, 1995). Se le encuentra sobre el intermareal rocoso y en sustratos submareales someros a 7 metros de profundidad (Fournier, 1992; Coan y Valentich-Scott, 2012), se alimenta principalmente de microalgas y detritos suspendidos en el agua, filtrando las impurezas del agua. La madurez ocurre durante la época seca y el desove al inicio de la época de lluvias (Fournier, 1992). *S. prismatica* cumple un rol importante en sus ecosistemas nativos y representa además un recurso de importancia alimenticia y una alternativa como fuente de ingresos para pescadores artesanales de las comunidades costeras (Melchor *et al.*, 1996; SAGARPA, 2011).

De acuerdo al Registro Mundial de Especies Marinas (WoRMS, 2017), la superfamilia Ostreoidea, que representa a los ostiones de todo el mundo, se encuentra dividida en dos familias: Gryphaidae (Vyalov, 1936) y Ostreidae (Rafinesque, 1815). La familia Gryphaeidae (ostras de la espuma u ostras del nido de abeja) está muy bien representada en el registro fósil, sin embargo, el número de especies vivas es muy escaso (WoRMS, 2017). La familia Ostreidae, está compuesta por 9 subfamilias. La subfamilia Striostreinae está compuesta solo por el género *Striostrea*. De la familia Ostreidae, algunas especies comparten distribución geográfica con *S. prismatica*: *Ostrea angelica*, *O. conchaphila*, *O. lurida*, *O. tubulifera*, *Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* (introducida), *Saccostrea palmula*, *Hytissa hyotis*, *Undulostrea megadon* (en Raith *et al.*, 2016), entre otras. En el trabajo de Ríos-González *et al.* (2018) se detallan algunos aspectos sobre la biología, explotación y conservación de la especie ostión de roca, *S. prismatica*.

La pesquería de los moluscos bivalvos es una de las de mayor importancia a nivel mundial, los principales países productores de ostión son China, Corea, Japón, EUA, Francia y México (SAGARPA, 2011). En México, la captura de especies de ostión, incluido *S. prismatica*, ocupa el sexto lugar en esta producción (SAGARPA, 2011). Para México, a partir de 1988, el gobierno estableció veda para la pesca de *S. prismatica* en el Pacífico mexicano, en el periodo que va del 1° de julio al 31 de agosto, con el fin de proteger a la especie durante la temporada más intensa de reproducción biológica y desove (DOF, 1988). Sin embargo, en algunos estudios se ha encontrado que los picos máximos de reproducción y desove no coinciden con el periodo de veda. El ciclo

reproductivo de *S. prismatica* presenta variaciones de acuerdo a su ubicación geográfica, o al menos a lo que se tiene documentado al respecto: en el Golfo de California, se ha encontrado que ocurre de agosto a septiembre en Sinaloa (Páez-Osuna *et al.*, 1993) y Nayarit (Cuevas-Guevara y Martínez-Guerrero, 1979), de junio a agosto en Guerrero (Pacífico Transicional Mexicano) (Ramírez y Sevilla, 1964) y de marzo a julio en Oaxaca (Pacífico Centroamericano) (Ruiz-Durá, 1974).

Fuertes disminuciones en las poblaciones debido a la sobrepesca pueden afectar los niveles de variación genética, como ha ocurrido con la ostra chilena, *Ostrea chilensis* (Toro y González, 2009). En términos pesqueros, es muy importante determinar la extensión de un stock pesquero dentro de un rango geográfico, ya que es necesario definir si la extracción de organismos en una localidad afectará a los organismos existentes en otras áreas. El concepto de 'stock' genético se define como una población panmíctica de individuos emparentados y genéticamente distintos de otras poblaciones de la misma especie (Shaklee *et al.*, 1990).

Sobre lo anterior, Pérez-Enríquez *et al.* (2008) en su estudio con ostión de placer (*Crassostrea corteziensis*), sugiere que es necesario determinar la ubicación de los stocks que pueden funcionar como fuentes de reclutas para los stocks explotables y diseñar esquemas de repoblamiento y manejo que permitan su recuperación. El conocimiento del acervo genético de una especie y de la diversidad genética a lo largo de su rango de distribución, son factores importantes que permiten realizar un manejo adecuado para la formación de un stock, con el fin de evitar pérdida de la diversidad genética y cambios en su estructura genética poblacional (Pérez-Enríquez *et al.*, 2008). En ese sentido, el estudio de la genética poblacional puede contribuir a una mejor administración del recurso dentro de su pesquería y su posible cultivo, evitando que su relativa vulnerabilidad lo coloque en una situación de riesgo, como ha ocurrido en México con otros moluscos bivalvos y gasterópodos, tales como el callo de hacha, el abulón y la lapa (Melchor *et al.*, 1996).

Se han realizado numerosos trabajos sobre genética de poblaciones en bivalvos marinos con importancia comercial, se ejemplifica el trabajo de De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero (1989) donde encontraron una reducción en la variabilidad genética de *Crassostrea virginica*, y propusieron la conservación de tamaños de población adecuados. Por su parte, Toro y González (2009) encontraron una alta diversidad genética en la ostra chilena (*Ostrea chilensis*), después de un repoblamiento en los bancos naturales debido a fuertes disminuciones por la sobrepesca. Es importante precisar que la diversidad y la estructura genética de esta especie, así como de otras especies comerciales,

no depende exclusivamente de su estrategia reproductiva y de la pesca, sino que existen otros factores antropogénicos y oceanográficos que probablemente estarían influenciando la conformación genética de las poblaciones en estudio (Toro y González, 2009).

La extensa distribución geográfica de algunas especies marinas, como la de *S. prismatica* ( $\approx 4\ 300$  km), y la posible presencia de barreras que restringen el libre movimiento de los individuos, sugiere que no existiría una panmixia total, lo que daría como resultado que una especie esté formada por numerosas poblaciones panmícticas o demos (Galleguillos *et al.*, 1997). En algunos invertebrados marinos, la baja dispersión larval y poca movilidad de los adultos tienen como consecuencia reducidos tamaños en los stocks, lo cual los hace más vulnerables a los efectos de la sobrepesca (Toro y González, 2009). En las especies marinas que presentan una vida larval pelágica, se espera que las poblaciones se comporten como una gran población panmíctica (Arnaud, 2000), contrario a las especies de ostiones con estadios larvales que carecen de un estilo pelágico (aplánicas) y aquellas con una esperanza de vida larval corta (anquioplánicas) y por lo tanto con un potencial limitado para dispersarse (Casu *et al.*, 2005).

La ausencia de fuertes barreras geográficas en el medio oceánico puede favorecer el flujo genético entre localidades aledañas. Sin embargo, factores como la temperatura, salinidad y las corrientes marinas pueden actuar como barreras oceanográficas que pueden influir en la estructura genética poblacional (Reeb y Avise, 1990). Estudios con diferentes marcadores moleculares en moluscos marinos revelan lo anteriormente señalado, pues han logrado detectar diferenciación y estructura genética, en la ostra plana europea, *Ostrea edulis* (Launey *et al.*, 2002), en la almeja amatista, *Gemma Gemma* (Casu *et al.*, 2005), en el ostión *C. virginica* (Galindo-Sánchez *et al.*, 2008), en el gasterópodo *Nacella magallanica* (De Aranzamendi *et al.*, 2014), entre otros.

En relación a lo anterior, se menciona que, a pesar del potencial de dispersión de las larvas, las diferencias detectadas en los estudios señalados se atribuyen a probables presiones selectivas por diferencias en el hábitat (Pérez-Enríquez *et al.*, 2008) y algunos mencionan que la reducción poblacional por la alteración del hábitat también puede contribuir a la diferenciación genética por deriva génica (Galindo-Sánchez *et al.*, 2008). Así mismo, algunos trabajos han mencionado un fenómeno donde el grado de diferenciación no era coherente con su estrecha proximidad geográfica. A este fenómeno se le conoce como "parche genético caótico" y es muy común en moluscos marinos (Johnson y Black, 1982, 1984; Buroker, 1983; David *et al.*, 1997; Michinina y Rebordinos, 1997).



En la práctica, un problema común es determinar si existen intercambios frecuentes de individuos entre poblaciones propiciando un flujo genético. Una falta de estructura o una homogeneidad genética global podría ser debido a la incapacidad de los marcadores genéticos utilizados para detectar una diferenciación genética sutil. Los marcadores de ADN se basan en la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y se pueden agrupar en marcadores de múltiples regiones genómicas o marcadores multiloci, como los RAPDs, los AFLPs y los ISSR, y marcadores de una sola región genómica o marcadores unilocus, como los RFLPs y los microsatélites (SSR). Los marcadores multiloci son dominantes, presentan solamente dos fenotipos (presencia o ausencia de los fragmentos amplificados) y no permiten distinguir a los heterocigotos, mientras que los marcadores unilocus son codominantes, suelen presentar varios alelos y permiten distinguir todos los genotipos (Liu y Cordes, 2004).

Debido a su naturaleza codominante y su alto polimorfismo, las repeticiones de secuencia simple (SSR o microsatélites) son los marcadores más idóneos para llevar a cabo estudios de diversidad, diferenciación y estructura genética. La variación de los microsatélites se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus (Ellegren, 2004). Los alelos difieren entre sí en el número de repeticiones simples. En los últimos años se han desarrollado microsatélites de secuencias que se expresan (EST-SSR), en general estos marcadores son más transferibles entre especies y en ocasiones aún entre especies de géneros diferentes (Gupta *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2009). Los EST-SSR son valiosos para estudios de adaptación local, estructura poblacional, programas de selección de reproductores, parentescos y mapeo genómico (Yu y Li, 2007).

Una alta conservación de las regiones flanqueantes de loci SSR y EST-SSR en el genoma, permiten la amplificación cruzada de estos marcadores entre especies del mismo género en especial en vertebrados, como peces, reptiles y mamíferos (Rico *et al.*, 1996; Peakall *et al.*, 1998). Con los marcadores EST-SSR existen reportes de éxito de transferibilidad cruzada aún a nivel de familia entre géneros cercanos (Gupta *et al.*, 2003). Hasta ahora no se cuenta con marcadores SSR y EST-SSR específicos de *Striostrea*, no obstante, ya existen marcadores SSR desarrollados para especies de la familia Ostreidae cercanas a *S. prismatica*, del género *Crassostrea* (Li *et al.*, 2003; Hedgecock *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010), de *Ostrea* (Stick *et al.*, 2009; Leighton, 2015) y *Saccostrea* (Banks *et al.*, 2006). Los marcadores EST-SSR también han sido utilizados en este grupo de moluscos bivalvos (Wang *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2009; Dong *et al.*,

2012; Kong *et al.*, 2014). Una amplificación cruzada exitosa de estos marcadores a *S. prismatica* sería valioso para conocer la genética de poblaciones de la especie, puesto que la amplificación cruzada es más económica y consume menos tiempo y recursos que el desarrollo y caracterización de nuevos iniciadores específicos (Selkoe *et al.*, 2006).

Por otra parte, los marcadores dominantes ISSR (Inter-Secuencias Simples Repetitivas) permiten analizar la variación que presentan las secuencias no repetitivas que se encuentran entre los microsatélites del genoma nuclear. Las ventajas que ofrecen los ISSR se centran en la alta variación que detectan, además de que no es necesario el diseño de oligonucleótidos específicos para el organismo en estudio. Los ISSR han sido ampliamente utilizados en el estudio de la genética poblacional de diversas especies (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2000) y han sido empleados con éxito en la evaluación de la diversidad y diferenciación genética poblacional en varias especies de bivalvos marinos (Casu *et al.*, 2005, 2006; De Aranzamendi *et al.*, 2008; De Aranzamendi *et al.*, 2014).

El ostión de roca tiene una posición importante en el mercado regional y nacional, por su alto valor nutricional y aceptación por el consumidor. Es un recurso económico importante para los pescadores artesanales que dependen de su comercialización. Además, recientemente se ha puesto especial interés en *S. prismatica* por su cultivo potencial, debido a que representa una alternativa para la industria del ostión. Por lo anterior, se justifica realizar estudios sobre su genética de poblaciones y así conocer los niveles de diversidad genética y la estructura genética poblacional. Esta información contribuirá a una mejor administración del recurso dentro de su pesquería, alertando sobre posibles escenarios de riesgo al recurso, y al desarrollo de su acuicultura.

## II. OBJETIVOS

### General

Evaluar el nivel de variación, diferenciación y la estructura genética del ostión de roca *S. prismatica* en el Pacífico oriental tropical con marcadores moleculares.

### Particulares

- I. Investigar la transferibilidad a *S. prismatica* de marcadores SSR y EST-SSR desarrollados en especies de ostión de la familia Ostreidae.
- II. Identificar marcadores ISSR en *S. prismatica*
- III. Determinar la diversidad genética por localidad de *S. prismatica* con los marcadores ISSR.
- IV. Determinar los índices de diferenciación y flujo genético entre localidades de *S. prismatica* con los marcadores ISSR.
- V. Conocer la estructura genética poblacional de *S. prismática* con marcadores ISSR.
- VI. Evaluar la correlación entre distancias genéticas y distancias geográficas de *S. prismatica*.

## III. ÁREA DE ESTUDIO

La Comisión de Cooperación Ambiental de América del Norte realizó un esfuerzo para definir regiones ecológicas marinas en las aguas aledañas al subcontinente norteamericano (Wilkinson *et al.*, 2009). Las ecorregiones definidas son el resultado del esfuerzo de procesos de consulta con expertos y cuenta con tres niveles. En el presente trabajo se enfoca al nivel I, que incluye diferencias entre los ecosistemas marinos que ocurren a escala de las cuencas oceánicas, entre las que destacan la temperatura y la circulación de las grandes corrientes y masas de agua marina (Lara-Lara *et al.*, 2008) (Figura I). Dentro de este nivel, los individuos de *S. prismatica* seleccionadas para el presente estudio se ubican en tres ecorregiones: Golfo de California, Pacífico transicional y Pacífico centroamericano (Figura I, Cuadro I).

### 3.1. Golfo de California

Esta ecorregión está definida por ser un mar parcialmente cerrado. Cuenta con una longitud de 1, 000 km, 150 km de ancho, con superficie de 265, 894 km<sup>2</sup>, con una temperatura entre los 12 y 21 °C en invierno y de 28 a 31°C en verano. En general, se presentan surgencias en la costa este durante el invierno y la primavera, y en la costa oeste durante el verano, aunque todo el año pueden formarse remolinos de gran tamaño y complejidad. Hay presencia de lagunas costeras, sistemas deltáicos, manglares, lechos de pasto marino, playas rocosas, playas arenosas, abundantes arrecifes rocosos y algunos de coral, mantos de rodolitos y ventilas hidrotermales (Wilkinson *et al.*, 2009).

Se seleccionaron tres localidades para esta ecorregión: i) Mazatlán (Mz), una localidad al norte de la zona urbana y turística del Puerto de Mazatlán, Sinaloa, México; ii) Tizate (Ti), ubicada al interior de la bahía de Banderas, hacia la parte norte, en Nayarit, México; y iii) Quimixto (Qm), al interior de bahía de Banderas, hacia la parte sur, en Jalisco, México. Las localidades del ostión de roca de Ti y Qm, presentan características geomorfológicas y oceanográficas ligeramente distintas entre ellas, la parte norte de bahía Banderas es somera con fondo de arena-roca y pendiente suave, incrementándose hacia la parte media de la bahía de norte a sur, que obstaculiza el libre intercambio de masas de agua entre la parte noroeste de este cuerpo de agua y el mar abierto (Plata y Filonov, 2007), y la parte sur, presenta características oceanográficas de aguas abiertas, debido a la profundidad de más de 1000 m y acantilados profundos.

### 3.2. Pacífico Transicional Mexicano

Ecorregión definida por la influencia invernal del extremo sur de la corriente de California. Cuenta con una superficie de 1,038,010 km<sup>2</sup>. Su límite septentrional coincide en general con el sitio donde esta corriente vira hacia el oeste en verano, dejando la región bajo la influencia de la cálida corriente costera de Costa Rica. La temperatura oscila entre 25 y 28 °C en invierno y un promedio de 29 °C en verano. Se presenta la contracorriente ecuatorial del norte, corriente costera de Costa Rica y la de California. Hay presencia de costas rocosas, costas arenosas, lagunas costeras, estuarios, sistemas deltaicos pequeños, parches arrecifales y manglares, comunidades del mar profundo (Wilkinson *et al.*, 2009).

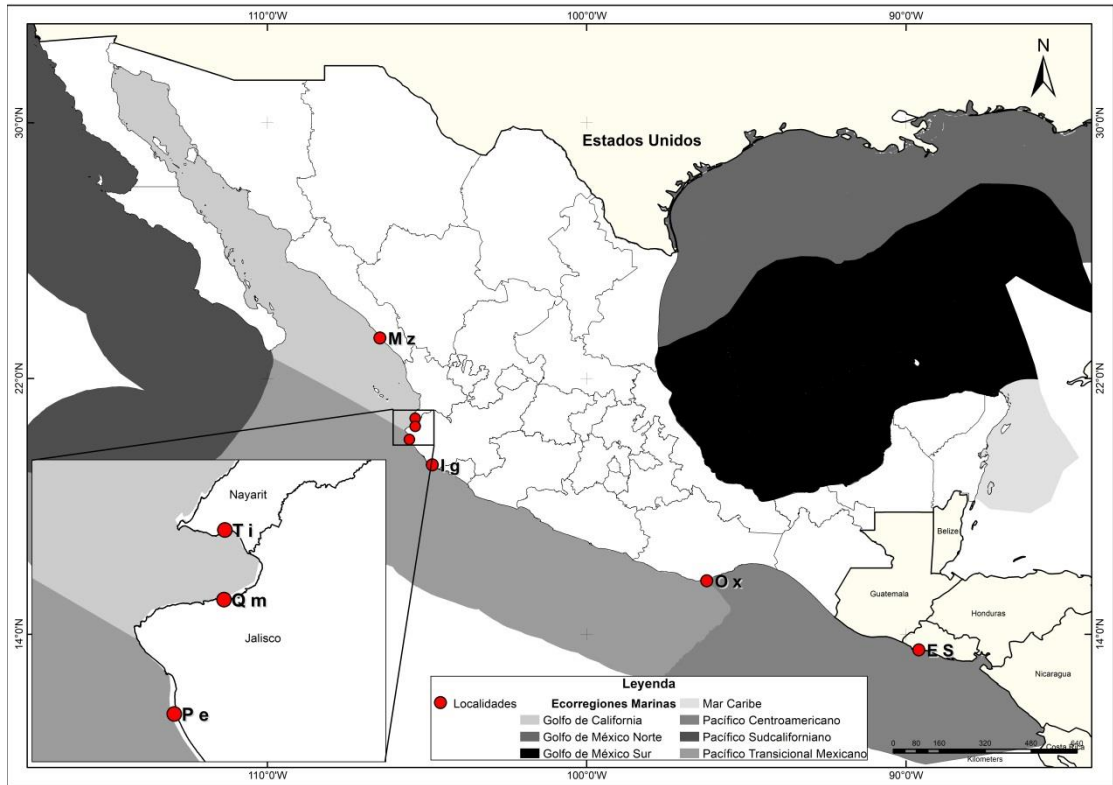
Para esta ecorregión se seleccionaron dos localidades pesqueras: i) la localidad de Punta Peñitas (Pe), ubicada al sur de la zona conocida como Cabo Corrientes, Jalisco, México, con una alta exposición al oleaje y límite a la transición con el Golfo de California; ii) la localidad de Boca de Iguanas (Ig), al interior de la bahía de Tenacatita,

Jalisco. A partir de la zona de Cabo Corrientes y hacia el sur, la distribución térmica se incrementa 0.05° C por cada 10 km de línea de costa hasta Lázaro Cárdenas, Michoacán, México (Gallegos *et al.*, 2006). El área donde se ubica Pe presenta una temperatura superficial del mar (TSM) templada y hacia Boca de Iguanas ligeramente más cálida (Gallegos *et al.*, 2006).

### 3.3. Pacífico Centroamericano

Esta ecorregión se considera un mar tropical durante todo el año, puesto que el extremo sur de la corriente de California prácticamente no ejerce ninguna influencia en ella durante el invierno. La temperatura oscila entre 26-27 °C en invierno y de 29.5 °C en verano. Se presenta la contracorriente ecuatorial del norte y la corriente costera de Costa Rica, hay presencia de lagunas costeras, manglares, playas arenosas y comunidades de bentos (Wilkinson *et al.*, 2009).

Se seleccionaron dos localidades para esta ecorregión: i) Puerto Ángel, Oaxaca, México (Ox) y Mizata, en el departamento de La Libertad, en El Salvador (ES). Aunque ambas localidades pueden considerarse tropicales, entre ellas existe una gran distancia geográfica lineal ( $\approx 670$  km), que podría constituir una barrera geográfica para el flujo de larvas entre estas dos localidades, puesto que el tramo de costa que se extiende entre Salina Cruz y la Laguna del Mar Muerto (Golfo de Tehuantepec) presenta una fisonomía de barreras arenosas que propician el establecimiento de lagunas costeras muy amplias (Ortiz-Pérez y De la Lanza-Espino, 2005).



**Figura I.** Localidades de muestreo de *Striostrea prismatica* para el análisis genético.

#### IV. TRABAJO DE CAMPO

La colecta de organismos de *S. prismatica* se obtuvo con el apoyo de pescadores de cada localidad visitada en el Pacífico oriental tropical, y de colectas prospectivas, como fue el caso de la localidad de Mizata, en El Salvador, con el apoyo del Dr. José Enrique Barraza Sandoval y el proyecto de investigación “Evaluación de los recursos zoológicos acuáticos de El Salvador” y permiso de colecta de organismos acuáticos MARN-DEV-GVS-006-2017 (Cuadro I). De cada organismo se obtuvieron aproximadamente cuatro gramos de tejido del músculo aductor, conservado en etanol al 95% en un vial de dos ml de capacidad. La identidad de los ejemplares del ostión de roca fue corroborada bajo los criterios morfológicos externos e internos de ambas valvas y el uso de las guías de identificación de Keen (1971), Ficher *et al.* (1995) y Coan y Valentich-Scott (2012).

**Cuadro I.** Localidades seleccionadas para el análisis de la diversidad y estructura genética del ostión de roca, *Striostrea prismatica* en el Pacífico oriental tropical.

Localidad	Código	N	Latitud (N)	Longitud (W)	Ecorregión marina
Mazatlán, Sin.	Mz	19	23°16'1.74"	106°28'19.67"	Golfo de California
Tizate, Nay.	Ti	18	20°45'25.46"	105°22'1.57"	Golfo de California
Quimixto, Jal.	Qm	21	20°30'20.59"	105°22'12.94"	Golfo de California
Las Peñitas, Jal.	Pe	17	20° 5'34.92"	105°33'0.25"	Pacífico transicional mexicano
Boca de Iguanas, Jal.	Ig	22	19°17'58.68"	104°49'57.37"	Pacífico transicional mexicano
Puerto Ángel, Oax.	Ox	19	15°40'24.11"	96°14'13.94"	Pacífico centroamericano
Mizata, El Salvador	ES	10	13° 30' 38.8"	89° 35' 55.9"	Pacífico centroamericano

N: número de individuos

## V. **Capítulo I. Transferibilidad a *Striostrea prismatica* de marcadores SSR y EST-SSR desarrollados en especies de la familia Ostreidae.**

### 1. INTRODUCCIÓN

El ostión de roca *Striostrea prismatica* (Gray, 1825), es un molusco bivalvo (Bivalvia: Ostreidae) que se distribuye desde La Paz, Baja California (México) hasta Mancora, Tumbes (Perú) (Poutiers, 1995) sobre el intermareal rocoso (Fournier, 1992; Coan y Valentich-Scott, 2012). Cumple un rol importante en su ecosistema y representa además un recurso de importancia comercial. La sobreexplotación, el cambio climático, la degradación del hábitat y la contaminación representan una gran amenaza para los recursos pesqueros. Una disminución en el tamaño poblacional puede conducir a una pérdida de la variación genética debido a la deriva génica y endogamia (Zhang *et al.*, 2004). Por lo tanto, es fundamental analizar la variación y la estructura genética de *S. prismatica* para llevar a cabo una mejor administración del recurso dentro de su pesquería y su potencial cultivo.

Debido a su naturaleza codominante y su alto polimorfismo, las repeticiones de secuencia simple (SSR o microsatélites) son de los marcadores genéticos más idóneos para llevar a cabo estudios de genética de poblaciones. La variación de los SSR se manifiesta como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus (Ellegren, 2004). Los alelos difieren entre sí en el número de repeticiones simples. Además, en los últimos años se han desarrollado microsatélites de secuencias que se expresan (EST-SSR). Los EST-SSR son valiosos para estudios de adaptación local, estructura poblacional, programas de selección de reproductores, parentescos y mapeo genómico (Yu y Li, 2007).

Una alta conservación de las regiones flanqueantes de loci SSR y EST-SSR en el genoma, permiten la amplificación cruzada de estos marcadores entre especies del mismo género en especial en vertebrados, como peces, reptiles y mamíferos (Rico *et al.*, 1996; Peakall *et al.*, 1998). La amplificación cruzada con iniciadores ya desarrollados en especies cercanas es más económica y consume menos tiempo y recursos que el desarrollo y caracterización de nuevos iniciadores específicos (Selkoe *et al.*, 2006). En general, los EST-SSR son más transferibles que los SSR y existen reportes de éxito aún a nivel de familia entre géneros cercanos (Gupta *et al.*, 2003).

Se han realizado numerosos trabajos de desarrollo y caracterización de marcadores SSR en moluscos bivalvos, de estos destacan los del género *Crassostrea* (Li *et al.*, 2003;



Hedgecock *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010) dado que el ostión del Pacífico *Crassostrea gigas* es una de las especies más cultivadas a nivel mundial (Li *et al.*, 2003). Se cuenta además con marcadores SSR en ostiones de los géneros *Ostrea* (Stick *et al.*, 2009; Leighton, 2015) y *Saccostrea* (Banks *et al.*, 2006). Los marcadores EST-SSR también han sido utilizados en este grupo de moluscos bivalvos (Wang *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2012; Kong *et al.*, 2014). Hasta ahora no se cuenta con marcadores SSR y EST-SSR específicos de *Striostrea*. En algunos de los trabajos señalados se han realizado pruebas de amplificación cruzada, sin embargo, los análisis se restringen al mismo género taxonómico de la especie objetivo con la que se desarrollaron los marcadores.

Respecto a la transferibilidad de marcadores SSR entre especies cercanas, es importante precisar que *S. prismatica* ha sido objeto de debate en su clasificación, pues ha experimentado múltiples cambios de nombre e inclusiones en diferentes géneros taxonómicos (*Ostrea*, *Crassostrea* y *Striostrea*). Aunque los ostiones, por su importancia económica, se encuentran entre los bivalvos marinos mejor estudiados (Salvi *et al.*, 2014), la sistemática y taxonomía han sido controvertidas; sin embargo, estudios moleculares recientes con ADNmt y ADNn han proporcionado información determinante (Mazón-Suástegui *et al.*, 2016; Raith *et al.*, 2016; Salvi y Mariottini, 2016).

Con el fin de evitar la sobreexplotación de poblaciones pequeñas y vulnerables y contribuir a determinar la situación de riesgo de este recurso, como ha ocurrido en México con otros moluscos bivalvos y gasterópodos (en Melchor-Aragón *et al.*, 1996), es necesario generar información sobre la genética de poblaciones de *S. prismática*. En ese sentido, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la transferibilidad cruzada a *S. prismatica* de marcadores SSR y EST-SSR desarrollados en especies de ostión filogenéticamente cercanas de acuerdo a los últimos estudios, con el fin de llevar a cabo estudios de genética poblacional.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Muestras y extracción de ADN

Las localidades seleccionadas para el presente estudio se ubicaron en Mazatlán, (Sin), Tizate (Nay), Químixto, Las Peñitas y Boca de Iguanas (Jal), Puerto Ángel (Oax) y Mizata (El Salvador) (Tabla I; Introducción general). La colecta de organismos de *S. prismatica* se obtuvo con el apoyo de pescadores de cada localidad visitada en el Pacífico oriental tropical. De cada organismo se obtuvieron aproximadamente cuatro gramos de tejido del músculo aductor, conservado en etanol al 95% en un vial de dos ml de capacidad. La identidad de los ejemplares del ostión de roca fue corroborada bajo los criterios morfológicos externos e internos de ambas valvas y el uso de las guías de identificación de Keen (1971), Ficher *et al.* (1995), y Coan y Valentich-Scott (2012).

### 2.2. Selección de marcadores SSR y EST-SSR

Se seleccionaron marcadores SSR y EST-SSR desarrollados para otras especies de la familia Ostreoidae filogenéticamente cercanas a *S. prismatica* (*Ostrea chilensis*, *Saccostrea glomerata* y *Crassostrea gigas*) de acuerdo con la literatura (Yu *et al.*, 2003; López-Flores *et al.*, 2004; Klibunga *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2006; Reece *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008; Salvi *et al.*, 2014; Mazón-Suástegui *et al.*, 2016; Raith *et al.*, 2016; Salvi y Mariottini, 2016). Las características de estos marcadores se presentan en el Cuadro 1.

### 2.3. Pruebas de amplificación por PCR

Se siguieron las condiciones de la PCR de Leighton (2015) para amplificar los marcadores SSR Oco013.1 y Oco076.1 de *O. chilensis*, las condiciones de Banks *et al.* (2006) para SSR Sgo9 y Sgo30 de *Saccostrea glomerata*, las de Wang *et al.* (2008b) y las de Qiu *et al.* (2009) para EST-SSR CgE119, CgE207, C1, C2 y C7 de *C. gigas*, respectivamente. Por marcador, se analizaron entre seis y diez individuos tomados al azar de las localidades muestreadas. Además, se utilizaron tres individuos de *C. gigas* como controles positivos de amplificación, estos últimos colectados en una granja de producción en Guaymas, Sonora. Las pruebas de amplificación se realizaron en un termociclador de gradiente de 96 pozos de la marca BioRad (T-100). Los programas de amplificación empleados fueron los reportados en la literatura señalada. Los productos de la amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 1.8%, el tiempo de la electroforesis se basó en las características

de los patrones de amplificación. Los geles se tiñeron por inmersión en una solución de 0.2 µg/µL de Bromuro de Etidio por 20 min, posteriormente se visualizaron bajo luz ultravioleta (302 nm) en un transiluminador UVP y se registraron con el programa de fotodocumentación EDAS 3.5 (Kodak).

Además de llevar a cabo la amplificación i) con las condiciones descritas en las referencias originales (Leighton, 2015; Banks *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008b; Qiu *et al.*, 2009) [y estas mismas sometidas a curvas de concentración de ADN, de 20 ng/µL hasta 100 ng/µL, y de MgCl<sub>2</sub> a 2 y 2.5 mM], se realizaron las modificaciones descritas en el Cuadro 1: ii) gradientes de temperatura y iii) método PCR-Towchdown. Se descartaron marcadores que no reprodujeron bandas en *i*.

**Cuadro 1.** Marcadores microsatélites SSR y EST-SSR seleccionados para el análisis de la transferibilidad en el ostión de roca *Striostrea prismatica*.

Especie	Marcador	Repeticiones motivo	Na (tamaño pb)	Secuencia 5'-3'	Amplificación	Cita
<i>Ostrea chilensis</i>	SSR-Oc013.1	(ATCT) <sub>6</sub>	4 (104-124)	F: TTGGAATATTCGGCATTGTG R: TCCAGAAAAGAAAGACTGAATG	+	(Leighton, 2015)
<i>Ostrea chilensis</i>	SSR-Oc076.1	(TA) <sub>12</sub>	4 (222-241)	F: CACTGAGCTAAGGGGTAAATCC R: AGCCGAATCACTATGTGCC	+	(Leighton, 2015)
<i>Saccostrea glomerata</i>	SSR-Sgo9	(CA) <sub>7</sub>	5(302-328)	F: CCTGGAATGGAATGGACTTC R: TTCCTCAATGGCTCCAAAAC	+	(Banks <i>et al.</i> , 2006)
<i>Saccostrea glomerata</i>	SSR-Sgo30	(GA) <sub>8</sub>	6(177-201)	F: AAGCTCACTTGAGCCTTCG R: CTGCAATGTGCATGTTGAG	+	(Banks <i>et al.</i> , 2006)
<i>Crassostrea gigas</i>	EST-SSR-CgE119	(AGA) <sub>5</sub>	3 (278-325)	F: GAGGCAAGATCAAAGTAGAAA R: ATGCCCAATCACAAAGACA	-	(Wang <i>et al.</i> , 2008b)
<i>Crassostrea gigas</i>	EST-SSR-CgE207	(TA) <sub>6</sub>	4 (170-232)	F: ATCTGAAAT AACGGAAGC R: AATTAGGAAAGGAAACC	-	(Wang <i>et al.</i> , 2008b)
<i>Crassostrea gigas</i>	EST-SSR-C1	(ATT) <sub>6</sub>	5 (228-246)	F: GGT CATTCATGATGAGCAGTG R: GAACACAAGGTGCCGTGATA	+	(Qiu <i>et al.</i> , 2009)
<i>Crassostrea gigas</i>	EST-SSR-C2	(GCC) <sub>7</sub>	5 (190-208)	F: GCACATATTCACCACGAACG R: TCTGGGTTTGACAGGGGTAG	-	(Qiu <i>et al.</i> , 2009)
<i>Crassostrea gigas</i>	EST-SSR-C3	(ATA) <sub>5</sub>	4 (155-167)	F: TTGGAGACCAAGCCGTAATA R: TCAACTGATCCCAAGTGCTC	-	(Qiu <i>et al.</i> , 2009)
<i>Crassostrea gigas</i>	EST-SSR-C7	(ACC) <sub>5</sub>	3 (165-185)	F: GGACCCCCACCTTACTATGC R: GTGTCCGAACCCGAAACCA	+	(Wang <i>et al.</i> , 2008b)

Na: número de alelos

\* (-/+) ausencia o presencia de productos inespecíficos.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a su alta tasa de mutación, los SSR son marcadores moleculares muy polimórficos y por lo tanto son útiles para análisis de genética poblacional y filogenia (Estoup y Angers, 1998). La alta conservación de las regiones flanqueantes de estos marcadores facilita la amplificación cruzada, entre taxones cercanos pertenecientes al mismo género (SSR) o inclusive a géneros separados recientemente (EST-SSR) (Scribner y Pearce, 2000; Li *et al.*, 2009).

Las pruebas de transferibilidad del presente trabajo, con marcadores SSR y EST-SSR, se realizaron con las condiciones específicas de PCR que indica la literatura (Leighton, 2015; Banks *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008b; Qiu *et al.*, 2009). Los marcadores que no produjeron productos de PCR con las condiciones “i” fueron descartados. Se observó amplificación positiva en los marcadores SSR Oc013.1, Oc076.1, Sgo9, Sgo30, EST-SSR-C1 y EST-SSR-C7 (Cuadro 1, Figura 1: i, ii, iii y iv). Con el objetivo de mejorar la especificidad de la amplificación con estos marcadores se realizaron gradientes de temperatura y modificación de la concentración de reactivos de la PCR (no mostrado en materiales y métodos). Sin embargo, estas pruebas no fueron concluyentes.

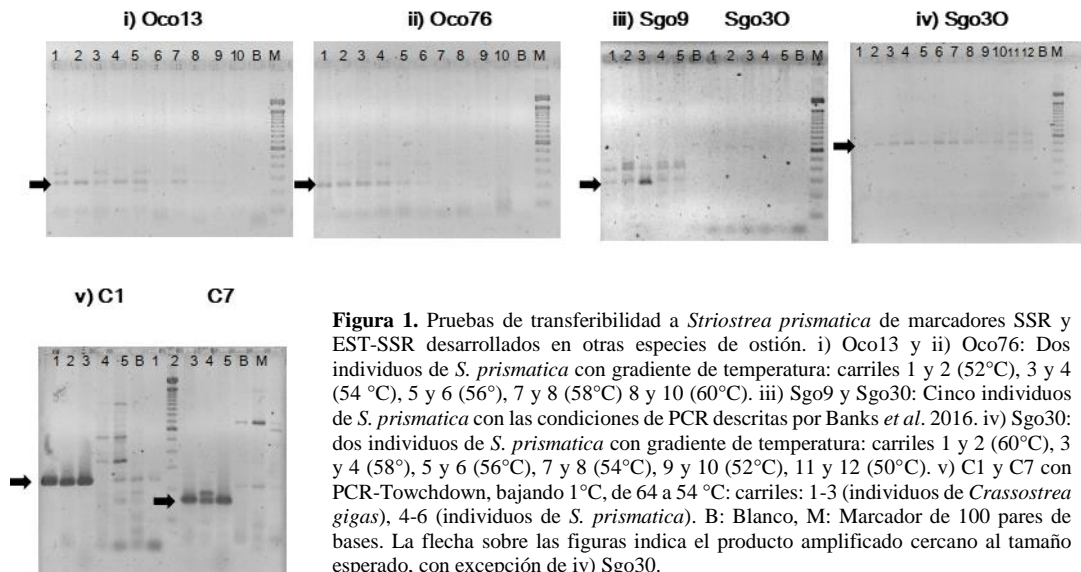
Además, se intentó optimizar la PCR empleando el método Touchdown (TD-PCR), para resolver la dificultad de la amplificación del ADN por PCR. El método TD-PCR aumenta la especificidad, la sensibilidad y el rendimiento, sin la necesidad de largas estandarizaciones y/o el rediseño de iniciadores (Korbie y Mattick, 2008). El TD-PCR emplea una temperatura de hibridación inicial superior a la temperatura de fusión proyectada ( $T_m$ ) de los iniciadores que se utilizan, luego pasa progresivamente a una temperatura más baja y más permisiva a lo largo de ciclos sucesivos. Pese a las ventajas técnicas que ofrece la TD-PCR, las pruebas de transferibilidad del presente trabajo, con iniciadores diseñados para otras especies de ostión resultaron en la ausencia de productos de PCR del tamaño esperado, amplificación de bandas inespecíficas o poca reproducibilidad del producto esperado (p. ej. Figura 2 iv)

Los resultados de amplificación de los EST-SSR C1 y C7 de *C. gigas* muestran bandas inespecíficas que no coinciden con el tamaño de los fragmentos esperados. La amplificación positiva podría deberse a que los EST-SSR poseen sitios de empalme más conservados que los SSR, ya que provienen de regiones codificantes (Zhan *et al.*, 2005). Se puede inferir que los iniciadores sí se están uniendo a diferentes sitios del genoma de *S. prismatica*, pero la complementariedad de las bases es parcial. Se han reportado resultados exitosos con la amplificación cruzada de marcadores EST-SSRs en especies

de plantas y peces con distancias taxonómicas relativamente grandes, por ej. especies de géneros diferentes de la misma familia (Ellis y Burke, 2007). En el caso de los ostiones solo se ha trabajado con especies del mismo género, con algunos resultados positivos (e.g. Cruz *et al.*, 2007 y Li *et al.*, 2010). El presente trabajo es el primer reporte de pruebas de amplificación cruzada con una especie que no pertenece al mismo género en la familia Ostreidae Rafinesque, 1815.

Se obtuvo amplificación positiva en *C. gigas* con el marcador Sgo9 de *S. glomerata*. Los marcadores SSR de *Ostrea* y *Saccostrea*, a excepción del marcador Sgo30, produjeron al menos una banda en *S. prismatica* de un tamaño similar o cercano al esperado (Figura 1), sin embargo, la resolución en un gel de poliacrilamida al 6% reveló bandas inespecíficas que dificultaban el genotipado (resultados no mostrados), además, las bandas del tamaño esperado resultaron monomórficas. La amplificación positiva observada con estos últimos marcadores podría deberse a una mayor similitud entre las regiones flanqueantes de los SSR de *S. prismatica* con los de *Ostrea* y *Saccostrea*. Sin embargo, es importante señalar que no se descarta la posibilidad de que los amplificadas sean falsos positivos (inespecíficos) dado que al no contar con genoma de *O. chilensis* y/o *S. palmula* no se incluyeron controles positivos en las pruebas de amplificación cruzada. Además de los problemas con la especificidad, los resultados no fueron reproducibles.

En general, la eficiencia de la amplificación cruzada entre las especies de familia Ostreidae de este estudio fue pobre. Estos resultados son similares a los trabajos de amplificación cruzada de SSR desarrollados para la almeja *Nodipecten subnodosus*, donde la amplificación fue poca o nula en especies de diferente género, sin embargo, se observó un porcentaje importante de loci amplificadas en especies del mismo género (Ibarra *et al.*, 2006; Petersen *et al.*, 2009). La poca eficiencia de las pruebas de transferibilidad de los marcadores microsatélites entre especies de diferente género en este grupo de organismos, permite suponer un alto polimorfismo en los sitios de unión de los iniciadores (Hedgecock *et al.*, 2004).



**Figura 1.** Pruebas de transferibilidad a *Striostrea prismatica* de marcadores SSR y EST-SSR desarrollados en otras especies de ostión. i) Oco13 y ii) Oco76: Dos individuos de *S. prismatica* con gradiente de temperatura: carriles 1 y 2 (52°C), 3 y 4 (54 °C), 5 y 6 (56°), 7 y 8 (58°C) 8 y 10 (60°C). iii) Sgo9 y Sgo30: Cinco individuos de *S. prismatica* con las condiciones de PCR descritas por Banks *et al.* 2016. iv) Sgo30: dos individuos de *S. prismatica* con gradiente de temperatura: carriles 1 y 2 (60°C), 3 y 4 (58°), 5 y 6 (56°C), 7 y 8 (54°C), 9 y 10 (52°C), 11 y 12 (50°C). v) C1 y C7 con PCR-Towchdown, bajando 1°C, de 64 a 54 °C: carriles: 1-3 (individuos de *Crassostrea gigas*), 4-6 (individuos de *S. prismatica*). B: Blanco, M: Marcador de 100 pares de bases. La flecha sobre las figuras indica el producto amplificado cercano al tamaño esperado, con excepción de iv) Sgo30.

Chapuis y Estoup (2006) argumentan que las regiones flanqueantes de los microsatélites pueden ser más inestables de lo que la literatura ha presentado, una alta variación en estas regiones se ha relacionado con la presencia de alelos nulos en un gran rango de taxas, entre los ejemplos se incluyen moluscos bivalvos como el ostión americano (*C. virginica*), el del pacífico (*C. gigas*) y la almeja pato (*Tagelus dombeii*) (ver referencias en Hedgecock *et al.*, 2004). Se ha demostrado, además, que la frecuencia de alelos nulos en una especie congénérica aumenta rápidamente al aumentar la distancia filogenética de una especie focal (ej. en ostiones del género *Crassostrea*; Li *et al.*, 2003). Los resultados de transferibilidad cruzada con especies de la familia Ostreidae constituyen una prueba indirecta de lo anteriormente mencionado.

Los marcadores desarrollados en otras especies de ostiones para las pruebas de transferibilidad a *S. prismatica* fueron seleccionados con base a una alta conservación de las regiones flanqueantes de los SSR entre taxas cercanos (Scribner y Pearce, 2000; Li *et al.*, 2009). Bajo esa hipótesis, el resultado esperado en este trabajo sería la amplificación cruzada de los loci SSR y EST-SSR, tal como ha funcionado en especies del mismo género, incluso de diferentes familias (Rico *et al.*, 1996; Peakall *et al.*, 1998). Sin embargo, es necesario precisar que *S. prismatica* ha sido objeto de debate en su clasificación taxonómica, pues ha experimentado múltiples cambios de nombre (*Striostrea prismatica* Gray, 1825, *Crassostrea iridescens* Hanley, 1854; *Ostrea iridescens* Hanley, 1854, *Ostrea lucasiana* Rochebrune, 1895; *Ostrea panamensis* Carpenter, 1864; *Ostrea prismatica* J.E. Gray, 1825 (combinación original); *Ostrea rufa* Lamarck, 1819; *Ostrea spathulata* G. B. Sowerby II, 1871; *Ostrea turturina* Rochebrune, 1895).

En cuanto a las relaciones filogenéticas de *Striostrea* con la familia Ostreidae en principio, Harry (1985) construyó la tribu Striostreini para los géneros *Striostrea* y *Saccostrea*. Ambos géneros presentan una comata prominente (Coan y Valentich-Scott, 2012). Sin embargo, el trabajo con las secuencias mitocondriales 16S y COI de Raith *et al.* (2016) y de Salvi y Mariottini (2016), no apoyan una base filogenética para tal agrupación, pues todos sus análisis revelaron que *S. prismatica* es muy divergente del resto de las muestras de Ostreidae que utilizaron en sus estudios. Ambos trabajos sostienen que el género *Striostrea* está claramente separado de los géneros *Ostrea*, *Saccostrea* y *Crassostrea*, por lo que Raith *et al.* (2016) proponen a Striostreinae como una nueva subfamilia que incluya solo al género *Striostrea*.

Los resultados de las pruebas de transferibilidad del presente trabajo revelan que las regiones flanqueantes de los SSR y EST-SSRs en *S. prismatica* no complementan totalmente con las secuencias de los iniciadores de *Ostrea*, *Saccostrea* y *Crassostrea*. A pesar de que *S. prismatica* ha sido colocada en estos géneros, los recientes trabajos de filogenia molecular explicarían los resultados obtenidos. Es probable que durante el proceso evolutivo de los ostreidos hayan ocurrido mutaciones puntuales significativas en estas regiones que no permitieron la amplificación cruzada a *S. prismatica*.

#### **4. CONCLUSIONES**

Los resultados del presente trabajo indican nula o poca amplificación en *S. prismatica* de SSR y EST-SSR desarrollados en especies de otros géneros de la familia Ostreoidae. Para futuros estudios de genética de poblaciones con microsatélites, será necesario realizar una librería genómica de *S. prismatica* para identificar marcadores propios de la especie. Además, se sugiere ampliar y reevaluar el estudio sobre las relaciones filogenéticas de las especies comerciales de la familia Ostreoidea Rafinesque, 1815, que incluya al ostión de roca *S. prismatica*, puesto que los recientes trabajos de sistemática molecular son aún inconclusos.



## **VI. Capítulo II. Diversidad y estructura genética del ostión de roca *Striostrea prismatica* Gray, 1825 (Bivalvia: Ostreidae) en el Pacífico oriental tropical inferidas con ISSR.**

### **1. INTRODUCCIÓN**

El ostión de roca *Striostrea prismatica* (Gray, 1825), es un molusco bivalvo (Bivalvia: Ostreidae) que se distribuye desde La Paz, Baja California (México) hasta Mancora, Tumbes (Perú) (Poutiers, 1995). Se le encuentra sobre el intermareal rocoso y en sustratos submareales someros a siete metros de profundidad (Fournier, 1992; Coan y Valentich-Scott, 2012), se alimenta principalmente de microalgas y detritos suspendidos en el agua, filtrando las impurezas del agua. La gametogénesis ocurre de manera continua durante todo el año, la madurez inicia durante la época seca y el desove durante los primeros días de la época de lluvias (Fournier, 1992), con una larga esperanza de vida larval de tipo pelágica. *S. prismatica* cumple un papel muy importante en sus ecosistemas nativos y representa un recurso pesquero de importancia alimenticia, además de una alternativa de fuente de ingresos para los pescadores artesanales de las comunidades costeras (Melchor *et al.*, 1996).

La pesquería de moluscos bivalvos es una de las de mayor importancia a nivel mundial, los principales países productores de ostión son China, Corea, Japón, EUA, Francia y México (SAGARPA, 2011). En México, la captura de especies de ostión, incluido *S. prismatica*, ocupa el sexto lugar en esta producción (SAGARPA, 2011). A partir de 1988 el gobierno estableció veda para la pesca de *S. prismatica* en el Pacífico mexicano, en el periodo que va del 1° de julio al 31 de agosto, con el fin de proteger a la especie durante la temporada más intensa de reproducción biológica y desove (DOF, 1988).

La sobreexplotación de los recursos marinos, el cambio climático, la degradación del hábitat y la contaminación representan una gran amenaza para la biodiversidad de especies marinas. La sobrepesca en particular ha causado una fuerte reducción de algunas especies de bivalvos, tal es el caso de la almeja gigante (*Tridacna gigas*) (en Hazel *et al.*, 2010) y la ostra chilena (*Ostrea chilensis*) en Sudamérica (Toro y González, 2009). Una disminución en el tamaño poblacional puede conducir a una pérdida de la variación genética debido a la deriva génica (Zhang *et al.*, 2004). En términos pesqueros, es muy importante determinar la extensión de un stock pesquero dentro de un rango geográfico, ya que es necesario definir si la extracción de organismos en una localidad afectará a los

organismos existentes en otras áreas (Rivera-Apodaca, 2009). En el caso de especies comerciales, el conocimiento del acervo genético y de la distribución de la diversidad genética de una especie a lo largo de su rango de distribución, son factores importantes que permiten realizar un manejo adecuado de los stocks, con el fin de evitar pérdida de la diversidad y cambios en su estructura genética poblacional (Pérez-Enríquez *et al.*, 2008). En ese sentido, el análisis genético puede contribuir a una mejor administración del recurso dentro de su pesquería y su cultivo, evitando que su relativa vulnerabilidad lo coloque en una situación de riesgo, como ha ocurrido en México con otros moluscos bivalvos y gasterópodos, tales como el callo de hacha, la lapa y el abulón (en Melchor *et al.*, 1996).

Con base en lo anterior, De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero (1988) estudiaron la variabilidad genética en el ostión americano *Crassostrea virginica* y propusieron el diseño de programas de hibridación para la generación de un reservorio genético de las localidades pesqueras estudiadas. Más tarde, los mismos autores (1989) encontraron una reducción en la variabilidad genética, y proponen la conservación de tamaños de población adecuados. Por su parte, Toro y González (2009) encontraron una alta diversidad genética en la ostra chilena (*Ostrea chilensis*), después de un repoblamiento en los bancos naturales debido a fuertes disminuciones por la sobrepesca. Es importante precisar que la diversidad y la estructura genética de esta especie, así como de otras especies comerciales, no depende exclusivamente de su estrategia reproductiva, sino que existen otros factores oceanográficos y antropogénicos que probablemente estarían influenciando la conformación genética de las poblaciones en estudio (Toro y González, 2009).

En las especies marinas, como en ostiones, que presentan una vida larval pelágica, se espera que las poblaciones se comporten como una gran población panmíctica (Arnaud, 2000), contrario a las especies de ostiones con estadios larvales que carecen de un estilo pelágico (aplánicas) y aquellas con una esperanza de vida larval corta (anquioplánicas) y por lo tanto con un potencial limitado para dispersarse (Casu *et al.*, 2005). La ausencia de fuertes barreras geográficas en el medio oceánico podría favorecer el flujo genético entre localidades aledañas. Sin embargo, factores como la temperatura, salinidad y las corrientes marinas pueden actuar como barreras oceanográficas que pueden influir en la estructura genética poblacional (Reeb y Avise, 1990).

Estudios con diferentes marcadores moleculares en moluscos marinos han detectado estructura genética, en la ostra plana europea, *Ostrea edulis* (Launey *et al.*, 2002), en la

almeja amatista, *Gemma Gemma* (Casu *et al.*, 2005), en el ostión *C. virginica* (Galindo-Sánchez *et al.*, 2008) y en el gasterópodo *Nacella magallanica* (De Aranzamendi *et al.*, 2014), entre otros. A pesar del potencial de dispersión de algunas especies en su etapa larvaria, la diferenciación genética en estos estudios se atribuye a probables presiones selectivas por diferencias en el hábitat (Pérez-Enríquez *et al.*, 2008) y algunos suponen que la reducción poblacional por la alteración del hábitat también puede contribuir a la diferenciación por deriva génica (Galindo-Sánchez *et al.*, 2008). Así mismo, algunos trabajos han mencionado que el grado de diferenciación no se encuentra relacionado con la proximidad geográfica. A este fenómeno se le conoce como "parche genético caótico" y es muy común en moluscos marinos (Johnson y Black, 1982, 1984; Buroker, 1983; David *et al.*, 1997; Michinina y Rebordinos, 1997).

Respecto a lo anterior, en un sentido técnico, una falta de estructura o una homogeneidad genética global podría deberse a la incapacidad de los marcadores genéticos utilizados para detectar una ligera diferenciación genética (Liu y Cordes, 2004). En ese sentido, el marcador dominante "Inter-Secuencias Simples Repetitivas" (ISSR) que analiza la variación que presentan las secuencias no repetitivas que se encuentran entre los microsátélites del genoma nuclear (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2000) ha sido utilizado con éxito en la evaluación de la diversidad y diferenciación genética poblacional en varias especies de bivalvos marinos (p. ej. Casu *et al.*, 2005, 2006; De Aranzamendi *et al.*, 2008, De Aranzamendi *et al.*, 2014). La amplificación por PCR de estas regiones usando un solo iniciador produce múltiples productos de amplificación altamente reproducibles, los ISSR son fáciles de utilizar, de bajo costo, y metodológicamente menos exigentes comparados con otros marcadores dominantes, por lo que son ideales para especies cuya información genética es escasa (Ng y Tan, 2015), como es el caso de *S. prismatica*.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar con marcadores ISSR, la diversidad y la estructura genética del ostión de roca, *S. prismatica* a lo largo del Pacífico oriental tropical.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Área de estudio y obtención de muestras

La ubicación geográfica de México y Centroamérica, entre las influencias oceánicas del Atlántico centro-occidental y del Pacífico centro-oriental, explica en gran medida su enorme diversidad biológica y ecosistémica (Lara-Lara *et al.*, 2008). La Comisión de Cooperación Ambiental de América del Norte definió en tres niveles las ecorregiones marinas en las aguas aledañas al subcontinente norteamericano (Wilkinson *et al.*, 2009). Las localidades muestreadas en el presente trabajo se ubican en el nivel I, el cual incluye diferencias entre los ecosistemas marinos que ocurren a escala de las cuencas oceánicas, entre las que destacan la temperatura y la circulación de las grandes corrientes y masas de agua marina (Lara-Lara *et al.*, 2008). Dentro de este nivel, las localidades seleccionadas (cuadro 1) para el presente estudio se ubican en la ecorregión del Golfo de California (Mazatlán, Sin; Tizate, Nay. al norte de la Bahía de Banderas y Químixto, Jal. al sur de la Bahía de Banderas), Pacífico transicional mexicano (Las Peñitas, Jal; Boca de Iguanas, Jal.) y el Pacífico centroamericano (Puerto Ángel, Oaxaca y Mizata, El Salvador (Figura I; Introducción).

Las muestras de organismos destinadas al análisis genético se obtuvieron de las capturas comerciales realizadas en cada una de las localidades pesqueras, se obtuvieron entre 10 y 22 organismos por localidad, y de cada organismo se obtuvo una pieza del músculo aductor para la extracción de ADN (Cuadro I; Introducción).

### 2.2. Extracción de ADN y amplificación PCR-ISSR

La extracción de ADN total de cada organismo se realizó usando un kit comercial (ZR Genomic DNA II Kit; ZYMO RESEARCH). Con un termociclador de 96 pozos (Bio-rad T100 Thermal Cycler) se amplificaron de tres a cinco muestras de ADN de ostión tomadas al azar de todas las localidades con 15 iniciadores ISSR, [(CT)<sub>8</sub>RG, (AG)<sub>8</sub>Y, (GA)<sub>8</sub>T, (GA)<sub>8</sub>YC, (GA)<sub>8</sub>C, (CT)<sub>8</sub>A, (GT)<sub>8</sub>C, (GA)<sub>8</sub>YA, (GA)<sub>8</sub>YG, (CT)<sub>8</sub>RA, (CA)<sub>8</sub>RT, (GT)<sub>8</sub>YA; (TC)<sub>8</sub>RT, (AC)<sub>8</sub> YG, las abreviaturas de una sola letra corresponden a una mezcla de bases: R = (A,G); Y= (C,T)]. Se seleccionaron aquellos iniciadores que produjeron los patrones de amplificación con el mayor número de fragmentos intensos y polimórficos, cada fragmento se considera un locus.

Con el fin de asegurar la reproducibilidad de los marcadores, se llevó a cabo la amplificación por duplicado del 5% de las muestras seleccionadas al azar de cada

localidad. Posteriormente se amplificaron por PCR los marcadores ISSR en la totalidad de las muestras de las localidades seleccionadas para el estudio. En general, para los ISSR, se siguieron las recomendaciones sugeridas por Ng y Tan (2015). La reacción de PCR consistió en un volumen de 15  $\mu$ L con amortiguador 1X,  $MgCl_2$  2.5 mM, dNTPS 0.2 mM, iniciador ISSR 1 pmol/ $\mu$ L, Taq polimerasa 0.6 U/ $\mu$ L, y ADN genómico (100 ng). La amplificación se realizó en un termociclador de gradiente de 96 pozos de la marca BioRad (T-100). El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min, seguido de 40 ciclos con una desnaturalización a 95°C durante 45 s, alineación durante 45 s, elongación a 72°C durante 2 min, y una elongación final a 72°C durante 10 min con una etapa final a 12°C. Se utilizó el mismo programa de amplificación para todos los iniciadores ISSR, solo se modificó la temperatura de alineación de acuerdo a las características de cada iniciador (Cuadro II). Los productos de la amplificación se resolvieron en geles horizontales al 2% de agarosa ultra pura y agarosa de bajo punto de fusión (LMP) en una proporción 2:1 a 100 V durante 2 h.

Los geles se tiñeron por inmersión en una solución con bromuro de etidio (0.2  $\mu$ g/mL) durante 20 min, posteriormente se visualizaron bajo luz ultravioleta (302 nm) en el transiluminador UVP y se registraron con el programa de foto documentación EDAS 3.5 (Kodak).

### 2.3 Análisis de datos

Los patrones de amplificación se analizaron visualmente. Se seleccionaron solo fragmentos claros y reproducibles. Los fragmentos se consideraron como un locus genético, asumiendo que los alelos de diferentes loci no comigran y que cada locus puede ser tratado como un sistema de dos alelos (Lynch y Milligan 1994). Se generaron matrices de datos binarios (presencias o ausencias de fragmentos) por localidad que se utilizaron para el análisis genético. Por cada iniciador ISSR, se calculó el contenido de información polimórfica (PIC) con la fórmula de Roldan-Ruiz *et al.* (2000):  $PIC_i = 2f_i(1-f_i)$ , donde  $f_i$  es la frecuencia relativa del alelo amplificado (banda presente), y  $(1-f_i)$  la frecuencia relativa del alelo nulo (banda ausente) del marcador  $i$ .

#### 2.3.1 Diversidad y diferenciación genética

Los análisis de diversidad y diferenciación genética se realizaron con los programas POPGENE v.3.2 (Yeh *et al.*, 1999) y TFPGA v.1.3 (Miller, 1997) y AFLP-SURV 1.0

(Vekemans, 2002). Con POPGENE v.3.2, se obtuvieron los índices de la diversidad genotípica: heterocigosidad de cada localidad (H), heterocigosidad total (Ht) e intrapoblacional (Hs). Se utilizó la corrección de Lynch y Milligan (1994) para reducir el sesgo estadístico que presentan los marcadores dominantes. También se calculó el índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972), que se considera un índice de diversidad fenotípica expresada en una comunidad. Los valores de I fueron comparados entre localidades con una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y un test de Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples.

Se calculó el índice de diferenciación  $G_{ST}$  (Nei, 1972) con POPGENE v.3.2. Este índice estima el nivel de diferenciación genética entre poblaciones a partir de la heterocigosidad que presentan las poblaciones. También se calculó el índice de fijación de Wright  $F_{ST}$  con AFLP-SURV 1.0 para obtener la diferenciación genética total de la especie y entre pares de localidades. El programa asume equilibrio de Hardy-Weinberg ( $F_{IS}=0$ ) y utiliza un método Bayesiano con una distribución previa no uniforme de las frecuencias alélicas (Zhivotovsky, 1999). La significancia se obtuvo con un procedimiento de permutaciones de 10,000 réplicas bajo la hipótesis nula de no diferenciación genética. Además, con el programa TFPGA v.1.3 (Miller, 1997) se realizó la prueba exacta de Fisher (Raymond y Rousset, 1995) para investigar diferencias significativas respecto a las frecuencias alélicas entre pares de localidades. Esta prueba se efectuó con simulaciones de Monte Carlo con cadenas Markov, con 1000 pasos de demorización.

A partir de la estimación del índice de  $F_{ST}$  entre pares de localidades, también se computó el flujo genético con la fórmula de Wright (1943),  $Nm = [(1/F_{ST}) - 1]/4$ , donde  $Nm$  es el número efectivo de migrantes por generación. Wright (1951) propone que si  $Nm$  es mucho mayor a 1 no hay diferenciación local, al homogeneizar la variación genética, pero si  $Nm$  es de 1 o menor se puede considerar a las poblaciones como independientes.

Para determinar la distribución de la variación entre regiones, entre localidades y dentro de las localidades, se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) con 999 permutaciones al azar, con el programa GenAlEx v.6.5 (Peakall y Smouse, 2006).

### 2.3.2. Estructura genética

Los datos se analizaron además con STRUCTURE versión 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000), el programa utiliza datos genotípicos y realiza una asignación bayesiana de individuos a poblaciones o grupos distintos (K). Se empleó el modelo de mezcla, donde cada individuo se asigna a cada una de las poblaciones (K). Se probaron valores desde K=1 hasta K=8. Los parámetros utilizados fueron de 100,000 iteraciones de MCMC con 10,000 ciclos de dememorización. Para cada K se realizaron 10 repeticiones. El número de poblaciones (K) se determinó por el método Evanno del programa Structure Harvester (Evanno *et al.*, 2005).

### 2.3.3. Relaciones genéticas

Se calcularon las distancias genéticas pareadas entre localidades con Nei (1978). La matriz de distancias genéticas pareadas se utilizó para hacer un análisis de conglomerados con el método de agrupamiento con media aritmética no ponderada (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA, por sus siglas en inglés).

Finalmente, se investigó el aislamiento por distancia con la prueba de Mantel (Sokal y Rohlf, 1995) con 1000 permutaciones. Para este análisis se empleó el software R versión 3.4.1 con el paquete Vegan (Oksanen *et al.*, 2018).

### 3. RESULTADOS

De los 15 iniciadores ISSR examinados, seis fueron seleccionados para el estudio de diversidad, diferenciación y estructura genética de *S. prismatica* (Cuadro 1). Los marcadores ISSR produjeron 103 bandas claras y reproducibles. Las bandas presentaron tamaños desde 305 a 1350 pb. El iniciador con menor número de loci ISSR fue el (CT)<sub>8</sub>RG (7 loci), el iniciador con mayor número de loci fue el (AG)<sub>8</sub>Y (24 loci). Se encontró solo una banda exclusiva con el ISSR (AG)<sub>8</sub>Y, en la localidad de ES. El marcador ISSR con el valor PIC más alto fue el (CT)<sub>8</sub>RG (PIC= 0.2117), mientras que el más bajo fue para el (GA)<sub>8</sub>YG (0.065).

**Cuadro 1.** Características de los iniciadores y fragmentos generados en el ostión de roca, *Striostrea prismatica*.

Secuencia (5'-3')	Temperatura de alineación °C	NB	Tamaño (pb)	BE	PIC
(CT) <sub>8</sub> RG	50	7	520-1000	0	0.2117
(AG) <sub>8</sub> Y	50	24	298-1300	1	0.194
(GA) <sub>8</sub> C	55	15	420-1350	0	0.1909
(GA) <sub>8</sub> YG	55	21	310-950	0	0.065
(AC) <sub>8</sub> YG	60	20	305-1270	0	0.1569
(CA) <sub>8</sub> RT	55	16	320-825	0	0.1667
<b>Promedio</b>					<b>0.1544</b>
<b>Total</b>		<b>103</b>		<b>1</b>	

NB: Número de bandas. BE: Número de bandas exclusivas. PIC. Contenido de información polimórfica.

#### 3.1. Diversidad y diferenciación genética

El porcentaje de loci polimórficos en *S. prismatica* fue de 100%, la heterocigosidad total (Ht) de 0.2354, la heterocigosidad intrapoblacional (Hs) de 0.1924 y el índice de diversidad de Shannon (I) de 0.3940. El porcentaje de loci polimórficos más alto se observó en la localidad de Ox (80.58%), mientras que el más bajo fue para Ti (50.49%). La localidad de Ox resultó tener el índice de diversidad de Nei (1973) y de Shannon más alto (H= 0.2275, I= 0.3548) y Ti presentó los valores más bajos (H= 0.1534, I= 0.2273) entre todas las localidades (Cuadro 2). El Test Student-Newman-Keuls de comparaciones múltiples indicó que I fue significativamente más bajo (P<0.05) para Ti respecto al resto de las localidades (Cuadro 2).



**Cuadro 2.** Índices de diversidad genética para siete localidades de ostión de roca, *Striostrea prismatica* en el Pacífico oriental tropical.

Localidad	NLP	P (%)	H (SD)	I (SD)
Mz	74	71.84	0.198 (0.177)	0.3111 (0.250) <sup>A</sup>
Ti	52	50.49	0.1534 (0.179)	0.2373 (0.262) <sup>B</sup>
Qm	72	69.9	0.1974 (0.189)	0.3051 (0.264) <sup>A</sup>
Pe	69	66.99	0.1881 (0.175)	0.295 (0.251) <sup>A</sup>
Ig	69	66.99	0.1897 (0.184)	0.2949 (0.260) <sup>A</sup>
Ox	83	80.58	0.2275 (0.173)	0.3548 (0.240) <sup>A</sup>
ES	78	75.73	0.2139 (0.154)	0.3406 (0.221) <sup>A</sup>
<b>Total</b>	<b>71</b>	<b>100</b>	<b>0.2354</b>	<b>0.394</b>

NLP: Número de loci polimórficos. P (%): Porcentaje de loci polimórficos. H: índice de diversidad genética de Nei (1973). I: Índice de información de Shannon (Lewontin, 1972). SD: Desviación estándar. Los superíndices indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Los índices de diferenciación entre las localidades fueron moderados ( $G_{ST} = 0.1823$  y  $F_{ST} = 0.1381$ ) y el número de migrantes ( $N_m$ ), calculado a partir del  $G_{ST}$  fue de 2.238. La prueba exacta de Fisher mostró diferencias significativas entre las frecuencias alélicas entre pares de localidades ( $P < 0.001$ ). Todas las comparaciones pareadas de  $F_{ST}$  basadas en permutaciones de individuos entre todas las localidades mostraron diferencias significativas ( $P < 0.001$ ), la diferenciación más alta se observó entre Ti y ES ( $F_{ST} = 0.182$ ), mientras que la más baja entre Pe y Mz ( $F_{ST} = 0.097$ ), estos valores son proporcionales a los valores de flujo genético ( $N_m$ ) entre localidades, donde todos fueron mayores a uno (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) entre pares de localidades (debajo de la diagonal) y flujo genético ( $N_m$ ) entre las localidades (sobre la diagonal) de *Striostrea prismatica* del Pacífico oriental tropical.

	Mz	Ti	Qm	Pe	Ig	Ox	Es
Mz	***	2.1062	1.497	<b>2.3246</b>	1.8093	1.6775	1.2506
Ti	0.1061	***	1.9145	2.1961	1.5936	1.4078	<b>1.1198</b>
Qm	0.1431	0.1155	***	2.0002	1.296	1.1266	1.4289
Pe	<b>0.0971</b>	0.1022	0.1111	***	2.3193	1.43	1.2301
Ig	0.1214	0.1356	0.1617	0.0973	***	1.523	1.4982
Ox	0.1297	0.1508	0.1816	0.1488	0.141	***	1.894
ES	0.1666	<b>0.1825</b>	0.1489	0.1689	0.143	0.1166	***

Todas las comparaciones pareadas de  $F_{ST}$  basadas en 1000 permutaciones aleatorias de individuos entre las poblaciones con una  $P < 0.001$ . Se resaltan los valores máximos y mínimos.

Los resultados del AMOVA (Cuadro 4), muestran que el mayor porcentaje de variación es explicado por diferencias dentro de las localidades (78%,  $\Phi_{PT}$ = 0.215). El porcentaje de variación entre poblaciones dentro de las regiones fue moderado (17%,  $\Phi_{PR}$ = 0.1822), lo que sugiere la existencia de estructura genética. La menor fuente de variación se presenta entre regiones (4%,  $\Phi_{RT}$ = 0.04). Las diferencias observadas fueron significativas ( $P < 0.001$ ) lo que demuestra heterogeneidad en los tres componentes de la varianza.

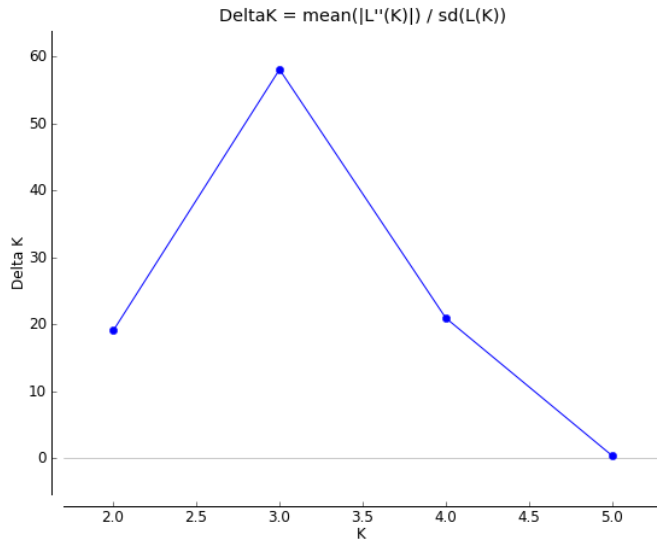
**Cuadro 4.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) en el ostión de roca, *Striostrea prismatica*.

Fuente de variación	Df	SS	MS	SV	%	$\Phi_{RT}$	$\Phi_{PR}$	$\Phi_{PT}$
Entre regiones	2	242.866	121.433	0.881	4%	0.04*	0.182*	0.215*
Entre localidades	4	336.455	84.114	3.788	17%			
Dentro de las localidades	119	2022.647	16.997	16.997	78%			
<b>Total</b>	<b>125</b>	<b>2601.968</b>		<b>21.666</b>	<b>100%</b>			

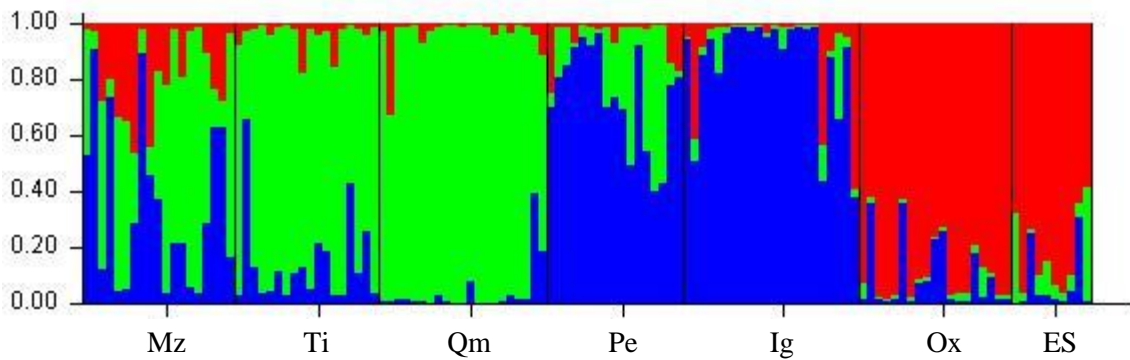
Df: grados de libertad. SS: fuente de variación. MS: cuadrado medio. SV: variación estándar.  $\Phi_{RT}$ : diferenciación entre regiones,  $\Phi_{PR}$ : entre localidades y  $\Phi_{PT}$  dentro de las localidades. El valor de \* $P = 0.001$ : los niveles de significancia fueron estimados sobre 999 permutaciones al azar.

### 3.2. Estructura genética

La aplicación del modelo bayesiano, de acuerdo al método propuesto por Evanno *et al.* (2005), mostró que la variabilidad genética de *S. prismatica* se encuentra distribuida en tres grupos genéticos ( $K = 3$ ,  $\Delta K = 62.732$ ), este resultado corroboró la existencia de una estructura poblacional (Figura 1). La mayor parte de los individuos de las localidades de Ox y ES comparten un mayor porcentaje de asignación a uno de los grupos genéticos (rojo); mientras que en los individuos de las localidades ubicadas en Pacífico transicional mexicano (Pe y Ig) se observa una mayor asignación a un segundo grupo (azul), estas últimas localidades se encuentran muy cercanas geográficamente a las de la Bahía de Banderas (Ti y Qm) en las que predominan individuos con un mayor porcentaje de asignación al tercer grupo genético (verde); en Mz predominan individuos con porcentajes de asignación a grupos genéticos diferentes, aunque con una mayor asignación a las localidades de Bahía de Banderas (Figura 2).



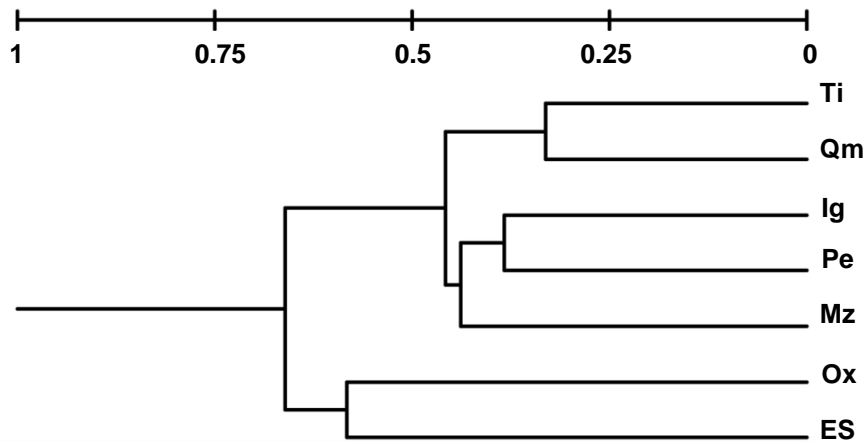
**Figura 1.** Determinación del número de grupos genéticos ( $\Delta K$ ) con el programa Structure Harvester.



**Figura 2.** Distribución de grupos genéticos en las localidades de *Striostrea prismática*, cada color representa un grupo genético. Cada individuo está representado por una barra vertical, los colores representan el porcentaje de asignación a cada grupo genético.

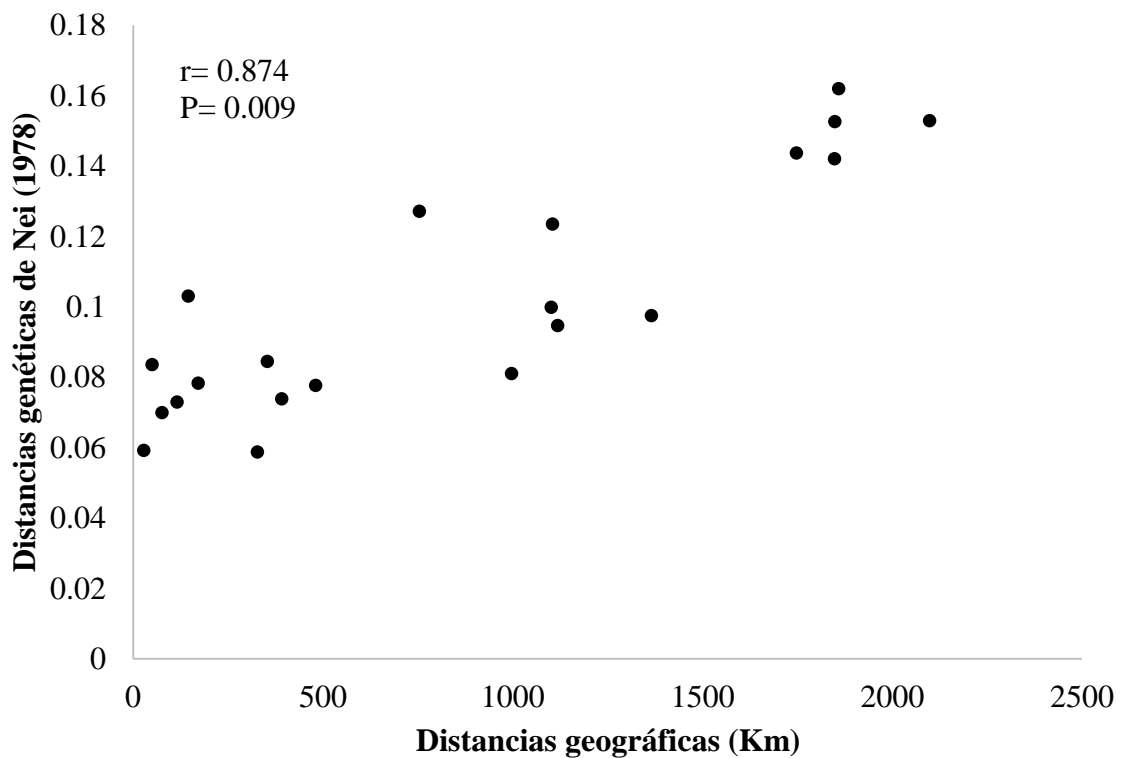
### 3.3. Relaciones genéticas

El dendograma UPGMA (Figura 3) de distancias genéticas de Nei (1978) coincide con los resultados del STRUCTURE. En el dendograma se observan dos grupos principales. El primero corresponde a las regiones del Golfo de California y Pacífico Transicional Mexicano, y el segundo al Pacífico Centroamericano con Ox y Es. En el primer grupo, Ti y Qm son las localidades genéticamente más cercanas mientras que Mz es la localidad más distante. Ox y ES se separan en el segundo grupo y son las localidades genéticamente más distantes.



**Figura 3.** Dendrograma UPGMA de distancias genética de Nei (1978) en localidades de *Striostrea prismatica*.

El valor de la correlación de la prueba de Mantel fue moderado y significativo ( $r=0.874$ ,  $P=0.009$ ), indicando aislamiento por distancia (Figura 4).



**Figura 4.** Prueba de Mantel. Distancias geográficas y distancias genética de Nei (1978) entre localidades de *Striostrea prismatica*. MonteCarlo basado sobre 999 réplicas, con una  $P=0.009$ .

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Marcadores ISSR

Se ha discutido sobre la confianza del uso de los marcadores dominantes en los estudios de genética de poblaciones debido a que presentan problemas de reproducibilidad y homología de los amplificadores (Ng y Tan, 2015). El menor contenido de información genética del marcador ISSR, en comparación de un marcador codominante, se compensó analizando 103 loci. Mariette *et al.* (2002) señalan que entre 4-10 veces más loci dominantes deben de ser utilizados para obtener un poder de estimación similar al de los marcadores codominantes. En el presente estudio el índice de información polimórfica (PIC) resultó en una media de 0.1544, (De Riek *et al.*, 2001). El iniciador (CT)<sub>8</sub> RG mostró el valor de PIC más alto (0.2117). En relación a los problemas de reproducibilidad, se utilizaron iniciadores ISSR anclados, lo que aumenta considerablemente la reproducibilidad de los marcadores (Ng y Tan, 2015). Además, el 5% de las muestras de cada una de las localidades del estudio se amplificaron por duplicado tal como lo sugiere Boinin *et al.* (2004). Para el análisis genético solamente se consideraron fragmentos altamente reproducibles y el sesgo estadístico, producto de la naturaleza dominante de los ISSR, se redujo al emplear la corrección de Lynch y Milligan (1994). El problema de la homología de las bandas disminuye al trabajar con muestras de una sola especie y aumentar la resolución de la electroforesis.

### 4.2. Diversidad genética y diferenciación genética

Los 103 ISSR utilizados en este trabajo fueron suficientes para detectar la diversidad entre y dentro de las localidades de *S. prismatica*. El número de loci ISSR en trabajos de genética de poblaciones en moluscos marinos ha sido muy variado, desde 21 bandas con cuatro iniciadores ISSR en la almeja gigante *Tridacna gigas* (Evans y Jerry, 2006), 76 bandas con cinco iniciadores en el caracol marino *Nacella magellanica* (De Aranzamendi *et al.*, 2014) hasta 96 bandas con siete iniciadores en el ostión de perla *Pinctada maxima* (Yinping *et al.*, 2008). El porcentaje de loci polimórficos en *S. prismatica* fue de 100% (con un rango por localidad de 50.74 a 80.58%), este resultado explica la ausencia de genotipos idénticos en los individuos de *S. prismatica* y la gran variación genética encontrada en la especie. El porcentaje de loci polimórficos entre localidades es congruente con lo reportado en otras especies de moluscos (De Aranzamendi *et al.*, 2008;

Alonso-Domínguez, 2013). Casu *et al.*, 2005 mencionan que la sensibilidad de los ISSR para detectar la diversidad genética entre los individuos de la almeja amatista (*Gemma gemma*) explica la ausencia de genotipos idénticos en los individuos analizados. En este mismo estudio, mencionan que la hipervariabilidad de estos marcadores permitió la detección de la estructura genética especial a fina escala, ya que se observó una gran heterogeneidad genética dentro y entre parches genéticos.

Los valores de la diversidad genética encontrada en el presente estudio con *S. prismatica*, coinciden con la diversidad reportada en el grupo de los ostiones. En general, se ha reportado una diversidad genética alta con microsatélites en *Crassostrea virginica* (Galindo-Sánchez *et al.*, 2008) y en *Ostrea edulis* (Launey *et al.*, 2002); con RAPDs en *C. belcheri*, *C. iredalei*, *Saccostrea cucullata*, *S. forskali* y *Striostrea mytiloides* (Klinbunga *et al.*, 2001). Los valores de heterocigosidad (H) para las localidades estudiadas de *S. prismatica* fueron de 0.1534-0.2275 con una  $H_T$  de 0.2354 para la especie, en general, los valores son moderados y similares a lo observado en otros moluscos marinos: el bivalvo *Gemma gemma* (H= 0.169-0.184) (Casu *et al.*, 2005) y el ostión de perla *Pinctada martensii* (H= 0.218) (Jiang *et al.*, 2007), la lapa del Pacífico *Fissurella virescens* mostró valores más altos (H= 0.2001-0.3235) (Alonso-Domínguez, 2013). El mismo patrón se observa con el índice de diversidad de Shannon (I= 0.2373-0.3548). Entre las localidades, Ti presenta el índice de Shannon significativamente más bajo (I= 0.2373) respecto al resto de las localidades, mientras que Ox el más alto (I= 0.3538).

Los bajos índices de diversidad genética encontrados en la localidad de Ti pueden tener una causa multifactorial:

- i) una reducción en el tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ) debido a la sobrepesca. Tizate, además de estar en un banco comercial pesquero, se encuentra ubicado en una zona turística, donde la demanda de este recurso puede ser mayor respecto a otras localidades,
- ii) la contaminación por descargas de aguas residuales tanto de embarcaciones, de la zona urbana como hotelera, que pueden influenciar negativamente el asentamiento de larvas, una de las etapas más críticas del ciclo de vida de los invertebrados bentónicos (Bonar *et al.*, 1990),
- iii) la posible retención larvaria, debido a la dinámica oceanográfica (Palumbi, 2003; Cowen y Spounagle, 2009) respecto a las mareas internas de la Bahía de Banderas que impiden el movimiento hacia adentro o fuera de ésta (Plata y Filonov, 2007). Al noroeste de la bahía, donde se ubica Ti, la profundidad es

menor a 25 m y existe un banco de arena sumergido que obstaculiza el libre intercambio de masas de agua entre la parte noroeste de este cuerpo de agua y mar abierto (Plata y Filonov, 2007).

Los índices de diferenciación en la especie indican que, aunque los niveles son moderados ( $F_{ST}= 0.1381$ ,  $G_{ST}=0.1826$ ,  $\Phi_{PR} = 0.1822$ ), las diferencias genéticas entre las localidades de *S. prismatica* son significativas ( $P<0.001$ ). Estudios con marcadores dominantes (Casu *et al.*, 2006; De Aranzamendi *et al.*, 2008; De Aranzamendi *et al.*, 2014) y con aloenzimas también han logrado detectar diferencias genéticas interpoblacionales en especies de bivalvos y ostiones (Buroker 1983; Michinina y Rebordinos 1997). En un contexto comparativo, valores bajos en los índices de diferenciación de Wright parecen tener una relación con la larga esperanza de vida larval. El valor de  $F_{ST}$  en *S. prismatica* (0.1381) es menor que el valor observado en *O. chilensis* ( $F_{ST}= 0.194$ ) (Toro y González, 2009), en la almeja *G. gemma* ( $F_{ST}= 0.249$ ) (Casu *et al.*, 2005) y en la lapa *F. virescens* ( $F_{ST}= 0.293$ ) (Alonso-Domínguez, 2013). Estos moluscos, a diferencia de *S. prismatica*, presentan una esperanza de vida larval muy limitada. Se pueden citar otras especies de moluscos marinos que con marcadores diferentes a los ISSR, al igual que *S. prismatica*, presentan largos estadios larvales y valores aún más bajos de diferenciación; ej. la lapa del búho, *Lotia gigantea*  $F_{ST}= 0.012$  (Fenberg *et al.*, 2010); el ostión de perla, *Pinctada martensii*  $G_{ST}= 0.094$  (Yinping *et al.*, 2007); el gasterópodo, *Rappa venossa*  $\theta_{ST}= 0.016$  (Yang *et al.*, 2008); el caracol de mar, *Littorina keenae*  $\Phi_{ST} = 0.003$  (Lee y Boulding, 2007); y el botuto, *Strombus gigas*  $F_{ST}= 0.103$  (Tello-Cetina *et al.*, 2005). Es importante considerar que las comparaciones de variabilidad y diferenciación genética entre estudios, cuando se usan marcadores de diferente naturaleza, pueden presentar un sesgo asociado al marcador o inclusive a la técnica, que influirá sobre la magnitud de los valores obtenidos en los indicadores genéticos; por tanto, la significancia estadística observada en este estudio es más relevante, que en el caso del presente estudio los valores de diferenciación genética fueron significativos.

A pesar de que las localidades Ti y Qm de *S. prismática* se encuentran geográficamente muy cercanas (~28 Km) y comparten una alta asignación a uno de los grupos genéticos, muestran una significativa diferenciación genética local ( $F_{ST}= 0.115$ ). Esto puede deberse a las diferencias oceanográficas que presenta el norte de la bahía (Plata y Filonov, 2007) con las del sur (en Jiménez-Quiroz y Espino-Bar, 2006). Pérez-Enriquez *et al.* (2008) y Galindo-Sánchez *et al.* (2008), señalan que a diferencia de las

especies bentónicas de vida libre, las larvas planctónicas como lo son las de *S. prismatica*, pueden sufrir ciertas desventajas, como la dispersión lejos del hábitat favorable, desajustes entre las tolerancias fisiológicas de larvas y adultos, mayor susceptibilidad al estrés ambiental, depredación y diversos costos que pueden asociarse con la metamorfosis en respuesta a señales químicas específicas y posponer así mismo la metamorfosis en ausencia de esas señales (Pechenik, 1999). Bajo esa misma idea, Strathmann y Strathmann (1982) argumentan que las especies bentónicas de vida libre adquirieron la “crianza” como una estrategia de su historia de vida, pues como adultos, pueden dispersarse fácilmente y así obtener una pequeña ventaja sobre las larvas planctónicas.

La mayoría de los animales marinos producen larvas con un período de dispersión en la zona pelágica, el cual puede durar días o meses (Serrato Díaz *et al.*, 2013), por ejemplo, la esperanza de vida de la larva de *S. prismatica* en condiciones experimentales es de hasta 43 días (Loor, 2012). Pese a la posible e hipotética dispersión de las larvas a gran escala en especies marinas, hay evidencia genética y oceanográfica de que al menos una proporción de larvas retorna a la misma subpoblación de sus padres (Selkoe *et al.*, 2007; Planes *et al.*, 2009). Serrato Díaz *et al.* (2013) ejemplifica a especies como la langosta americana, los copépodos, lapas y ostiones, que presentan una alta capacidad de dispersión y una estructura genética o parches genéticos caóticos a escala local. Contrario a este fenómeno, en especies marinas, los peces teleósteos presentan una alta capacidad de dispersión, que resulta en una baja diferenciación genética entre sus poblaciones debido a que los adultos realizan grandes migraciones gracias a las grandes corrientes marinas, y a que en los océanos hay menos barreras al flujo génico (Serrato Díaz *et al.*, 2013; Ward *et al.*, 1992).

Resultados similares al presente con el mismo marcador fueron observados en la almeja *G. gemma* (Casu *et al.*, 2005). Estos autores hacen mención de que el grado de diferenciación no es coherente con la estrecha proximidad geográfica de las localidades estudiadas. Este evento se les atribuye a los parches genéticos caóticos, y es muy común en moluscos marinos (Johnson y Black, 1982, 1984; Buroker 1983; David *et al.*, 1997; Michinina y Rebordinos 1997). En relación a esto, Pérez-Enriquez *et al.* (2008) explica que, a pesar del potencial de dispersión de las especies en su etapa larval, los parches genéticos se deben probablemente a presiones selectivas por diferencias en el hábitat. Así, la selección, aunada a la deriva génica producida por la disminución en el tamaño poblacional pueden explicar la diferenciación genética observada en estos bivalvos marinos.



Por otro lado, los resultados del modelo bayesiano sugieren que la especie se encuentra estructurada en tres componentes genéticos o poblaciones ( $K=3$ ), estos componentes detectados por la prueba de Evanno podrían considerarse como una metapoblación, tal como lo sugiere Levins (1969), donde cada población o componente genético estaría fragmentado con discontinuidades en las que las subpoblaciones ocuparían distintos parches de hábitat. Además, como sugiere el modelo y los resultados del flujo genético ( $Nm>1$ ) en *S. prismatica*, estos parches estarían vinculados por pequeños eventos locales de emigración e inmigración entre bancos ostrícolas cercanos, a pesar de las diferencias detectadas dentro de los componentes genéticos.

Un caso particular sucede con los individuos de Mz, que presentan una mezcla de los tres componentes genéticos, aunque el porcentaje de asignación es mayor para el grupo genético del Golfo de California (con Tizate y Quimixto). Mazatlán se encuentra más diferenciada ( $F_{ST}$ ) de Ti que de Pe en el Pacífico transicional mexicano, este hecho podría ser explicado por las condiciones oceanográficas señaladas: i) una posible retención de larvas y ii) las condiciones particulares de Bahía de Banderas, que pudiese actuar como un sistema semicerrado, en relación con Punta Peñitas, que se ubica en mar abierto. Además, el flujo de genes podría ser más abierto entre Mz y Pe, pues de acuerdo con Marinone (2003), la dirección de la corriente superficial a lo largo de la costa oriental del Golfo de California muestra un patrón norte-sur en la primavera y el otoño, mientras que el patrón es sur-norte en el verano.

La variación del ciclo reproductivo de *S. prismatica* en el espacio y tiempo puede explicar los resultados de la prueba de Evanno *et al.* (2005) ( $K=3$ ) y el dendograma UPGMA. Los tres componentes genéticos identificados se relacionan con las tres ecorregiones marinas que comprenden el estudio: i) Golfo de California, con Mazatlán y Bahía de Banderas; ii) Pacífico transicional mexicano, con Punta Peñitas y Boca de Iguanas; iii) Pacífico centroamericano, con Oaxaca y El Salvador. Loo y Sonnenholzner (2014) mencionan que la actividad reproductiva de *S. prismatica* en la costa del Ecuador, está influenciado por la temperatura y la salinidad, además agregan que, en particular la maduración y el desove se asocian con valores altos de temperatura y una reducción en la salinidad. Es importante señalar que las ecorregiones están definidas bajo variables oceanográficas entre las que destacan la temperatura y la circulación de las grandes corrientes y masas de agua marina (Lara-Lara *et al.*, 2008), además, la estacionalidad de estos parámetros es diferente entre regiones, por lo que resulta en desoves en diferentes períodos a lo largo del año. De hecho, el ciclo reproductivo de *S. prismatica* presenta

variaciones de acuerdo a su ubicación geográfica, en el Golfo de California; Sinaloa (Páez-Osuna *et al.*, 1993) y Nayarit (Cuevas-Guevara y Martínez-Guerrero, 1979) sucede de agosto a septiembre, en Guerrero (Pacífico transicional mexicano) (Ramírez y Sevilla, 1964) de junio a agosto y en Oaxaca (Pacífico centroamericano) (Ruiz-Durá, 1974) de marzo a julio.

No existe un patrón único que defina la estructura genética en la especie, pese a que se observó aislamiento por distancia ( $r= 0.874$ ,  $p=0.009$ ) en una escala macrogeográfica (hasta ~2 000 km) y parches genéticos (~28 Km), los resultados del modelo bayesiano ( $K=3$ ) y del AMOVA ( $\Phi_{RT}= 0.04$ ,  $P= 0.001$ ) no descartan la posibilidad de considerar a las interrupciones filogenéticas abruptas, asociadas con barreras geográficas (revisar en Hellberg *et al.*, 2002), como un tipo adicional de estructura genética en *S. prismatica*. Esta idea puede ser reforzada, pues en el Océano pacífico, el Golfo de California es considerado como un mar parcialmente cerrado; el Pacífico transicional mexicano como un sistema afectado estacionalmente (en el invierno) por la influencia del extremo sur de la corriente de California, que lo transforma estacionalmente en mar subtropical; mientras que el Pacífico centroamericano como un sistema completamente tropical durante todo el año, libre de la influencia de aguas más frías del norte (Wilkinson *et al.*, 2009). Además, cabe señalar que, como evidencia, se han observado límites genéticos abruptos con mayor frecuencia en especies que ocupan bahías y estuarios, o aquellas que cruzan fuertes límites filogeográficos limitados por la circulación de corrientes oceánicas (en Miller *et al.*, 2006).

En términos pesqueros, los recursos vivos, como lo son los bancos del ostión de roca son limitados pero renovables, y su evaluación puede definirse como la búsqueda del nivel de explotación que permita obtener, a largo plazo, el rendimiento máximo ya sea en biomasa (o peso) del producto o en recursos generados (o ganancia) (Espino-Barr *et al.*, 2008). Los resultados del presente estudio, así como la literatura consultada, señalan la necesidad de considerar reevaluar la pesca de la especie, pues para México, la institución responsable de la administración de los recursos pesqueros (SAGARPA), estableció, como mecanismo de manejo del recurso, una veda del ostión en general, incluyendo a *Striostrea prismatica*, en todo el litoral del Pacífico, en periodos que van entre del 1° de junio al 31 de agosto (DOF, 1988). Se tendría que considerar otras opciones de manejo, adicional a la veda, como determinar la ubicación y alternancia de bancos ostrícolas, que seguramente podrían funcionar como áreas de reclutamiento para los stocks explotables y diseñar esquemas de repoblación que permitan su recuperación, como lo sugiere Pérez-

Enríquez *et al.* (2008) y Ríos-González *et al.* (2018) en sus estudios, donde agregan que, dichos esquemas deberán tomar en cuenta la influencia de otros factores como la disponibilidad de hábitat o las variaciones de las condiciones ambientales.

El presente estudio contribuye a la generación de conocimiento básico de utilidad para una mejor administración del recurso dentro de su pesquería y abre el camino a nuevas investigaciones: i) reevaluar la unidad de pesquería de la especie; ii) considerar el muestreo en diferentes localidades y períodos del mismo año para analizar la estructura demográfica y ciclo reproductivo de la especie; iii) explorar las relaciones entre la variación genética y la ambiental con el fin de comprender y establecer mejor un patrón claro sobre los parches genéticos caóticos (genética del paisaje) y su vulnerabilidad a los efectos de la sobrepesca; iv) evaluar la estructura genética a escala fina y v) realizar estudios genéticos con marcadores codominantes y de elevado polimorfismo, como lo son los Polimorfismos de una Sola Base (SNPs, por sus siglas en inglés).

## **5. CONCLUSIÓN**

En conclusión, *S. prismatica* presenta niveles medios de diversidad genética y se encuentra genéticamente estructurada en tres componentes o poblaciones genéticas. Las diferencias en el hábitat se manifiestan en parches genéticos conectados a través de una baja migración de las larvas. El flujo genético es afectado por la distancia geográfica.

## VII. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de la prueba de transferibilidad indicaron nula o poca amplificación en *S. prismatica* de SSR y EST-SSR desarrollados en especies de otros géneros de la familia Ostreoidae. Estos marcadores fueron descartados para el análisis genético de la especie. Será necesario realizar una librería genómica de *S. prismatica* para identificar marcadores codominantes propios de la especie.

Los marcadores dominantes ISSR fueron suficientes para detectar la diversidad y la estructura genética en la especie. Los resultados del presente estudio muestran que el recurso ostión de roca, *S. prismatica*, presenta una diversidad genética moderada, y diferenciación genética significativa entre localidades a lo largo de la distribución geográfica estudiada, se observa cierto flujo genético y evidencias de aislamiento por distancia.

Se considera a la disparidad de hábitat como participantes de la diferenciación genética, aunada a la supervivencia de los organismos en su estadio de vida larval en la columna de agua, así mismo, no se descarta la posibilidad de que la actividad pesquera tenga una influencia sobre la diferenciación genética detectada en la especie. Estas diferencias pueden ser bien explicadas por el fenómeno de parches genéticos caóticos.

*Striostrea prismática* se encuentra estructurada genéticamente en tres poblaciones, de acuerdo al análisis Bayesiano y a la prueba de Evanno ( $K=3$ ). Se sugiere que las tres ecorregiones marinas, que corresponden a los tres componentes genéticos, pueden actuar como modeladores de la estructura, principalmente por la temperatura, un factor oceanográfico fundamental para la reproducción de la especie y para la presencia de parches alimenticios a lo largo de toda la costa del Pacífico oriental tropical.

## VIII. RECOMENDACIONES

Los resultados del presente con marcadores ISSR sugieren realizar una reevaluación de la unidad pesquera del recurso ostión de roca, *S. prismatica*. Además, esta recomendación se ve reforzada respecto a la variación en el ciclo reproductivo de la especie a lo largo de toda su distribución que, en sí, no coincide con la época de veda, principalmente en la época de los picos máximos de reproducción de *S. prismatica*.

Con el fin de salvaguardar el acervo genético del recurso, se recomiendan cuatro actividades: i) continuar con las rotaciones pesqueras, que consiste en cambiar la explotación de ciertos bancos ostrícolas a lo largo del tiempo; ii) continuar y reevaluar la época de veda; iii) monitorear y realizar repoblaciones con el fin mantener la diversidad genética en ciertas localidades, por ejemplo, Tizate; iv) sentar las bases biológicas para el desarrollo acuícola de la especie, por ejemplo, un laboratorio productor de semillas, donde se maneje un número adecuado de reproductores, que sirva para la misma producción pesquera, ya sea en cultivos en suspensión o sobre los mismos bancos ostrícolas.

El presente estudio comprende una extensión de más de 2 000 km de línea de costa, desde Mazatlán, Sinaloa, México, hasta la costa de El Salvador, en el Pacífico oriental tropical. En México, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación abrirá mesa de trabajo para recibir propuestas sobre ordenamiento y co-manejo de la sustentabilidad de poblaciones pesqueras, por lo que los presentes resultados y sumado a un trabajo de demografía de la especie, pretenden contribuir a la Carta Nacional Pesquera, que, además, tiene la finalidad de proponer nuevas líneas de investigación para el manejo de los recursos pesqueros. Esto fortalece al hecho de que actualmente ya se trabaja con la acuicultura de algunos ostreidos en el Centro Regional de Investigación Pesquera y Acuicultura (CRIPA) del Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INAPESCA), Unidad Manzanillo, en colaboración con la Universidad de Guadalajara. Además, para El Salvador, se pretende informar a las pesquerías y al Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG).

## IX. LITERATURA CITADA

Alonso-Dominguez A. 2008. Diversidad Genética y Morfometría de *Fissurella virescens* en el Pacífico Oriental Tropical. Tesis para obtener el grado el grado de Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas. Universidad de Guadalajara, México.

Arnaud S., Monteforte M., Galtier N., F. Bonhomme & Blanc B. 2000. Population structure and genetic variability of pearl oyster *Pinctada mazatlanica* along Pacific coasts from Mexico to Panama. *Conservation Genetics*, 1(4): 299–307.

Banks S.C., Piggott M.P., D.A. Raftos & Beheregaray L.B. 2006. Microsatellite markers for the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*, a commercially important bivalve in southeastern Australia. *Molecular Ecology notes*, 3(6): 856-858.

Bonar D.B., Coon S.L., Marianne W., M.W. Ronald & Fitt W. 1990. Control of oyster settlement and metamorphosis by endogenous and exogenous chemical cues. *Bulletin of Marine Science*, 2(46): 484-498.

Bonin A., Bellemain E., Bronken Eidesen P., Pompanon F., C. Brochmann & Taberlet P. 2004. 'How to track and assess genotyping errors in population genetics studies'. *Molecular Ecology*, 13: 3261–3273.

Buroker N.E. 1983. Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast and the Gulf of Mexico. *Marine Biology*, 1(75): 171–184.

Casu M., Maltagliati, F., Cossu P., Lai T., Curini-Galletti M., A. Castelli & Commito J.A. 2005. Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from Maine and Virginia (USA), as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1(325): 46–54.

Casu M., Casu D., Lai T., P. Cossu & Curini-Galletti M. 2006. Inter-simple sequence repeat markers reveal strong genetic differentiation among populations of the endangered mollusc *Patella ferruginea* (Gastropoda: Patellidae) from two Sardinian marine protected areas. *Marine Biology*, 5(149): 1163–1174

Chapuis M., & Estoup A. 2006. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular biology and evolution*, 24(3): 621–631. 2007.

Coan E.V., & Valentich-Scott P. (2012). Bivalve Seashells of Tropical West America. Marine Bivalve Mollusks from Baja California to Northern Peru. Vol. 2, Santa Barbara Museum of Natural History, Santa Barbara, California USA. pp. 1258.

Cowen R. K. & Sponaugle S. 2009. Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science*, (1): 443-466.

Cruz P., Yáñez-Jacome A., M. Ibarra & Rangel-Becerril J. 2007. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific pleasure oyster, *Crassostrea corteziensis*, and their cross-species amplification in four other oyster species. *Molecular Ecology Notes*, 3(7): 448-450.

Cuevas-Guevara C.A. & Martínez-Guerrero A. 1979. Estudio gonádico de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, *C. palmula* Carpenter y *C. iridescens* Hanley, de San Blas, Nayarit, México (Bivalvia: Ostreidae). *Anales del Instituto Ciencias del Mar y Limnología*, (6): 81–98.

David P., Perdieu M.A., A.F. Pernot & Jarne P. 1997. Fine-grained spatial and temporal population genetic structure in the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Evolution*, 4(51): 1318– 1322.

De Aranzamendi M.C., Sahade R., M. Titián & Chiappero M.B. 2008. Genetic differentiation between morphotypes in the Antarctic limpet *Nacella concinna* as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *Marine Biology*, (154):875–885.

De Aranzamendi M.C., R. Bastida & Gardenal C.N. 2014. Genetic population structure in *Nacella magellanica*: Evidence of rapid range expansion throughout the entire species distribution on the Atlantic coast. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, (460): 53–61.

De la Rosa-Vélez J., & Rodríguez-Romero F. 1988. Applicability of genetic variability measurements to the fishery of the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) in the Gulf of Mexico. *Ciencias Marinas*, 14(4): 43–56.

De la Rosa-Vélez J., y Rodríguez-Romero F. (1989). Enfoque genético para el análisis de las poblaciones de recursos pesqueros: El caso de la población ostrícola de la Laguna de Términos, Campeche. En: De la Rosa-Vélez J., González-Farías F (eds.). *Temas de Oceanografía Biológica en México*. Universidad Autónoma de Baja California, Mexico, pp. 255–284.

De Riek J., Calsyn E., Everaert I., E. Van Bockstaele & De Loose M. 2001. AFLP based alternatives for the assessment of distinctness, uniformity and stability of sugar beet varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 8(103): 1254–1265.



DOF. Diario Oficial de la federación. 1988. ACUERDO que establece veda para las especies de ostión de placer (*Crassostrea cortiziensis*) y ostión de piedra (*Crassostrea iridescens*), en aguas litorales del Océano Pacífico. Estados Unidos Mexicanos- Secretaría de Pesca. Consultado el 2 de octubre, 2017. [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4751582yfecha=18/07/1988](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4751582yfecha=18/07/1988)

Dong Y., Yao H., Lin Z., L. Zhang & Bao Z. 2012. Characterization of 62 polymorphic EST-SSR markers in the blood clam (*Tegillarca granosa*) and their cross-amplification in *Scapharca subcrenata*. *Conservation Genetics Resources*, 4(4):991–997.

Ellegren H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(6):435-445.

Ellis J.R., & Burke J.M. 2007. EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*, (99): 125–132.

Espino-Barr E., González Vega A., H. Santana Hernández y González Vega H. 2008. Manual de Biología pesquera. Instituto Nacional de la Pesca. México. Consultado el 3 de abril de 2018. <http://www.inapesca.gob.mx/portal/Publicaciones/Manuales/2008-Espino-Barr-et-al-Manual-de-BIOLOGIA-PESQUERA.pdf?download>

Estoup A., & Angers B. (1998). Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. En: Carvalho G (editor). *Advances in molecular ecology*. Amsterdam: IOS Press. pp. 55–86

Evanno G., S. Regnaut & Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 8(14): 2611-2620

Evans B.S. & Jerry D.R. 2006. Population Genetic Structure of Giant Clams, *Tridacna gigas* (Family Tridacnidae), on the Great Barrier Reef. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 3(1): 235-243.

FAO. 2012. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Estado actual de la Pesca y Acuicultura. Roma. 231 pp.

Fenberg P. B., Hellberg M. E., L. Mullen & Roy K. 2010. Genetic diversity and population structure of the size selectively harvested owl limpet, *Lottia gigantea*. *Marine Ecology*, 4(31): 574-583.

Fournier M. 1992. The reproductive biology of the tropical rocky oyster *Ostrea iridescens* (Bivalvia: Ostreidae) on the Pacific coast of Costa Rica. *Aquaculture*, 3-4(101): 371-378.

Gaffney P. M. (1994). Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: more light? En: Beaumont A.R (editor). Genetics and evolution of aquatic organisms. London: Chapman and Hall. pp. 146-153.

Galindo-Sánchez C.E., Gaffney P.M., Pérez-Rostro C.I., J.C De la Rosa-Vélez & Cruz P. 2008. Assessment of Genetic Diversity of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica* in Veracruz, Mexico Using Microsatellite Markers. *Journal of Shellfish Research*, 27(4):721-727.

Gallegos A., Rodríguez R., Márquez E., R. Lecuanda y Zavala-Hidalgo J. Una climatología de la temperatura de la superficie del mar de las aguas adyacentes a las costas de Jalisco, Colima y Michoacan: 1996-2003. En Jiménez-Quiroz M. C y Espino-Barr E (edit). 2006. Los recursos pesqueros y acuícolas de Jalisco, Colima y Michoacán. 1era Edición, Instituto Nacional de la Pesca. México.

Galleguillos R., Troncoso L., J. Monsalves y Oyarzún C. 1997. Diferenciación poblacional en la sardina chilena *Strangomera bentincki* (Pisces: Clupeidae) análisis genético de variabilidad proteínica. *Revista Chilena de Historia Natural*, (70): 351-361.

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

Gupta P.K., Rustgi S., Sharma S., Singh R., N. Kumar & Balyan H.S. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 4(270): 315–323.

Harry H.W. 1985. Synopsis of the supraspecific classification of living oysters (Bivalvia: Gryphaeidae and Ostreidae). *Veliger*, (28): 121–158.

Hazel Junemie M., Lebata-Ramos L., Okuzawa J., J.R. Maliao & Abroguena, J.B.R. 2010. Growth and survival of hatchery-bred giant clams (*Tridacna gigas*) in an ocean nursery in Sagay Marine Reserve, Philippines. *Aquaculture international*, 1(18): 19-33.

Hedgecock D., Li G., Hubert S., K. Bucklin & Ribes V. 2004. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Shellfish Research*, 2(23): 379–385.

Hellberg M. E., Burton R. S., J. E. Neigel & Palumbi S. R. 2002. Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science*, 70(1):273–290.

Ibarra A.M., Petersen J.L., T.R. Famula & May B. 2006. “Characterization of 35 microsatellite loci in the Pacific lion paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and their cross-species amplification in four other scallops of the Pectinidae family”. *Molecular Ecology*, 1(6) :153-156.

Jian Yinping., Maoxian H.E., L. Huang & Yuan T. 2008. ISSR analysis of genetic diversity in two populations of pearl oyster *Pinctada maxima*. *Journal of Tropical Oceanography*, 4(64).

Jiang Yinping., H.E. Maoxian & Lin Y. 2007. Genetic Diversity of a Cultured Population on *Pinctada Martensii* Dunker by ISSR Marker. *Marine Science Bulletin*, 26(5):62-66.

Jímenez-Quiroz M. C., y Espino-Barr E (edit). 2006. Los recursos pesqueros y acuícolas de Jalisco, Colima y Michoacán. 1era Edición, Instituto Nacional de la Pesca. México.

Johnson M.S., & Black R. 1982. Chaotic genetic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria* sp. *Marine Biology*, 2(70): 157–164.

Johnson M.S., & Black R. 1984. Pattern beneath the chaos: the effect of recruitment on genetic patchiness in an intertidal limpet. *Evolution*, 38(6): 1371– 1383.

Keen A.M. (1971). Sea Shells of Tropica! West America: Marine mollusks from Baja California to Peru. Stanford University, Stanford, California. pp 356.

Klinbunga S., Ampayup P., Tassanakajon A., P. Jarayabhand & Yoosukh W. 2001. Genetic Diversity and Molecular Markers of Cupped Oysters (Genera *Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand Revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Marine Biotechnology*, (3):133–144.

Klinbunga S., Khamnamtong A., Puanglarp N., Jarayabhand P., W. Yoosukh & Menasveta P. 2005. Molecular Taxonomy of cupped oysters (*Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand based on COI, 16S, and 18S rDNA polymorphism. *Marine Biotechnology*, 4(7): 306-317.

Kong L., Bai J., & Li Q. 2014. Comparative assessment of genomic SSR, EST–SSR and EST–SNP markers for evaluation of the genetic diversity of wild and cultured Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Aquaculture*, 1(420–421), 85–91.

Korbie J.D., & Mattick J.S. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature protocols*, 9(3): 1452-1456.

Lam K., & Morton B. 2006. Morphological and mitochondrial-DNA analysis of the Indo-West Pacific rock oysters (*Ostreidae*, *Saccostrea* species). *Journal of Molluscan Studies*, 3(72): 235–245.

Lara-Lara J.R., et al. (2008). Los ecosistemas marinos, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. pp. 135-159.

Launey S., Ledu C., Boudry P., F. Bonhomme & Naciri-Graven Y. 2002. Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis*) as revealed by microsatellite polymorphism. *Journal of Heredity*, 93(5): 331–337.

Lee H. J., & Boulding E. G. 2007. Mitochondrial DNA variation in space and time in the northeastern Pacific gastropod, *Littorina keenae*. *Molecular Ecology*, 15(16): 3084-3103.

Leighton J. T. 2015. A molecular and population genetics study of the Bluff Oyster (*Ostrea chilensis*). A thesis submitted to Victoria University of Wellington in fulfilment of the requirement for the degree of Doctor of Philosophy in Marine Biology.

Levins R. 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control American. *Entomologist*, 3(15): 237-240

Lewontin R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, 6: 381–398.

Li G., Hubert S., K. Bucklin & Ribes V. 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes*, (3): 228 – 232.

Li Q., S. Liu & Kong L. 2009. Microsatellites within genes and ESTs of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and their transferability in five other *Crassostrea* species. *Electronic Journal of Biotechnology*, 3(12): 1-6.

Li R., Li Q., Comette F., L. Dégremont & Lapègue S. 2010. Development of four EST-SSR multiplex PCRs in the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and their validation in parentage assignment. *Aquaculture*, 1-2(310): 234-239.

Liu Z.J., & Cordes J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 1-4(238): 1-37.

Loor Mera A. 2012. Desarrollo de protocolos de manejo para la inducción al desove y larvicultura de la ostra nativa *Crassostrea iridescens* (Hanley, 1854). Tesis de grado para obtener el título de Biólogo. Escuela superior politécnica del litoral. Ecuador.

Loor A., & Sonnenholzner S. 2016. Reproductive cycle of the rock oyster, *Striostrea prismatica* (Gray, 1825) from two locations on the southern coast of Ecuador. *Aquaculture Research*, 5(47): 1432-1442.

López-Flores I., De la Herrán R., Garrido-Ramos M.A., Boudry P., C. Ruiz-Rejón y Ruiz-Rejón M. 2004. The molecular phylogeny of oysters based on a satellite DNA related to transposons. *Gene*, (339): 181–188.

- Lynch, M., & Milligan B. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD marker. *Molecular Ecology*, 2(3): 91-99.
- Mariette S., Le Corre V., F Austerlitz & Kremer A. 2002. 'Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers'. *Molecular Ecology*, 7(11): 1145–1156.
- Marinone S.G. 2003. A three-dimensional model of the mean and seasonal circulation of the Gulf of California. *Journal of Geophysical Research*, 108(C10): 3325, doi:10.1029/2002JC001720.
- Mazón-Suástegui J.M., Trabal-Fernández N., Leyva-Valencia I., P. Cruz-Hernández & Lastinere-Barragán H. 2016. 28S rDNA as an alternative marker for commercially important oyster identification. *Food control*, (66): 205-214.
- Melchor-Aragón J.M., Chávez H.D., C. Acosta-Castañeda & Bush M.R. 1996. Diagnóstico de la Pesquería del Ostión de Roca, *Crassostrea iridescens*, en las costas de los municipios de Mazatlán y de San Ignacio, Sinaloa. CRIP-Mazatlán, INPSEMARNAP. pp. 25–45.
- Michinina S.R., & Rebordinos L. 1997. Genetic differentiation in marine and estuarine natural populations of *Crassostrea angulata*. *Marine Ecology Progress Series*, (154): 167–174.
- Miller P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) version 1.3. Department of Biological Science. Northern Arizona University, Flagstaff.
- Miller K. M., Supernault J., S. Li & Withler R.E. 2006. Population structure in two marine invertebrate species *Panopea abrupta* and *Strongylocentrotus franscanus* targeted for aquaculture and enhancement in British Columbia. *Journal of Shellfish Research*, 25(1): 33-42.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 949(106): 283–292.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 3(89): 583-90.
- Ng W.L., & Tan S.G. 2015. Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right? *ASM Science Journal*, 1(9): 30–39.
- Oksanen J., Guillaume Blanchet F., Friendly M., Kindt R., Legendre P., McGlinn D., Minchin P.R., O'Hara R. B., Simpson G.L., Solymos P., Henry M., Stevens H., E. Szoecs & Wagner H. 2018. Package "vegan", Community Ecology Package. Version 2.4-6. Consultado el 10 de abril de 2018

<https://github.com/vegandevs/vegan/issues>

Ortiz Pérez M.A. & De la Lanza Espino G. 2006. Diferenciación del espacio costero de México: un inventario regional. Serie Textos Universitarios, núm. 3. Instituto de Geografía, UNAM, México.

Palumbi S. R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, 1(13): 146-158.

Páez-Osuna F., H.M. Zazueta & Osuna-López J.I. 1993. Biochemical composition of oysters *Crassostrea iridescens* (Hanley) and *C. corteziensis* (Hertlein) in the northwest coast of México: seasonal changes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1(170): 1-19.

Peakall R., Gilmore S., Keys W., M. Morgante & Rafalski A. 1998. Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 15(10): 1275–1287.

Peakall R., & Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 1(6): 288-295.

Pechenik J.A. 1999. On the advantages and disadvantages of larval stages in benthic marine invertebrate life cycles. *Marine Ecology Progress series*, (177): 269– 297.

Pérez-Enríquez R., S. Ávila & Ibarra A.M. 2008. Population genetics of the oyster *Crassostrea corteziensis* in the Gulf of California. *Ciencias Marinas*, 34(4): 479-490.

Petersen J.L., A.M. Ibarra & May B. 2009. “Thirty-seven additional microsatellite loci in the Pacific lion-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) and cross-amplification in other pectinids”. *Conservation Genetic Resource*, (1):101-105.

Plata L., & Filonov A. 2007. Internal tide in the northwestern part of Banderas Bay, Mexico. *Ciencias Marinas*, 33(2): 197–215.

Poutiers J.M. (1995). Bivalvos. En: Guía FAO Para la Identificación de Especies Para los Fines de la Pesca: Pacífico Centro Oriental (ed. by W. Fischer, F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter y V.H. Niem). Organizaciones de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma. pp. 161.

Pritchard J.K., M. Stephens & Donnelly P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 2(155): 945–95

Qiu X., Liu S., X. Wang & Meng X. 2009. Eight SSR loci from Oyster *Crassostrea gigas* EST database and cross-species amplification in *C. plicatula*. *Conservation Genetics*, 10(4): 1013–1015.

Raith M., D.C. Zacherl & Pilgrim E. M. 2016. Phylogeny and Species Diversity of Gulf of California Oysters (Ostreidae) Inferred from Mitochondrial DNA. *American Malacological Bulletin*, 33(2): 263-283.

Raymond M., & Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 6(49): 1280-1283.

Ramírez H.E., y Sevilla M.L. 1964. Las ostras de México. *An. Inst. Nal. Inv. Biol. Pesq.* 7: 1-100.

Reeb C. A., & Avise J.C. 1990. A genetic discontinuity in a continuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics*, (124):397–406.

Reece K.S., Cordes J.F., Stubbs J.B., K.L. Hudson & Francis E.A. 2008. Molecular phylogenies help resolve taxonomic confusion with Asian *Crassostrea* oyster species. *Marine Biology*, (153): 709–721.

Rico C., I. Rico & Hewitt G. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of The Royal Society B Biological Sciences*, (263): 549–557.

Ríos-González KG., López-Uriarte E., Chong-Carrillo O., F. Vega-Villasante & Chavez-Villalba, J. 2018. Rock oyster *Striostrea prismatica* (Gray, 1825): biology, exploitation and conservation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46(4):626-644.

Rivera Apodaca C.G. 2009. Estructura poblacional y diversidad genética del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) en la costa oriental del golfo de California. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias en manejo de recursos naturales. Instituto Politécnico Nacional. La Paz, Baja California.

Roldan-Ruiz I., Calsyn E., Gilliland T.J., Coll R., M.J.T. Van Eijk & De Loose M. 2000. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties. 2. AFLP characterization. *Molecular Breeding*, 6(6): 593–602.

Ruiz-Durá M.F. (1974). Estudio histológico comparativo de los ciclos gonádicos de *Ostrea corteziensis* Hertlein, *Crassostrea virginica* Gmelin, *Crassostrea iridescens* Hanley. Subsecretaría de Pesca, SE. México 18: 128–138 pp.

SAGARPA 2011. Anuario Estadístico 2011. CONAPESCA. Mazatlán Sin. México. pp. 305.

Salvi D., A. Macali & Mariottini P. 2014. Molecular Phylogenetics and Systematics of the Bivalve Family Ostreidae Based on rRNA Sequence-Structure Models and Multilocus Species Tree. *PLoS ONE*, 9(9): e108696.

Salvi D., & Mariottini P. 2016. Molecular taxonomy in 2D: a novel ITS2 rRNA sequence-structure approach guides the description of the oysters' subfamily Saccostreinae and the genus *Magallana* (Bivalvia: Ostreidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 1-14.

Scribner K.T., & Pearce, J.M. 2000. Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population and phylogenetic levels. En: Barker A (editor). *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science Limited. London: 235-271.

Selkoe K.A., & Toonen R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, (9): 615–629.

Serrato Díaz A., A. Cornejo Romero y Amilpa Castro O. 2013. La biodiversidad y evolución en ambientes acuáticos analizadas con herramientas moleculares. *Hidrobiológica*, 3(23): 275-286.

Selkoe K.A., A. Vogel & Gaines S.D. 2007. Effects of ephemeral circulation on recruitment and connectivity of nearshore fish populations spanning the US-mexican border. *Marine Ecology Progress Series*, (351): 209-220.

Shaklee J.B., Allendorf F.W., D.C. Morizot & Whitt G.S. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, (119): 2-15.

Sokal R., & Rohlf J. 1995. *Biometry: The principles and practices of statistic in biological research*. 3ra edición. Freeman. New York. pp 887.

Stick D.A., Langdon C.J., M.A. Banks & Camara M.D. 2009. Nineteen novel microsatellite markers for the Olympia oyster, *Ostrea conchaphila/lurida*. *Molecular Ecology Resources*, (9): 153–155.

Strathmann R.R., & Strathmann M.F. 1982. The relationship between adult size and brooding in marine invertebrates. *The American Naturalist*, 1(119): 91–101.

Tello-Cetina J. A., L. A. Rodríguez-Gil y Rodríguez-Romero F. 2005. Genética poblacional del caracol rosado *Strombus gigas* en la Península de Yucatán: Implicaciones para su manejo y pesquería. *Ciencias Marinas*, 2(31): 379-386.



Toro J. E. y González C.P. 2009. La estructura genética de la ostra chilena (*Ostrea chilensis* Philippi, 1845) en poblaciones naturales del sur de Chile, basada en análisis con marcadores RAPDs. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44(2): 467-476.

Vekemans X. 2002. AFLP-SURV. Version 1.0. Distributed by the author, Laboratoire Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.

Ward R. D., D. O. F. Skibinski y Woodwark M. 1992. Protein heterozygosity, protein structure, and taxonomic differentiation. *Evolutionary Biology*, (26): 73-157

Wang Y., & Guo X. 2007. Development and Characterization of EST-SSR Markers in the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology*, 4(9): 500–511.

Wang H.Y., & Guo X.M. 2008. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex species-specific PCR. *Journal of Shellfish Research*, 3(27): 481-487.

Wang Y., R. Ren & Yu Z. 2008. Bioinformatic mining of EST-SSR loci in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Animal Genetics*, 3(39): 287-289.

Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 2(28): 114–138.

Wright S. 1951. The Genetical Structure of Populations. *Annals of Eugenics*, 1(15): 323-354.

Wilkinson T., E. Wiken., Bezaury Creel J., Hourigan T., Agardy T., Herrmann H., Janishevski L., Madden C., L. Morgan y Padilla M. (2009). Ecorregiones marinas de América del Norte, Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal. pp. 200.

Wolfe A. 2000. ISSR Resource Website. Consultado el 23 de marzo de 2018. <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>

Yang J., Li Q., Kong L., X. Zheng & Wang R. 2008. Genetic structure of the veined rapa whelk (*Rapana venosa*) populations along the coast of China. *Biochemical Genetics*, (46): 539-548.

Yeh F., R. Yang & Boyle T. 1999. POPGENE. Microsoft Windows based freeware for population genetic analysis, release 1.31. University of Alberta, Edmonton.

Yu Z., Kong X; Zhang L., X. Guo & Xiang J. 2003. Taxonomic status of four *Crassostrea* oysters from China as inferred from mitochondrial DNA sequences. *Journal of Shellfish Research*, 1(22): 31–38.

Yu H., & Li Q. 2007. EST-SSR markers from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes*, 7(5): 860-862.

Zhang D.X. 2004. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends in Ecology and Evolution*, 10(19): 507-509.

Zietkiewicz E., A. Rafalski & Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 2(20): 176-183.

Zhivotovsky L.A. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, (8): 907–913.

## X. ANEXOS

### Anexo 1. Extracción de ADN por kit comercial

*ZR Genomic DNA™-Tissue MiniPrep Catalog Nos. D3050 y D3051*

- 1) Agregar 260 µl (1,040 µl para D3051) de buffer proteinasa K a cada tubo de proteinasa K. La concentración final de proteinasa K después de la adición del buffer de proteinasa K es ~20 mg/ml.

*Recomendación:* agregar beta-mercaptoetanol al **Genomic Lysis Buffer** a una solución final de 0.5% (v/v) i.e., 250 µl por 50 ml or 500 µl por 100 ml.

El siguiente protocolo es para la purificación de ADN de hasta 25 mg de tejido fresco o congelado. Los rendimientos típicos son: 1 a 3 µg de ADN por mg de tejido esquelético.

- 2) Para una muestra de tejido ( $\leq 25$  mg) en un tubo de microcentrífuga, añadir una solución de:

H<sub>2</sub>O 95 µl  
2X tampón de digestión de 95 µl  
Proteinasa K 10 µl

- 3) Mezclar e incubar el tubo a 55 ° C durante 1-3 horas.
- 4) Añadir 700 µl de **Genomic Lysis Buffer** al tubo y mezclar bien agitando en vórtex. Centrifugar a 10.000 x g durante un minuto para eliminar los residuos insolubles.
- 5) Transferir el supernadante a **Zymo-Spin™ IIC Column** en un **Collection Tube**. Centrifugar a 10,000 x g por un minuto.
- 6) Agregar 200 µl de **DNA pre-wash Buffer** a la columna de centrifugación en un nuevo **Collection tube**. Centrifugar a 10,000 x g por un minuto.
- 7) Agregar 400 µl de **g-DNA Wash Buffer** a la columna de centrifugación. Centrifugar a 10,000 x g por un minuto.
- 8) Transferir la columna de centrifugación a un tubo de microcentrífuga limpio.
- 9) Añadir  $\geq 50$  µl de **DNA Elution Buffer** o agua (por ejemplo, añadir 200 µl si el muestreo de 25 mg de tejido) a la columna de centrifugación. Incubar 2-5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a toda velocidad durante 30 segundos para eluir el ADN. El ADN eluido se puede utilizar inmediatamente o almacenar  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  para uso futuro.

## Anexo 2. Protocolo de electroforesis

**Cuadro 1.** Soluciones para la electroforesis

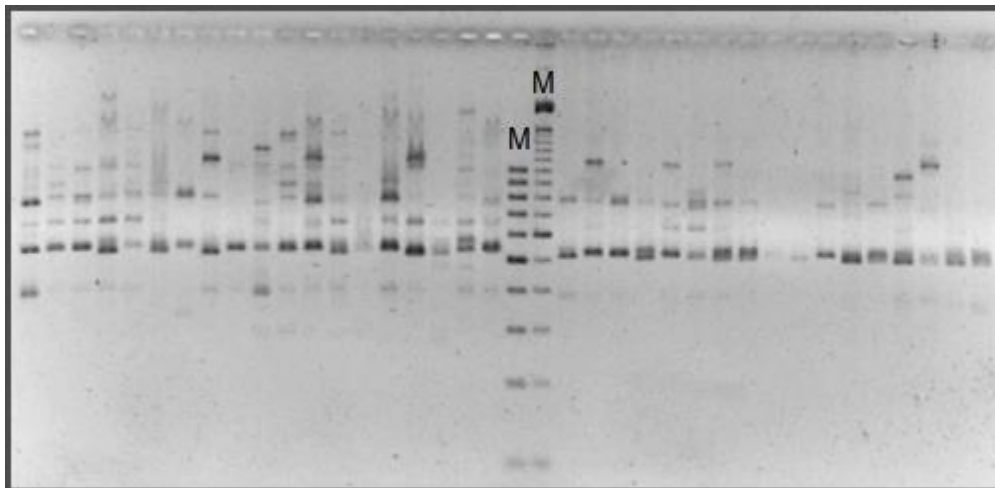
<b>TBE</b>	1X
Tris HCl	10.8 g
Acido Bórico	5.4 g
EDTA 0.5 M pH 8	4 MI
H <sub>2</sub> O destilada	1000 MI
<b>Gel de agarosa (2:1)</b>	2%
Agarosa ultrapura	1.4 g
Agarosa bajo punto de fusión (LMP)	0.6 g
TBE 1X	100 MI
<b>Amortiguador de carga 6X</b>	10 MI
Azul de Bromofenol	25 mg
Xylene Cyanol	25 mg
Glicerol	3 MI
H <sub>2</sub> O destilada	10 MI

### Protocolo:

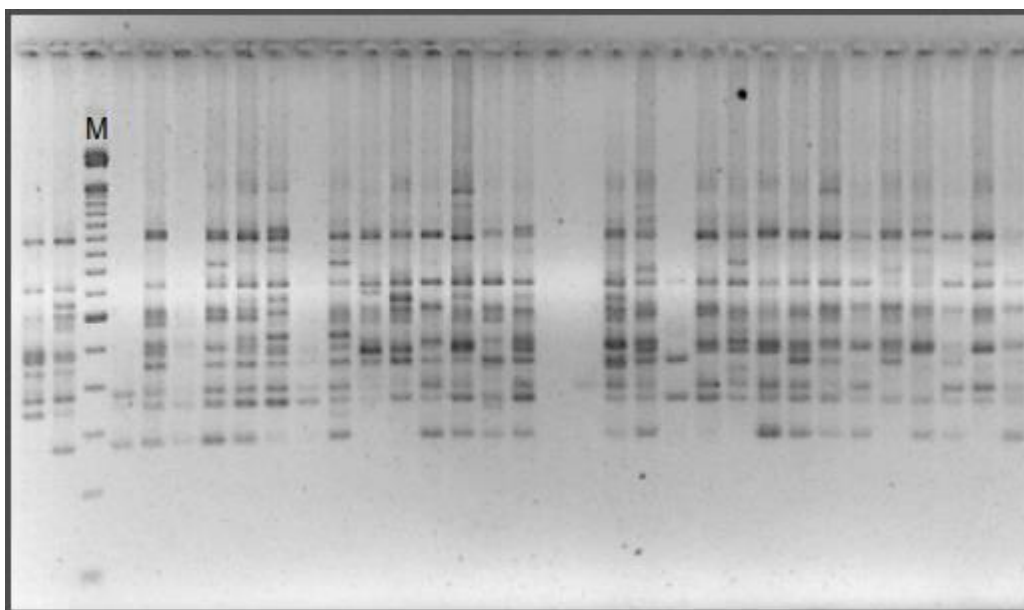
1. Elaborar un gel al 2% de agarosa ultra pura (1.4 g) y agarosa de bajo punto de fusión (0.6 g) (LMP) en una proporción 2:1.
2. Agregar 100 mL de TBE 1X y disolver por medio de calor.
3. Depositar la agarosa disuelta en el molde de la cámara de electroforesis, la cual contiene el peine para marcar los pozos.
4. Dejar polimerizar por 15 min aproximadamente a temperatura ambiente.
5. Montar el gel en la cámara de electroforesis horizontal, y añadir TBE 1X hasta cubrir el gel.
6. Añadir a cada muestra de PCR con 3 µL de amortiguador de carga 6x y mezclar.
7. Cargar 10 µL de cada muestra en los pozos del gel y 3 µL en de marcador de 100pb (Invitrogene).
8. Iniciar la electroforesis a 85 Volts por 2:30 h.
9. Teñir por inmersión el gel con bromuro de etidio (0.2mg/mL) por 15 min.
10. Colocar el gel en el transiluminador y fotodocumentar los resultados obtenidos.

\*El presente protocolo fue empleado para los marcadores ISSR, para el trabajo con marcadores EST-SSR y SSR se empleó solo la agarosa ultrapura con las condiciones de acuerdo a cada tipo de marcador.

Anexo 3. Patrones de amplificación para los siete marcadores ISSR empleados en el presente estudio.



**Figura 1A.** Patrón de amplificación del iniciador (CT)<sub>8</sub> RG. M: marcador de 100 pb.



**Figura 2A.** Patrón de amplificación del iniciador (AG)<sub>8</sub>. M: marcador de 100 pb.

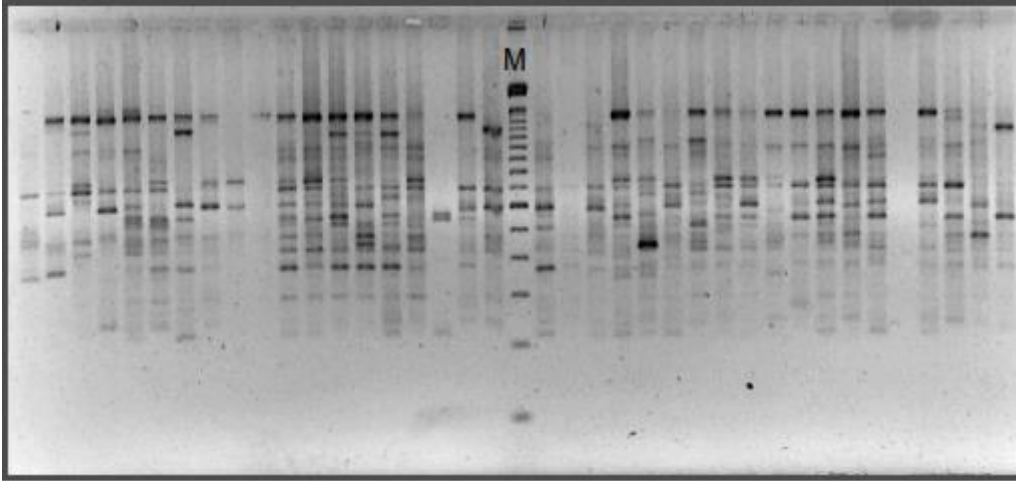


Figura 3A. Patrón de amplificación del iniciador  $(GA)_8C$ . M: marcador de 100 pb.

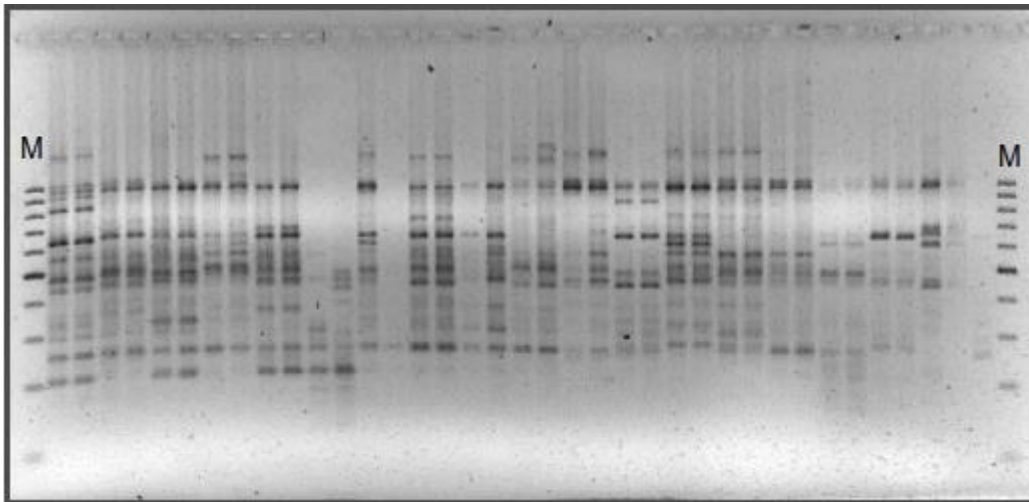


Figura 4A. Patrón de amplificación del iniciador  $(GA)_8YG$ . M: marcador de 100 pb.

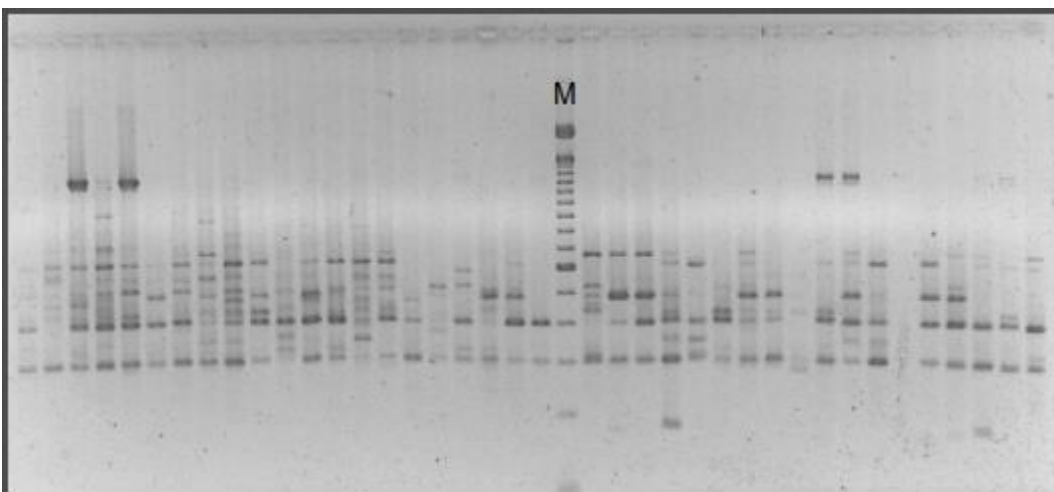
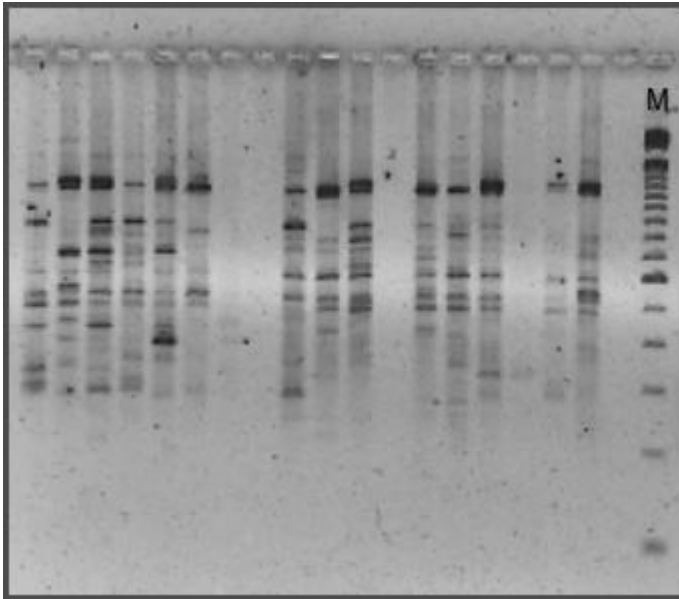


Figura 5A. Patrón de amplificación del iniciador  $(AC)_8YG$ . M: marcador de 100 pb.



**Figura 6A.** Patrón de amplificación del iniciador (CA)<sub>n</sub> RT. M: marcador de 100 pb.