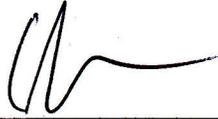


TESIS DEFENDIDA POR  
**Tzitziki del Rosario Loeza Quintana**  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



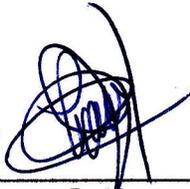
---

Dr. Christophe Herbinger  
*Codirector del Comité*



---

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla  
*Codirector del Comité*



---

Dra. Carmen Paniagua Chávez  
*Miembro del Comité*



---

Dr. Axayácatl Rocha Olivares  
*Miembro del Comité*



---

Dra. Beatriz Cordero Esquivel  
*Coordinador del programa de posgrado  
en Acuicultura*



---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales  
*Director de Estudios de Posgrado*

10 de Octubre de 2011

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
EN ACUICULTURA**

---

**DIFERENCIAS GENÉTICAS ENTRE POBLACIONES DE OSTRA PERLERA  
*Pinctada margaritifera* EN LA POLINESIA FRANCESA Y RELACIONES CON  
SU CULTIVO**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

**TZITZIKI DEL ROSARIO LOEZA QUINTANA**

Ensenada, Baja California, México, Octubre del 2011.

**RESUMEN** de la tesis de **Tzitziki del Rosario Loeza Quintana**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ACUICULTURA. Ensenada, Baja California, México. Octubre 2011.

**Diferencias genéticas entre poblaciones de ostra perlera *Pinctada margaritifera* en la Polinesia Francesa y relaciones con su cultivo**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Christophe Herbinger  
Codirector

---

Dr. Miguel Ángel del Río Portilla  
Codirector

La ostra perlera de labios negros *Pinctada margaritifera* es una especie cultivada de manera importante en los atolones de la Polinesia Francesa debido a la producción de perlas negras. El cultivo de esta especie se basa totalmente en la colecta de larvas del medio natural, por lo que, es altamente dependiente de los recursos genéticos disponibles en las poblaciones silvestres. La colecta de larvas del medio natural es altamente variable en tiempo y espacio, representando un problema para el cultivo. Como resultado, durante el desarrollo inicial de esta industria se realizaron importantes translocaciones de juveniles entre varios atolones. La actividad del cultivo y el movimiento de organismos entre los atolones pudo haber dado lugar a la homogeneización genética de poblaciones silvestres previamente identificadas. Estas poblaciones fueron caracterizadas anteriormente con base a un reducido número de marcadores nucleares anónimos exhibiendo poca variabilidad (Arnaud-Haond *et al.*, 2004, 2008). En este estudio se presenta un análisis de 19 localidades de estudio en la Polinesia Francesa e islas Salomón, utilizando ocho microsatélites hipervariables para evaluar con mayor precisión la estructura genética de las poblaciones de *P. margaritifera* y el potencial de impacto de las transferencias de larvas anteriores entre atolones encontrando altos valores de diversidad genética. De acuerdo con nuestros resultados, existe estructura genética de la especie *P. margaritifera* en la región de la Polinesia Francesa y se confirmó la divergencia genética de la población de las islas Marquesas respecto a las poblaciones de los archipiélagos Tuamotu-Gambier, islas de la Sociedad e islas Salomón.

**Palabras clave:** cultivo de perlas, translocaciones, microsatélites, genética de poblaciones.

**ABSTRACT** of the thesis presented by **Tzitziki del Rosario Loeza Quintana** as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in AQUACULTURE. Ensenada, Baja California, Mexico. October 2011.

**Genetic differences between pearl oyster *Pinctada margaritifera* populations in French Polynesia and relations with the culture practices**

Abstract approved by:

---

Dr. Christophe Herbinger  
Codirector

---

Dr. Miguel Ángel del Rio Portilla  
Codirector

**ABSTRACT**

The black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera* is an important species cultivated in French Polynesia atolls for the production of black pearls. The culture of this species is entirely based on natural spat collection and is therefore mostly dependent upon genetic resources available in the wild populations. Natural spat collection is spatially and temporally variable and spat collection failure can happen. As a result, significant spat translocations occurred among atolls during the early development of this industry. Culture activity and movement of organisms between the atolls may have resulted in genetic homogenization of previously differentiated wild populations. These wild populations were previously characterized based on a small number of anonymous nuclear markers exhibiting limited variability (Arnaud-Haond *et al.*, 2004, 2008). In this study, we present an analysis of 19 sampling sites in French Polynesia and Solomon islands. We used eight hyper-variable microsatellite markers to evaluate more finely the present genetic structure of populations of *P. margaritifera* and the potential impact of previous spat transfers. We found high genetic diversity and a genetic structuration of *P. margaritifera* in French Polynesia. We also confirm the Marquesas Islands strong genetic divergence from the Tuamotu-Gambier archipelago, Society islands and Solomon islands.

**Keywords:** pearl culture, translocations, microsatellite, population genetics

## DEDICATORIA

A quienes han estado siempre a mi lado...

José Luis A. Loeza López y Ma. Del Socorro Quintana Andrade

por guiarme para hacer de cada trayecto una meta cumplida,

y por que gracias a ustedes estoy aquí hoy.

A mis niñas...

Catzingari y Xhangari

Por todo el tiempo y los momentos que hemos estado lejos

pero que siempre las he llevado conmigo.

Los Amo!

*..... a los amantes de las perlas negras*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, por la beca otorgada a lo largo de mis estudios de maestría y mi estancia de investigación.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada CICESE, por todo el apoyo brindado durante este tiempo, así como también al Departamento de Acuicultura. Gracias por darme esta gran oportunidad de formación académica y científica.

Este proyecto se realizó con el apoyo de la beca ELAP del “Department of Foreign Affairs and International Trade” de Canadá y gracias al financiamiento de la “Agence Nationale de la Recherche” en Francia y del “Service de la Periculture” en la Polinesia Francesa. GRACIAS!

Quiero agradecer infinitamente a mi director, el Dr. Christophe Herbinger por la confianza y la gran oportunidad que me dio para integrarme en el proyecto, que mas que un proyecto de Tesis ha sido un proyecto de total aprendizaje en muchos aspectos. Gracias Christophe por todo el apoyo, la hospitalidad, por todas las enseñanzas y el tiempo que te has tomado conmigo para hacer de este trabajo todo un éxito. Gracias por compartir conmigo el maravilloso mundo de las perlas.

Gracias también a mi director en CICESE, el Dr. Miguel Ángel del Rio por aceptar ser parte de este proyecto. Gracias por tu tiempo, apoyo, dedicación y por todas las aportaciones al trabajo y a mi formación académica.

A los miembros del comité, la Dra. Carmen Paniagua y el Dr. Axayácatl Rocha. Gracias por todos sus comentarios y contribuciones para enriquecer y mejorar mi trabajo. Gracias también por su disposición y ayuda en todas las cuestiones técnicas.

A la Dra Beatriz Cordero, por toda su ayuda y apoyo desde un inicio.

A la universidad de DALHOUSIE, gracias por el apoyo y todas las facilidades brindadas durante mi estancia y por su gran hospitalidad . Gracias a todas y cada una de las personas en Dalhousie por su amabilidad y porque siempre me recibieron con una sonrisa.

Al personal de “Service de la Periculture” en Papeete, Tahiti y al “Centre Oceanographique du Pacifique”, IFREMER en Vairao, Taiti por su colaboración para la colecta de muestras.

A Vincent Vonau (COP, IFREMER) por su ayuda para la identificación de las muestras.

Gracias también a Lorraine Hamilton del “Bedford Institute of Oceanography” (NS, Canadá) por su valiosa ayuda con los protocolos de extracción y amplificación.

A todos los compañeros del Gene Probe Laboratory en Dalhousie, fue un gran placer trabajar en su compañía y en tan agradable ambiente de trabajo.

Un agradecimiento especial para Vicky Yaroshewski. Gracias Vicky fantástica por todo lo que me enseñaste, también por tu gran paciencia mientras aprendía y por supuesto por tu gran aportación al proyecto. Por tu gran amistad y por todos los excelentes momentos que compartí en tu compañía dentro y fuera del Laboratorio.

A la *pequeña* Halifax por regalarme tantas buenas experiencias y por esa gran hospitalidad que por varios meses me hizo sentir como en casa. Y gracias también a todos los buenos amigos con quienes compartí mi estancia. A la familia Luques por su buena amistad y hospitalidad.

Al grupo de extraordinarias personas que se convirtieron en una parte muy importante de mi vida y con quienes compartí momentos inolvidables: Anahí e Iván, Sergio, Mau, Camilo, Pablo, Roberto, Noelia y Axel, Jorge, Bere, Roberto y Yani. Gracias amigos por las excelentes muestras gastronómicas, por enriquecer mi vocabulario con tantas variantes del castellano, porque de todos ustedes aprendí mucho.

A los buenos amigos que me llevo de Ensenada: Ana y Sergio, Leo, Andrea, Carlos Abraham, Felix, Samantha y la pequeña Sofi. Gracias por todos los buenos momentos que pasamos juntos y por ser unas personitas maravillosas.

No podía olvidar agradecer a Gina y a Justin por su gran ayuda técnica para terminar a tiempo!!

Y a todas las personas que me apoyaron y me acompañaron durante este trayecto. Gracias!

Para la persona que vino a formar parte tan importante en mi vida: Gracias Justin por hacer que todo sea aun mejor, por ayudarme en cualquier cosa y por desvelarte conmigo mientras yo escribía una tesis. Gracias Jus por tomar esta aventura juntos a pesar de lo que implicaba y por darle un giro hermoso a mi vida, pero sobre todo por el apoyo incondicional y también por dejar que corriera mis análisis en tu PC jeje... ILU Justino!

Finalmente el mas grande agradecimiento a mi familia. Gracias por todo el apoyo que me han dado siempre. Gracias Papá por todas las consultas emocionales, médicas, académicas y por la gran "lista de riesgos" que no podía olvidar, por estar siempre a mi lado y por el Gran Ejemplo que nos has dado. Gracias Mamá por motivarme continuamente a seguir adelante y conseguir todo lo que me proponga a pesar de cualquier obstáculo, gracias por estar siempre conmigo apoyándome en todo.

A mis hermanas, por todas las charlas que siempre me dejan con una gran sonrisa, gracias por ser la luz que puede iluminar el día mas oscuro y el color que pinta una pagina en blanco, por ser mi mas grande motivación. Gracias niñas porque durante todos estos años me han demostrado que no importa que tan lejos me encuentre... siempre están tan cerca. Las amo hermosas!

## CONTENIDO

	Página
Resumen .....	i
Abstract.....	ii
Dedicatorias .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Contenido.....	vi
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	ix
I. Introducción.....	1
I.I Generalidades de la especie <i>Pinctada margaritifera</i> .....	1
I.II Importancia económica.....	2
I.III Características del cultivo.....	3
I.IV Genética poblacional de <i>Pinctada margaritifera</i> .....	4
II. Antecedentes.....	6
III. Hipótesis.....	9
IV. Objetivos.....	9
IV.I Objetivo general.....	9
IV.II Objetivos particulares.....	9
V. Materiales y Métodos.....	10
V.I Obtención de las muestras.....	10
V.II. Para caracterizar genéticamente individuos de <i>Pinctada margaritifera</i> provenientes de distintos atolones en 6 archipiélagos.....	10
V.II.I Extracción de ADN, .....	10
V.II.II Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Electroforesis .....	11
V.II.III Análisis de los microsatélites.....	13
V.III Para evaluar la diversidad genética entre poblaciones a distinta escala espacial .....	14
V.III.I Diversidad y desviación del Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	14
V.III.II Diferenciación genética entre localidades.....	16

**CONTENIDO (continuación)**

	<b>Página</b>
<b>VI. Resultados</b> .....	19
<b>VII. Discusión</b> .....	39
<b>VII.I Diversidad genética</b> .....	39
<b>VII.II Estructura genética</b> .....	42
<b>VII.III Impacto de las translocaciones</b> .....	49
<b>VIII. Conclusiones</b> .....	51
<b>IX Recomendaciones</b> .....	52
<b>X. Literatura citada</b> .....	53
<b>XI. Anexos</b> .....	68

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura. 1 Rango de distribución de la ostra perlera de labios negros <i>Pinctada margaritifera</i> (Imagen modificada de Wada y Tëmkin, 2008).	1
Figura. 2 Neibor-Joining Cladograma de las relaciones entre localidades de <i>Pinctada margaritifera</i> basado en distancias Cavalli-Sforza y Edwards (1967).	36
Figura. 3 Neibor-Joining Cladograma de las relaciones entre localidades de <i>Pinctada margaritifera</i> basado en distancias Cavalli-Sforza y Edwards (1967) corregidas para alelos nulos mediante el método INA (Chapuis y Estoup, 2007).	37
Figura. 4 Patrón de corrientes en la región de la Polinesia Francesa. A) durante el invierno, B) durante el verano. SEC: Corriente Sur Ecuatorial, MCC: Contra Corriente de las Marquesas, SECC: Contra Corriente Sur Ecuatorial, STCC: Contra Corriente Sur Tropical (Imagen modificada de Martinez <i>et al.</i> , 2009).	46

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
Tabla I. Localidades de estudio de <i>Pinctada margaritifera</i> en la Polinesia Francesa e Islas Salomón	11
Tabla II. Loci amplificados para <i>Pinctada margaritifera</i> . Se indican las secuencias de los primers utilizados, la temperatura de hibridación durante la PCR, número de acceso en GeneBank, el motivo de repetición, el intervalo de tamaño de bases y el número de alelos detectados en el presente estudio.	15
Tabla III. Variabilidad genética de las 19 localidades de estudio de <i>Pinctada margaritifera</i> mediante 8 microsatélites. Número de alelos por locus(A), Diversidad genética(D), Heterocigocidad esperada(He), Heterocigocidad observada(Ho), Índice $F_{IS}$ , Nivel de significancia para el ajuste al equilibrio de H-W* e Índice Garza-Williamson (G-W).	21
Tabla IV. Estimación de la frecuencia de alelos nulos en <i>Pinctada margaritifera</i> empleando el algoritmo Brookfiel 2 (Brookfield, 1996).	29
Tabla V. Estadísticos $F$ (Weir y Cockerham, 1984) para <i>Pinctada margaritifera</i> en 19 localidades del Indopacífico	30
Tabla VI. Comparaciones pareadas del índice de fijación $F_{ST}$ entre pares de muestras de <i>Pinctada margaritifera</i> . Debajo de la diagonal valor de $F_{ST}$ y sobre la diagonal su valor P, en negritas los valores significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni. Abreviaturas según Tabla I.	33
Tabla VII. Comparaciones pareadas del Índice de fijación $F_{ST}$ entre pares de muestras de <i>Pinctada margaritifera</i> después de la corrección de alelos nulos. Debajo de la diagonal valor de $F_{ST}$ y sobre la diagonal su valor P, en negritas los valores significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni. Abreviaturas según Tabla I.	34
Tabla VIII. Comparaciones pareadas del índice de fijación $R_{ST}$ entre pares de muestras de <i>Pinctada margaritifera</i> . Debajo de la diagonal valor de $R_{ST}$ y sobre la diagonal su valor P, en negritas los valores significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni. Abreviaturas según Tabla I.	35
Tabla IX. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para <i>Pinctada margaritifera</i>	36

# I INTRODUCCIÓN

## I.I Generalidades de la especie *Pinctada margaritifera*

La ostra perlera de labios negros *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758) se distribuye de manera natural a lo largo de todo el Indo-Pacífico desde el Mar Rojo hasta el Pacífico central (Sims, 1993a; Arnaud-Haond *et al.*, 2002) (Fig.1). Se le encuentra desde zonas someras hasta 40 metros de profundidad en bahías y zonas protegidas de los arrecifes de coral al interior de las lagunas de los atolones, aunque en ocasiones se les ha encontrado también a lo largo de la pendiente externa (Arnaud-Haond *et al.*, 2003a). Es fuertemente dependiente de sustratos rocosos y formaciones de coral a las cuales se adhieren fuertemente mediante el biso (Sims, 1992). La mayor abundancia de esta especie ha sido reportada en las lagunas de los atolones del Este de las islas Polinesias, donde se han registrado hasta 5 millones de individuos en la laguna (Sims, 1992).

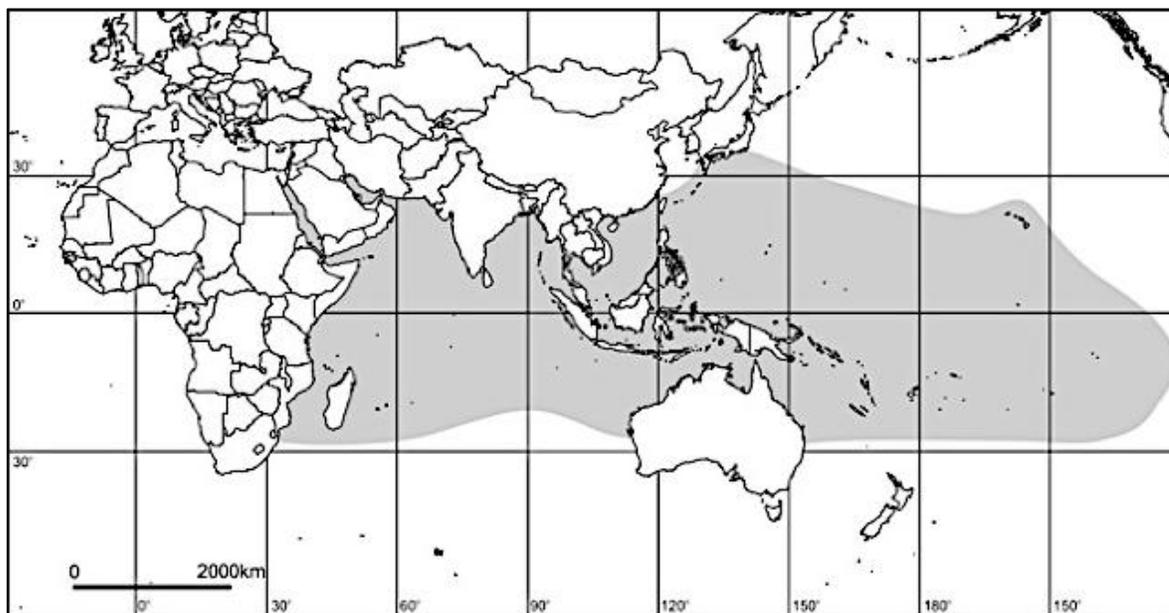


Figura. 1 Rango de distribución de la ostra perlera de labios negros *Pinctada margaritifera* (Imagen modificada de Wada y Tëmkin, 2008).

La especie *Pinctada margaritifera* es hermafrodita protándrica, alcanza su madurez sexual a los dos años y presenta el cambio de sexo hasta el cuarto o quinto año. En la región de la Polinesia Francesa se reproduce a lo largo de todo el año (Sims, 1993a; Pouvreau, *et al.*, 2000a). Presenta un desarrollo larval planctotrófico que se extiende hasta cuatro semanas (28 días) (Sims, 1993a). A los 22 días aproximadamente las larvas desarrollan el órgano de los sentidos que marca la entrada al estadio pediveliger, etapa en la que la larva desarrolla un pie que le permite la búsqueda de un sustrato para su fijación. Después de la metamorfosis, las larvas se unen al sustrato mediante el biso (Sims, 1994; Pouvreau y Prasil, 2001; Doroudi y Southgate, 2003). A partir del asentamiento es una especie filtradora de rápido crecimiento llegando a obtener juveniles de 10 a 12 cm en dos años (Sims, 1990; Gervis y Sims, 1992).

La superficie externa de su concha exhibe una coloración que va de café grisáceo oscuro a negro con manchas blancas dispuestas radialmente. La superficie interna presenta una capa nacarada plateada iridiscente y en el margen de la concha un borde negro no nacarado (Bueno *et al.*, 1991; Sims, 1993a).

## **I.II Importancia económica**

La ostra perlera *P. margaritifera* es un recurso muy importante a lo largo de todo el Indo-Pacífico, principalmente en la Polinesia Francesa, Islas Cook y Okinawa (Sims, 1993a). Donde de manera tradicional el recurso se ha utilizado como alimento, en la elaboración de joyería, como ornato, herramientas, anzuelos y principalmente para la producción de perlas negras (Lane *et al.*, 2003).

La producción de perlas negras a partir del cultivo de *P. margaritifera* se desarrolló inicialmente en el siglo XX en la Polinesia Francesa, donde creció rápidamente hasta convertirse en la segunda industria más importante en los últimos 20 años, superada únicamente por el turismo. El cultivo de la especie proporciona empleo a cerca de 7000 personas en más de 1000 granjas distribuidas en 34 atolones (Arnaud-Haond *et al.*, 2002, 2003b; Lane *et al.*, 2003; Bondad-Reantaso *et al.*, 2007). Esta industria logró generar ganancias de \$135.3 millones

de dólares en 1994 (Fassler, 1995) y en el 2000 llegó a los \$200 millones de dólares (Lane *et al.*, 2003).

### **I.III Características del cultivo**

Tradicionalmente, el cultivo de *P. margaritifera* en el Pacífico Sur se ha basado en la colecta de larvas provenientes del medio natural (Sims, 1993a), ya que es el método más sencillo y económico de obtener los juveniles que son llevados a los sistemas de engorda (Lane *et al.*, 2003) donde permanecen en crecimiento hasta alcanzar la talla adecuada para la producción de perlas (Sims, 1993a).

Los colectores de larvas consisten en cuerdas colocadas a una profundidad de tres metros, las cuales proporcionan una superficie para el asentamiento una vez que las larvas han completado su etapa pelágica. Después de seis meses, dichas larvas se colocan en sistemas de preengorda que consisten en bandejas de plástico o redes. Cuando las ostras alcanzan una longitud de 50-60mm se transfieren a los sistemas de engorda, donde se cuelgan sobre cuerdas o redes directamente, o se colocan en bolsas dispuestas a lo largo de una cuerda. A medida que las ostras crecen es necesario reducir la densidad del cultivo para aumentar el espacio entre ellas mientras crecen. A la edad de dos años, cuando los organismos llegan a medir entre 90 y 120 mm se considera que han alcanzado la talla óptima para inducir la formación de una perla cultivada; esto se lleva a cabo introduciendo un núcleo y un injerto de tejido proveniente del manto (Pouvreau *et al.*, 2000a; Lane *et al.*, 2003). Posteriormente se requieren entre 16 meses y dos años para producir una perla de 0.8 mm de espesor del nácar, tamaño mínimo requerido para su exportación (Southgate *et al.*, 2008).

Esta actividad se encuentra en plena expansión y es gracias a la gran abundancia de larvas en el medio natural en algunos atolones y su disponibilidad para la colecta lo que ha llevado a la Polinesia Francesa a convertirse en el líder del cultivo de perlas negras (Southgate *et al.*, 2008). Sin embargo, la colecta de semilla del medio natural es altamente variable en tiempo y espacio (Friedman *et*

*al.*, 1998; Friedman y Bell, 1999). Lo anterior ha provocado que los cultivadores realicen actividades de translocación de larvas entre los atolones para satisfacer las necesidades de los cultivos. Considerando la posible reproducción de las ostras en cultivo, la translocación de individuos a gran escala entre los diferentes archipiélagos podría causar un impacto en las poblaciones al permitir su homogeneización, afectando su variabilidad y estructura genética (Arnaud-Haond *et al.*, 2002, 2004).

#### **I.IV Genética poblacional de *Pinctada margaritifera***

En los invertebrados marinos que poseen un gran tamaño poblacional, fecundación externa, alta fecundidad, extenso estadio larval pelágico que les permite un amplio flujo genético durante este periodo, y finalmente una etapa adulta bentónica durante la cual la baja o nula movilidad favorece un proceso de adaptación local. Debido a que este es el caso de *P. margaritifera*, se esperaría encontrar poblaciones con ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg, así como con una baja divergencia genética (Palumbi y Wilson 1990; Palumbi, 1992; Arnaud-Haond *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha encontrado una estructuración genética a pequeña escala espacial o temporal en varias especies que presentan una amplia capacidad de dispersión larval y homogeneidad genética a gran escala (Johnson y Black 1984; Watts *et al.*, 1990; David *et al.*, 1997b; Johnson y Wernham 1999). Dicha subestructuración a pequeña escala puede deberse a diferentes causas como la selección de genotipos antes o después del asentamiento, diferentes orígenes genéticos de las larvas reclutadas (Johnson y Black 1982, 1984; David *et al.*, 1997a,b), debido al reclutamiento estocástico que se da en el océano (Roughgarden *et al.*, 1988; Gaines y Bertness, 1992), o debido a la retención local de larvas en algunas zonas específicas, así como por la influencia de las corrientes oceánicas locales o por barreras hidrográficas que producen aislamiento de hábitat (Palumbi y Wilson 1990; Palumbi, 1992).

La existencia de patrones de estructuración genética a pequeña y gran escala, así como la variabilidad y flujo genético entre las poblaciones es altamente

importante para la gestión eficaz de las poblaciones silvestres y su posterior explotación comercial a través de la acuicultura (Benzie, 2000, Wada y Jerry, 2008). Desde su surgimiento, las técnicas moleculares han sido empleadas para el estudio de la estructura genética de las poblaciones utilizando diversos tipos de marcadores como aloenzimas, genes mitocondriales (ADNmt), el polimorfismo de un solo nucleótido, la amplificación aleatoria de ADN polimórfico, marcadores nucleares anónimos (MNA) y microsatélites.

En el caso de la especie *P. margaritifera* se han realizado estudios basados en aloenzimas, ADNmt y MNA que han dado información preliminar sobre la variabilidad y composición genética de sus poblaciones (Blanc *et al.*, 1985; Arnaud-Haond *et al.*, 2002, 2003a,b, 2004, 2008). Sin embargo es necesario evaluar marcadores moleculares con mayor grado de variabilidad como los microsatélites, que permitan precisar y ampliar el conocimiento previo.

Los microsatélites consisten en múltiples repeticiones de secuencias cortas, el tamaño de estas secuencias, o motivo de repetición, varía de uno a seis pares de bases. Las variaciones en la longitud del fragmento entre individuos da lugar a diferentes alelos, por lo que exhiben una amplia variación alélica siendo altamente polimórficos (Tautz, 1989; Litt y Luty, 1989; Wright, 1993). Los microsatélites se distribuyen a lo largo de la totalidad del genoma de todos los cromosomas, encontrándose dentro de los intrones, exones o secuencias intergénicas o no codificantes (Liu *et al.*, 2001; Liu y Cordes, 2004). Son marcadores codominantes que se heredan de forma mendeliana y presentan una tasa de mutación de  $10^{-2}$  por generación aunque puede variar (Weber y Wong, 1993; Ashley y Dow, 1994; Crawford y Cuthbertson, 1996; Liu y Cordes, 2004). En general se les considera como marcadores neutrales es decir, que no están sujetos a selección (Li *et al.*, 2002). Debido a las anteriores características estos loci son usados comúnmente para la identificación de individuos y en análisis poblacionales para detectar estructura genética, patrones de subdivisión geográfica y estimar niveles de flujo genético (Tautz 1989; Avise, 2004; Astaneï, *et al.*, 2005; Geist y Kuehn, 2005; Lind *et al.*, 2007; Zhan *et al.*, 2009).

## II. ANTECEDENTES

Los estudios a cerca de la ostra perlera de labios negros *P. margaritifera* están directamente relacionados con su importancia acuícola. Se han realizado estudios sobre su alimentación (Robert *et al.*, 1998; Southgate *et al.*, 1998; Pouvreau *et al.*, 1999; Yukihiro *et al.*, 1999; Loret *et al.*, 2000; Pouvreau *et al.*, 2000c,d; Doroudi *et al.*, 2003), tasas de crecimiento (Coeroli *et al.*, 1984; Elnaeim, 1984; Nasr, 1984; Coeroli y Mizuno, 1985; Sims, 1993b, 1994; Pouvreau *et al.*, 2000b; Pouvreau y Prasil, 2001), ciclo reproductivo (Thielley *et al.*, 1993; Pouvreau *et al.*, 2000a; Juan-Juan, 2007) y el reclutamiento de larvas (Friedman *et al.*, 1998; Friedman y Bell, 1999). También se han llevado a cabo algunos estudios sobre sanidad (Loret *et al.*, 2000; Comps *et al.*, 1999, 2001) y sobre su estructura poblacional (Kimani y Mavuti, 2002; Keenan *et al.*, 2006).

En cuanto al estudio y conocimiento del nivel de variabilidad y estructura genética de las poblaciones de la especie *P. margaritifera*, se han llevado a cabo diversos estudios empleando distintos marcadores moleculares. Los primeros estudios emplearon aloenzimas como marcador molecular para estudiar la variación de las ostras de la Polinesia Francesa, Mauricio, Kiribati, islas Cook, Japón y el este de Australia, sugiriendo la posible existencia de diferenciación genética dentro de las localidades y entre diferentes agrupaciones de ostras dentro de un mismo atolón (Blanc, 1983; Blanc *et al.*, 1985; Durand y Blanc, 1986, 1989; Durand *et al.*, 1993; Benzie y Ballment, 1994).

Posteriormente, Arnaud-Haond y colaboradores (2002) desarrollaron cinco marcadores nucleares anónimos con polimorfismo de longitud y evaluaron su utilidad en el análisis genético de *P. margaritifera* y la posibilidad de emplearlos en otras especies del género *Pinctada*. Dichos marcadores fueron utilizados en un análisis de la estructura poblacional de la especie, donde se compararon los resultados obtenidos para genes mitocondriales, aloenzimas y marcadores nucleares anónimos (MNA) (Arnaud-Haond *et al.* 2003a). Los resultados de aloenzimas y MNA confirmaron un patrón de estructuración entre las poblaciones

del Pacífico central y occidental con una fuerte evidencia de restricción del flujo genético entre los archipiélagos y en algunos caso entre islas dentro de archipiélagos (Blanc *et al.*, 1985; Durand y Blanc, 1989; Benzie y Ballment, 1994; Arnaud-Haond *et al.*, 2003a). Sin embargo, los resultados empleando ADNmt no detectaron heterogeneidad significativa entre los archipiélagos (Arnaud-Haond *et al.*, 2003a), pero sugirieron un corto tiempo de coalescencia entre los haplotipos lo que es a menudo indicativo de un cuello de botella reciente.

Mediante el empleo de MNA se realizó también un análisis de la estructura y variabilidad genética entre ostras silvestres y de cultivo de *P. margaritifera* en atolones del archipiélago Tuamotu-Gambier, a partir del cual no se encontraron diferencias significativas entre las muestras silvestres y de cultivo (Arnaud-Haond *et al.*, 2003b).

Posteriormente Arnaud-Haond y colaboradores (2004) evaluaron el impacto de la colecta de semilla y translocación de larvas sobre la variabilidad y estructura genética de *P. margaritifera*. De manera interesante los autores observaron homogeneidad genética entre poblaciones previamente diferenciadas dentro y entre los archipiélagos Tuamotu-Gambier. Tales diferencias fueron atribuidas al efecto que han causado la recolección y translocación de semilla en los últimos 20 años (Arnaud-Haond *et al.* 2004). Esta observación ha provocado un gran interés en el estudio de la compleja estructura de las poblaciones de esta región que puede ser amenazada por procesos antropomórficos.

Se estudió la estructura genética de esta especie a diferentes escalas espaciales en el Indo-Pacífico mediante MNA encontrando que a gran escala (>1000km) hay una diferenciación genética de las poblaciones, pero a mediana escala (10-1000km) se encontró homogeneidad entre las muestras. Sin embargo a pequeña escala (<10km) se encontraron importantes niveles de diferenciación genética, con algunas excepciones (Arnaud-Haond *et al.*, 2008).

Recientemente Herbinger y colaboradores (2006) desarrollaron 10 marcadores microsatélites polimórficos específicos para la especie *P. margaritifera*, con potencial para evaluar de manera más precisa la estructura y variabilidad

genética en poblaciones silvestres y de cultivo, así como también el impacto que han tenido los eventos de translocación de larvas en la región de la Polinesia Francesa.

En este estudio analizamos muestras colectadas después de los eventos de translocación de larvas entre archipiélagos. El análisis se llevó a cabo mediante microsatélites, con el interés de obtener resultados más precisos de la estructura genética de las poblaciones de *P. margaritifera* en la región del Indo-Pacífico, y compararlos con los resultados obtenidos anteriormente por Arnaud-Haond y colaboradores (2004), para evaluar si la transferencia de juveniles entre atolones en la Polinesia Francesa ha producido un impacto considerable sobre el patrón de estructura y variabilidad genética natural de la especie en la región.

### III. HIPÓTESIS

Si la transferencia de juveniles de *Pinctada margaritifera* entre atolones de distintos Archipiélagos ha provocado un impacto sobre la estructura genética de las poblaciones silvestres, entonces se observará un patrón de homogeneidad genética entre poblaciones previamente diferenciadas.

### IV. OBJETIVOS

#### V.I Objetivo general

Evaluar si la transferencia de juveniles de *P. margaritifera* entre distintos atolones ha provocado un impacto sobre el patrón de estructuración genética en las poblaciones silvestres y de cultivo, mediante el empleo de microsatélites como marcadores moleculares

#### V.II Objetivos particulares

- a) Caracterizar genéticamente individuos de *P. margaritifera* provenientes de distintos atolones en 5 archipiélagos.
- b) Evaluar la diversidad genética entre poblaciones a distinta escala espacial.
- c) Comparar los resultados obtenidos con los datos generados a partir de aloenzimas y MNA (Arnaud-Haond, *et al.*, 2004).
- d) Evaluar si las prácticas de cultivo y translocación de organismos ha llegado a impactar genéticamente las poblaciones silvestres de la especie.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **V.I Obtención de las muestras**

Para este estudio se contó con 19 muestras de ostras perleras provenientes de 14 lagunas en la Polinesia Francesa y las Islas Salomón (en inglés Solomon); tres muestras provinieron de dos lagunas del Archipiélago de la Sociedad, 12 muestra provinieron de ocho lagunas de Tuamotu-Gambier, dos de las Islas Marquesas y dos de las Islas Salomón (Tabla I).

Las muestras se colectaron en su mayoría del medio natural (individuos adultos) mediante buceo tratando de abarcar diferentes asentamientos en áreas tan grandes como fue posible con la finalidad de obtener una muestra lo mas representativa posible de la población estudiada. En algunos casos se obtuvieron muestras de individuos adultos provenientes de granjas de cultivo y también juveniles provenientes de colectores para la captación de larvas (Tabla I).

Una porción del tejido del músculo abductor y/o del manto fue removido de cada organismo y preservado en etanol al 80% para posteriormente extraer el ADN. La extracción de ADN, las reacciones de PCR y los geles de electroforesis se llevaron a cabo en el laboratorio “Marine Gene Probe Laboratory”, en la Universidad de Dalhousie, Halifax, Nueva Escocia, Canadá.

### **V.II Para caracterizar genéticamente individuos de *P. margaritifera* provenientes de distintos atolones en 6 archipiélagos**

#### **V.II.I Extracción del ADN**

Se realizó la extracción de ADN total de cada organismo empleando el tejido del músculo y/o el tejido del manto. La extracción de ADN a partir del músculo se llevó a cabo mediante el Kit Qiagen Dneasy, mientras que el ADN del tejido del manto se obtuvo mediante el protocolo de extracción “Glassmilk” (Anexo 1) descrito por Elphinstone y colaboradores (2003), ya que este tejido está altamente pigmentado lo que dificulta la extracción con el Kit Qiagen Dneasy.

La extracción y la calidad del ADN se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.0% (80V, ~1.5 horas). El ADN se visualizó por fluorescencia de “GelGreen” con un transiluminador de luz UV.

**Tabla I. Localidades de estudio de *Pinctada margaritifera* en la Polinesia Francesa e Islas Salomón.**

ARCHIPIÉ-LAGO	ATOLÓN	REFERENCIA	TIPO DE COLECTA (*)	FECHA DE COLECTA	INDIVIDUOS
	Takaroa	TA	Colectores	18/09/99	28
TUAMOTU	Arutua1	AR-1	Silvestres	24/09/99	12
	Arutua2	AR-2	Silvestres	25/09/99	17
	Raroia1	RA-1	Silvestres	02/12/00	15
	Raroia2	RA-2	Colectoes	02/12/00	35
	Hereheretue	HERE	Silvestres	21/01/01	28
	Marutea	MRT-1	Silvestres	Dec 2000	12
	Marutea	MRT-2	Silvestres	24/03/01	29
	Kauehi	KA	Silvestres	14/03/02	19
	Takapoto1	TKP-1	Silvestres	01/06/02	37
	Takapoto2	TKP-2	Silvestres	02/06/02	54
GAMBIERS	Aukena	GB	Cultivo	03/09/99	22
MARQUESAS	Nuku Hiva	NH	Silvestres	10-	43
				12/09/2001	
	HivaOa	HO	Silvestres	14-	31
				15/09/2002	
SOCIEDAD	Mopelia1	MO-1	Cultivo	03/04/00	16
	Mopelia2	MO-2	Silvestres	28/09/2001	40
	Scilly	SCI	Colectores	29/09/01	40
SALOMÓN	Este	SOLO-1	Silvestres	jun-99	47
	Oeste	SOLO-2	Silvestres	jul-99	50
<b>TOTAL</b>					<b>575</b>

Los individuos provenientes de colectores corresponden a juveniles captados mediante colectores de larvas.

### V.II.II Reacción en Cadena de la Polimersa (PCR) y electroforesis

Por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificaron para todas las muestras nueve loci específicos para *Pinctada margaritifera*:

*Pmarg2, Pmarg7, Pmarg11, Pmarg37, Pmarg44, Pmarg45, Pmarg68, Pmarg77 y Pmarg79* (Herbinger *et al.*, 2006) (Tabla 2).

La amplificación de todos los loci se llevó a cabo empleando primers fluorescentes tipo HEX en reacciones con volumen final de 10µl, utilizando una concentración aproximada de 6ng de ADN, 0.2 mM de cada dNTP y 1x PCR amortiguador [New England Biolabs, 10 mM KCl, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100, pH 8.8 a 25 °C].

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Para los loci *Pmarg7, Pmarg37, Pmarg44, Pmarg45 y Pmarg68*: 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>; 0.2µM de cada F/R primer; y 0.5U de ADN Taq polimerasa (New England Biolabs).

Para los loci *Pmarg2, Pmarg77 y Pmarg79*: 2 mM de MgSO<sub>4</sub>; 0.3µM de cada F/R primer; y 1U de ADN Taq polimerasa (New England Biolabs).

Para el locus *Pmarg11*: 1.5 mM de MgSO<sub>4</sub>; 0.2µM de cada F/R primer; y 1U de ADN Taq polimerasa (New England Biolabs).

La reacción de PCR se realizó en un termociclador PTC-0200 con el siguiente programa: 2min a 95°C, 29 ciclos de 30seg a 95°C, 1min a la temperatura de hibridación según el par de primers utilizados (Tabla 2), 1min a 72°C, y finalmente a 72°C por 4min (Herbinger *et al.*, 2006).

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% (acrilamida:bisacrilamida 29:1, 7 mM Urea) utilizando 1X TBE (Tris Borato EDTA, 89mM de Tris base, 89mM de ácido Bórico, 2mM de EDTA, ajustado a un pH=8.3) como amortiguador. La electroforesis se corrió a 75W por aproximadamente 1:15h.

Posteriormente los geles fueron visualizados por medio de fluorescencia en el sistema de imágenes FMBIO II (Hitachi Software Engineering). Finalmente se determinó el tamaño de los alelos manualmente por inspección visual tomando como referencia un marcador de peso molecular conocido.

De acuerdo con observaciones previas hechas en el grupo de trabajo, se determinó que los loci *Pmarg44 y Pmarg79* (Herbinger *et al.*, 2006) amplificaban

alelos correspondientes al mismo microsatélite. Lo anterior se observó mediante la genotipificación de los alelos, ya que se identificaban los mismos genotipos en la mayoría de los individuos con ambos loci, con la única diferencia de que Pmarg79 amplificaba un fragmento 8pb mayor. Los genotipos obtenidos a partir de Pmarg44 fueron utilizados para complementar la base de datos del locus Pmarg79 en los casos donde la amplificación no fue exitosa debido a la presencia de alelos nulos. Una muestra fue considerada como homocigota para un supuesto alelo nulo si el intento de amplificación por PCR con ambos pares de primers fue improductivo pero fue positivo para otros loci. Finalmente únicamente Pmarg79 fue empleado en los siguientes análisis genéticos debido a que produjo mayor resolución.

### V.II.III Análisis de los microsatélites

Primeramente se analizaron los datos utilizando Excel Microsat Toolkit 3.1.1 (Park, 2001, disponible en: <http://acer.gen.tcd.ie/~sdepark/ms-toolkit> ) y MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004) con el objetivo de identificar la presencia de posibles errores en la genotipificación de los alelos como tartamudeo (*stuttering*), alelos falsos, amplificación preferencial de uno de los alelos y dominancia de alelos de menor tamaño (*dropout*), así como también eventuales errores tipográficos. El programa Excel Microsat Toolkit se utilizó para obtener los archivos con el formato requerido por los programas de análisis molecular.

Mediante MICRO-CHECKER 2.2.3 se evaluó si las deficiencias de heterocigotos podían ser explicadas por la presencia de alelos nulos. En estudios poblacionales, los alelos nulos pueden ser detectados por una prueba de Hardy-Weinberg (HW) mediante una cuidadosa observación de las proporciones obtenidas y las deficiencias de heterocigotos siempre y cuando estas no tengan otro origen como por ejemplo por efecto de Wahlund (Chapuis y Estoup, 2007). En seguida se estimaron las frecuencias de alelos nulos por cada muestra y locus de acuerdo con el estimador Brookfield 2 (Brookfield, 1996), el cual asume que una proporción del número de muestras no amplificadas se debe a la presencia de alelos nulos homocigotos (van Oosterhout *et al.*, 2004). Debido a que los alelos

nulos pueden provocar que los valores de los índices de fijación sean sobreestimados se emplearon varios métodos para minimizar sus efectos como se indica en cada caso (Chapuis y Estoup, 2007).

De acuerdo con las estimaciones de **MICRO-CHECKER 2.2.3**, cuando se detectó la presencia de alelos nulos, se modificó la base de datos etiquetando los alelos nulos **estimados por el algoritmo** Brookfield 2 (Brookfield, 1996) con un tamaño diferente al resto de los alelos. Esta nueva base de datos corregida para alelos nulos fue utilizada en los análisis posteriores como según se indique.

### **V.III Para evaluar la diversidad genética entre poblaciones a distinta escala espacial**

#### **V.III.I Diversidad genética y ajuste al Equilibrio de Hardy-Weinberg**

Las frecuencias alélicas y los parámetros de diversidad genética de cada locus para cada muestra: número de alelos por locus ( $A$ ), diversidad genética ( $D$ ) Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y la Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) se calcularon mediante el programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001).

La riqueza alélica ( $R_s$ , medida del número de alelos independiente del número de muestra) fue calculada utilizando el procedimiento de rarefacción implementado por el software FSTAT para una talla mínima de 7 individuos diploides. El índice  $F_{IS}$  (Weir y Cockerham, 1984) fue usado para calcular para déficit de heterocigotos para cada locus dentro de las localidades.

Las desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) para cada locus de cada muestra fueron probadas mediante el procedimiento de Guo y Thompson (1992) empleando una prueba análoga a la prueba exacta de Fisher. Esta prueba emplea un algoritmo aleatorio modificado de las cadenas de Markov. Se utilizó el programa ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010) con 1,000,000 pasos en las Cadenas de Markov y 100,000 pasos de “desmemorización” (del inglés dememorisations) locus por locus usando un valor de significancia de 0.05. Finalmente se realizó una corrección de Bonferroni para ajustar el valor crítico de significancia (Rice, 1989).

**Tabla II. Loci amplificados para *Pinctada margaritifera*. Se indican las secuencias de los primers utilizados, la temperatura de hibridación durante la PCR, número de acceso en GeneBank, el motivo de repetición, el intervalo de tamaño de bases y el número de alelos detectados en el presente estudio.**

Locus	Secuencia Primer	T (°C)	No. de Acceso GenBank	Motivo de repetición	Rango Tamaño (Tb)	No. Alelos
Pmarg2	F-GATCCTACGATGATTGCTTTGTC R-TGCAACGTATCAGGTTATGTTTG	52	DQ105992	(AC) <sub>20</sub>	151-255	39
Pmarg7	F-CGTCAGTGGGAGTCAAATATTCG R-AGGAAGGGCATGTCATAAGGAAC	52	DQ105993	(GACA) <sub>7</sub>	158-198	22
Pmarg11	F-TCTGTCCGTCCATCTAGC R-ACAATGCATATCAAGTCAGC	50	DQ105994	(GACA) <sub>7</sub> GAAA(GACA) <sub>3</sub> GAAA (GACA) <sub>2</sub> GAAA(GACA) <sub>3</sub>	164-256	53
Pmarg37	F-GTCAGGATCTCCTTTATCTC R-AGGAGATATGTCATTGCTG	48	DQ105996	(CA) <sub>15</sub>	143-213	34
Pmarg44	F-GGACAGGGAATATCAAAC R-CAAATATGTGCAGTGTGA C	50	DQ105997	(GACA) <sub>7</sub>	180-280	-
Pmarg45	F-TCTGCCTGACAAGTTACGAAC R-ATACATTGAAGCTCGTCTCCTC	50	DQ105998	(GACA) <sub>9</sub> (GGAC) <sub>7</sub> (GACA) <sub>9</sub>	112-294	66
Pmarg68	F-GTTGCCTGTGAAACATAGTG R-CAGTTATGGCTGTGGACC	50	DQ105999	(GACA) <sub>2</sub> GATG(GACA) <sub>5</sub>	124-200	30
Pmarg77	F-GTTCAGCCATTCTTGAGAAG R-TGAGCAATATTTAGCTCGAAG	50	DQ106000	(GACA) <sub>13</sub>	116-228	44
Pmarg 79	F-AGTAAGTTGTAGCCAAATATGTGC R-GGAATATCAAACACAGGTCACCTC	50	DQ106001	(GACA) <sub>7</sub>	188-288	35

No se indica el número de alelos de Pmarg44 ya que los genotipos obtenidos a partir de Pmarg44 fueron utilizados para complementar la base de datos del locus Pmarg79

El estadístico Garza-Williamson (G-W, número de alelos dividido entre el rango alélico) fue calculado mediante ARLEQUIN. Este índice ha demostrado ser sensible a los cuellos de botella de la población debido a que el número de alelos suele ser más reducido que número dado por una reciente reducción en el tamaño de la población y es dado como:  $G-W = k / (R+1)$  donde  $k$  es el número de alelos de un locus dado en una muestra y  $R$  es el intervalo alélico (Excoffier *et al.*, 2005). En poblaciones que han atravesado por un cuello de botella el índice G-W será muy pequeño, mientras que en poblaciones estacionarias será cercano a uno.

### V.III.II Diferenciación genética entre localidades

Se calcularon los estadísticos  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$  (Weir y Cockerham, 1984) para todas las muestras utilizando el programa FSTAT. Para calcular el índice de fijación  $F_{ST}$  corrigiendo la presencia de alelos nulos se utilizó el método llamado ENA (por sus siglas en inglés Excluding Null Alleles) descrito por Chapuis y Estoup (2007) utilizando el software FreeNA. El índice  $F_{ST}$  estimado mediante FreeNA será referido de ahora en adelante como  $F_{STENA}$ . El cálculo de la significancia se realizó por un proceso de permutación al azar de los alelos ( $n = 1000$ , los alelos fueron permutados no asumiendo Equilibrio de H-W) dentro de las muestras para probar si los valores son diferentes de cero o no. Los intervalos de confianza fueron obtenidos por el método jackknifing para la población y por bootstrapping entre los loci.

El índice de fijación  $F_{ST}$  estima la reducción de genotipos heterocigotos en proporción a la media dentro de las poblaciones causada por una diferenciación poblacional.  $F_{ST}$  toma valores de 0 a 1 y debe ser siempre positivo. Cuando es igual o cercano a cero, la heterocigosidad promedio de todas las subpoblaciones es equivalente a la esperada en equilibrio de H-W para el total de la población por lo que existe homogeneidad genética o panmixia. Cuando  $F_{ST}$  tiene un valor cercano a 1, entonces los efectos de pérdida de heterocigosidad debida a subdivisión poblacional o efecto Wahlund son equivalentes a los esperados por endogamia dentro de cada localidad (Weir y Cockerham, 1984; Excoffier y Lischer,

2010).  $F_{IS}$ , y  $F_{IT}$  son medidas de la desviación de H-W dentro de subpoblaciones y en el total de las poblaciones, respectivamente. Cuando sus valores son negativos indican un exceso de heterocigotos, mientras que cuando sus valores son positivos indican una deficiencia de heterocigotos (Weir y Cockerham, 1984).

También se realizó una prueba de comparaciones pareadas de  $F_{ST}$  entre las localidades mediante ARLEQUIN con 1000 permutaciones. Los niveles de significancia fueron ajustados usando la aproximación secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). Las comparaciones pareadas de  $F_{ST}$  son usadas para medir las distancias genéticas bajo el modelo de mutación de alelos infinitos (IAM por sus siglas en inglés). Esta prueba tiene la hipótesis nula de ausencia de diferencias entre las poblaciones (un valor de  $F_{ST}$  pareado cercano o igual a cero). La frecuencia de alelos nulos puede derivar en una sobreestimación de la diferenciación poblacional (Chapuis y Estoup 2007). Por lo tanto, se hizo un análisis de comparaciones pareadas de  $F_{ST}$  entre las localidades utilizando la base de datos corregida para alelos nulos. Este análisis también se realizó en ARLEQUIN con 1000 permutaciones.

Mediante ARLEQUIN se realizó un análisis de variancia molecular  $R_{ST}$  que es análogo a  $F_{ST}$  y que incorpora como componente de la varianza molecular la diferencia cuadrática del tamaño de los alelos como distancias euclidianas. Los alelos con motivos de repeticiones similares están más emparentados que aquellos alelos más disímiles (Stepwise Mutation Model) (Excoffier *et al.*, 1992; Slatkin, 1995). En el caso del índice  $R_{ST}$ , cuando es igual o cercano a cero, la varianza molecular en cada localidad es igual que la varianza poblacional, lo que indica la ausencia de diferencias genéticas. Mientras que, cuando  $R_{ST}$  es igual a 1, toda la varianza molecular está distribuida entre localidades y ninguna dentro de las localidades.

Se realizó una estimación del flujo genético existente entre las poblaciones utilizando los valores de  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$  obtenidos mediante el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) utilizando el programa ARLEQUIN. El AMOVA mide el nivel de estructura genética tomando en cuenta diferentes niveles jerárquicos: dentro de

localidades, entre localidades y entre regiones geográficas, además nos permite estimar unidades evolutivas independientes. Para este estudio se tomaron en cuenta los niveles jerárquicos: entre archipiélagos, entre poblaciones dentro de archipiélagos, entre individuos dentro de poblaciones y entre individuos.

Se construyó un árbol de las relaciones genéticas entre las muestras mediante el algoritmo de Neighbor-joining (NJ) (Saitou y Nei 1987) empleando las distancias genéticas  $D_C$  (Cavalli-Sforza y Edwards 1967) con 1000 réplicas para evaluar la estabilidad de los nodos. De igual manera se estimaron las distancias genéticas  $D_C$  utilizando el método INA descrito por Chapuis y Estoup (2007) para corregir la presencia de alelos nulos. Este método ajusta las frecuencias del genotipo de cada loci y población por: (i) la estimación de las frecuencias de alelos nulos mediante Dempster *et al.* (1977), y (ii) suponiendo un único genotipo de alelo nulo por locus común en todas las poblaciones (Chapuis y Estoup, 2007). Las distancias genéticas  $D_C$  y  $D_{CINA}$  fueron obtenidas mediante el software FreeNA (Chapuis y Estoup, 2007). Posteriormente los árboles fueron generados con el software TreeFit (Kalinowski, 2009) y fueron visualizados gráficamente por Treeview (Page 1996).

La distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) fue elegida debido a que: (i) de acuerdo con Takezaki y Nei (1996) es la distancia más eficiente para obtener la topología correcta de un árbol (ii) no asume tasas de mutación ni tamaños poblacionales constantes, y (iii) para esta distancia genética el sesgo generado por la presencia de alelos nulo es bajo (Chapuis y Estoup 2007).

## VI. RESULTADOS

### VI.I Caracterización genética de individuos de *P. margaritifera*

Se amplificaron exitosamente nueve microsatélites (Pmarg2, Pmarg7, Pmarg11, Pmarg37, Pmarg44, Pmarg45, Pmarg68, Pmarg77, Pmarg79) en 17 de las 19 localidades muestreadas. Para las localidades de Mopelia2 y Scilly no se pudo amplificar con éxito el locus Pmarg45.

Se confirmó que los primers Pmarg44 y Pmarg79 amplificaron el mismo microsatélite después de comparar los genotipos obtenidos mediante los dos pares de primers para cada individuo, observando que los alelos fueron homólogos para ambos loci y que el par de primers Pmarg79 amplificó un fragmento 8pb mayor. En algunas muestras no se amplificó con éxito ningún alelo para el par de primers Pmarg44 pero sí para Pmarg79 o viceversa. Este patrón se observó con alta frecuencia en las muestras por lo que se llevó a cabo la unión de los datos obtenidos detectando la presencia de alelos nulos. Después de complementar los alelos genotipificados para ambos loci únicamente se empleó Pmarg79 para los análisis siguientes.

### VI.II Evaluación de la diversidad genética entre poblaciones

#### VI.II.I Diversidad genética y Equilibrio de Hardy-Weinberg

Para los ocho loci amplificados se observó un alto grado de polimorfismo al considerar todas las muestras: entre 22 y 66 alelos por locus. Los loci Pmarg11 y Pmarg45 fueron los más polimórficos con: 53 y 66 alelos respectivamente, mientras que el locus menos polimórfico fue Pmarg7 con 22 alelos. La variación de los tamaños alélicos en todos los loci varió de 112 a 294 pares de bases (Tabla 2).

La distribución de las frecuencias alélicas de los ocho loci estudiados varió notablemente entre todas las localidades de *Pinctada margaritifera* (Anexo 2). Ninguno de los ocho loci estudiados presentó el alelo más común en todas las localidades.

Los valores de riqueza alélica por locus ( $R_S$ ) se encontraron en un rango de  $R_S=2.984$  a  $R_S=11.851$ . La localidad de Marutua1 fue la que presentó el promedio más bajo de riqueza alélica con un valor de  $R_S=7.2980$ , mientras que el promedio más alto se encontró en la localidad de Hereheretue con un valor de  $R_S=9.1948$  (Tabla 3).

Las pruebas exactas para determinar el ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) dentro de las localidades indicaron que 62 de las 152 muestras (40.8%) no cumplieron con los supuestos de equilibrio de H-W después de la corrección de Bonferroni (Tabla 3). La única muestra que se ajustó a los supuestos de equilibrio de H-W para todos los loci fue Marutea1. Las muestras de las Islas Salomón se desviaron de los supuestos de equilibrio para la mayoría de los loci (Tabla 3).

Las heterocigocidades observadas ( $H_o$ ) variaron entre 0.2308 y 0.9412 dentro de todos los loci, mientras que las heterocigocidades esperadas ( $H_e$ ) estuvieron entre 0.6000 y 0.9740. Se observó que para los loci Pmarg37 y Pmarg79 todas las localidades se ajustaron a los supuestos de equilibrio de H-W. Por el contrario, 17 de las 19 localidades presentaron desviaciones del equilibrio para el locus Pmarg2. Los loci Pmarg7, Pmarg11 y Pmarg45 presentaron 3, 7 y 10 muestras en desequilibrio respectivamente, mientras que los loci Pmarg68 y Pmarg77 presentaron 12 muestras en desequilibrio (Tabla 3).

Los valores del índice  $F_{IS}$  se encontraron en un intervalo de -0.0710 para HivaOa-Tahuata y 0.7360 para Mopelia1. De acuerdo con los valores negativos de  $F_{IS}$ , se presenta un exceso de heterocigotos en la localidad de Mopelia1 para el Locus Pmarg11, en Arutua2 para el Locus Pmarg37, en Takaroa, Raroia1 y Hereheretue para el Locus Pmarg79 y en HivaOa-Tahuata para los Loci Pmarg37 y Pmarg79, mientras que los valores positivos de  $F_{IS}$  en el resto de las muestras indican un déficit de heterocigotos (Tabla 3).

Tabla III. Variabilidad genética de las 19 localidades de estudio de *Pinctada margaritifera* mediante 8 microsatélites. Tamaño de muestra (n), Número de alelos por locus (A), Diversidad genética (D), Heterocigocidad esperada (He), Heterocigocidad observada (Ho), Índice  $F_{IS}$ , Nivel de significancia para el ajuste al equilibrio de H-W\* e Índice Garza-Williamson (G-W).

ARCHIPI -ÉLAGO	ATOLÓN	n		LOCI								MEDIA
				Pmarg2	Pmarg7	Pmarg11	Pmarg37	Pmar45	Pmar68	Pmarg77	Pmar79	
TUAMOTU	Takaroa x	28	(A)	16	9	24	16	24	7	19	16	16.3750
			D	0.9430	0.8630	0.9590	0.9100	0.9700	0.8150	0.9350	0.8400	0.9044
			R	9.4220	6.6690	10.6820	8.4170	11.2590	5.4580	9.4910	7.2580	8.5820
			(He)	0.9336	0.8573	0.9540	0.9057	0.9657	0.8104	0.9315	0.8403	0.8998
			(Ho)	0.4615	0.5833	0.6923	0.7037	0.7600	0.5714	0.7407	0.8571	0.6713
			FIS	0.5110	0.3240	0.2780	0.2260	0.2160	0.2990	0.2080	-0.0200	0.2580
			H-W	<b>&lt;0.0001</b>	0.0102	0.0003	0.1370	0.0027	0.0257	0.0022	0.1921	
	G-W	0.3019	0.4286	0.4068	0.2319	0.3380	0.3333	0.1810	0.2712	0.3116		
	Arutua1	12	(A)	11	6	11	10	10	7	10	10	9.3750
			D	0.9440	0.8680	0.9720	0.9380	0.9440	0.8220	0.9280	0.8730	0.9111
			R	8.9450	5.6990	9.8370	8.7960	8.5880	5.7820	8.3180	7.6510	7.9520
			(He)	0.9158	0.8431	0.9543	0.9281	0.9085	0.7947	0.9105	0.8658	0.8901
			(Ho)	0.4000	0.4444	0.6667	0.7778	0.3333	0.3000	0.6000	0.7273	0.5312
			FIS	0.5760	0.4880	0.3140	0.1700	0.6470	0.6350	0.3530	0.1670	0.4170
H-W			<b>&lt;0.0001</b>	0.0066	0.0217	0.2621	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0002</b>	0.0302	0.2558		
G-W	0.2076	0.2609	0.1803	0.2564	0.1887	0.2800	0.1370	0.2326	0.2179			

Tabla III CONTINUACIÓN.

ARCHIPIÉLAGO	ATOLON	IND	Pmarg2	Pmarg7	Pmarg11	Pmarg37	Pmar45	Pmar68	Pmarg77	Pmar79	MEDIA
Arutua2	17	(A)	13	10	15	11	17	7	12	7	11.5000
		D	0.9150	0.8900	0.9330	0.8790	0.9540	0.7870	0.9150	0.8180	0.8864
		R	8.6130	7.5590	9.2620	7.6000	10.3570	5.3230	8.2590	5.5330	7.8133
		(He)	0.9020	0.8841	0.9254	0.8806	0.9496	0.7718	0.9073	0.8146	0.8794
		(Ho)	0.4706	0.7059	0.6875	0.9412	0.8125	0.2941	0.6875	0.7059	0.6631
		FIS	0.4860	0.2070	0.2630	-0.0710	0.1480	0.6260	0.2480	0.1370	0.2520
		H-W	<b>&lt;0.0001</b>	0.0445	0.0018	0.2282	0.1454	<b>0.0002</b>	0.0026	0.1530	
		G-W	0.1781	0.4762	0.2381	0.4074	0.1753	0.3333	0.1644	0.1795	0.2690
Raroia1	15	(A)	15	8	10	13	14	3	15	8	10.7500
		D	0.9740	0.8860	0.9580	0.9490	0.9460	0.6150	0.9200	0.8410	0.8861
		R	10.2260	6.9530	8.9440	9.4960	9.6360	2.9840	9.4250	6.1810	7.9806
		(He)	0.9477	0.8788	0.9346	0.9354	0.9354	0.6000	0.9074	0.8413	0.8726
		(Ho)	0.3077	0.7273	0.5556	0.6154	0.6923	0.2308	0.5714	0.8571	0.5697
		FIS	0.6840	0.1790	0.4200	0.3510	0.2680	0.6250	0.3790	-0.0200	0.3570
		H-W	<b>&lt;0.0001</b>	0.2299	<b>0.0002</b>	0.0005	0.0050	0.0060	<b>0.0002</b>	0.3619	
		G-W	0.1807	0.4211	0.1961	0.3514	0.1414	0.3333	0.2000	0.1861	0.2513
Raroia2 x	35	(A)	19	11	23	16	27	11	17	16	17.5000
		D	0.9520	0.8530	0.9590	0.9130	0.9760	0.8020	0.9270	0.8390	0.9026
		R	9.9990	6.5380	10.7900	8.4400	11.4920	6.0700	8.9490	7.1910	8.6836
		(He)	0.9440	0.8506	0.9574	0.9092	0.9688	0.7961	0.9208	0.8381	0.8981
		(Ho)	0.4839	0.6897	0.8519	0.6875	0.6071	0.4667	0.5152	0.7714	0.6342
		FIS	0.4920	0.1920	0.1120	0.2470	0.3780	0.4180	0.4440	0.0810	0.2970
		H-W	<b>&lt;0.0001</b>	0.0284	0.1909	0.0170	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0002</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.1358	
		G-W	0.2468	0.4400	0.2987	0.2712	0.1942	0.2076	0.2615	0.2623	0.2728

Tabla III CONTINUACIÓN

ARCHIPIÉ- LAGO	ATOLÓN	IND	Pmarg2	Pmarg7	Pmarg11	Pmarg37	Pmar45	Pmar68	Pmarg77	Pmar79	MEDIA
Herehere- tue		28 (A)	20	13	23	20	29	13	16	14	18.5000
		D	0.9580	0.8800	0.9580	0.9080	0.9720	0.8990	0.9580	0.8430	0.9220
		R	10.2980	7.4470	10.4800	8.9080	11.5810	7.8900	9.8150	7.1390	9.1948
		(He)	0.9494	0.8763	0.9513	0.9078	0.9682	0.8903	0.9430	0.8435	0.9162
		(Ho)	0.5200	0.7037	0.6071	0.8929	0.7857	0.3929	0.3044	0.8571	0.6330
		FIS	0.4570	0.2000	0.3660	0.0170	0.1910	0.5630	0.6820	-0.0160	0.3130
		H-W	<0.0001	0.0723	<0.0001	0.2485	0.0097	<0.0001	<0.0001	0.7681	
		G-W	0.2899	0.3333	0.3067	0.3774	0.2479	0.1940	0.1975	0.2979	0.2806
Marutea1		12 (A)	8	7	10	11	11	9	9	6	8.8750
		D	0.8570	0.8770	0.8590	0.8750	0.8980	0.8910	0.9230	0.7540	0.8668
		R	8.0000	6.1800	7.7820	8.0550	7.9830	7.4990	7.8170	5.0680	7.2980
		(He)	0.8242	0.8571	0.8528	0.8696	0.8913	0.8831	0.9091	0.7464	0.8542
		(Ho)	0.4286	0.4546	0.7273	0.7500	0.7500	0.7273	0.6364	0.5833	0.6322
		FIS	0.5000	0.4820	0.1530	0.1430	0.1650	0.1840	0.3100	0.2260	0.2710
		H-W	0.0017	0.0038	0.1271	0.2850	0.1530	0.0579	0.0716	0.1908	
		G-W	0.1778	0.3684	0.1539	0.3333	0.1746	0.3600	0.0968	0.1818	0.2308
Marutea2		29 (A)	19	10	21	16	30	8	14	13	
		D	0.9370	0.8360	0.9510	0.9130	0.9800	0.8480	0.8830	0.8530	0.9001
		R	9.4470	6.2840	10.1880	8.5770	11.8510	5.9720	7.6160	6.9640	8.3624
		(He)	0.9280	0.8365	0.9474	0.9117	0.9740	0.8409	0.8748	0.8524	0.8957
		(Ho)	0.4815	0.8519	0.7500	0.8621	0.6429	0.4643	0.4615	0.7931	0.6634
		FIS	0.4860	-0.0190	0.2110	0.0550	0.3440	0.4520	0.4770	0.0710	0.2630
		H-W	<0.0001	0.0159	0.0079	0.2497	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1022	
		G-W	0.3455	0.4000	0.3621	0.2623	0.2362	0.2963	0.1556	0.2653	0.2904



Tabla III CONTINUACIÓN

ARCHIPIÉ -LAGO	ATOLON	IND		Pmarg2	Pmarg7	Pmarg11	Pmarg37	Pmar45	Pmar68	Pmarg77	Pmar79	MEDIA
GAMBIERS	Aukena +	2 2	(A)	16	10	23	14	22	5	14	10	14.250 0
			D	0.9460	0.8340	0.9580	0.8810	0.9620	0.7530	0.9210	0.8540	0.8886
			R	9.5120	6.5850	10.8010	8.0590	10.8860	4.4390	8.5910	6.5180	8.1739
			(He)	0.9317	0.8309	0.9559	0.8792	0.9588	0.7444	0.9147	0.8510	0.8833
			(Ho)	0.4211	0.6818	0.8571	0.8095	0.8182	0.4444	0.6842	0.7273	0.6805
			FIS	0.5550	0.1830	0.1060	0.0810	0.1500	0.4100	0.2570	0.1480	0.2340
			H-W	<b>&lt;0.0001</b>	0.0330	0.1911	0.1343	0.0175	0.0156	0.0131	0.5447	
			G-W	0.1882	0.4762	0.3239	0.3784	0.2056	0.3846	0.2090	0.1539	0.2900
MARQUE- SAS	Nuku Hiva	43	(A)	20	8	28	15	33	10	10	16	17.500 0
			D	0.9450	0.7170	0.9630	0.8680	0.9670	0.7180	0.8030	0.7470	0.8410
			R	9.7730	4.6630	10.9090	7.1560	11.2550	5.1920	6.3140	6.1070	7.6711
			(He)	0.9412	0.7141	0.9585	0.8676	0.9642	0.7130	0.7941	0.7464	0.8374
			(Ho)	0.6279	0.5116	0.6500	0.8605	0.7317	0.3415	0.3462	0.7209	0.5988
			FIS	0.3350	0.2860	0.3250	0.0080	0.2430	0.5240	0.5690	0.0340	0.2880
			H-W	<b>&lt;0.0001</b>	0.0004	<b>0.0001</b>	0.5173	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.0974	
	G-W	0.4255	0.3478	0.3374	0.2941	0.2444	0.2041	0.1539	0.2807	0.2860		
	HivaOa	31	(A)	20	10	24	16	25	6	13	11	15.625 0
			D	0.9420	0.7760	0.9550	0.8630	0.9690	0.5570	0.8200	0.6930	0.8219
			R	9.6900	5.6840	10.4200	7.1860	11.0760	3.5740	7.0630	5.3210	7.5018
			(He)	0.9376	0.7747	0.9497	0.8641	0.9630	0.5542	0.8135	0.6938	0.8188
			(Ho)	0.6452	0.6774	0.6667	0.9032	0.6129	0.3871	0.5217	0.7419	0.6445
FIS			0.3150	0.1270	0.3020	-0.0460	0.3670	0.3050	0.3640	-0.071	0.2160	
H-W	<b>&lt;0.0001</b>	0.2355	<b>&lt; 0.0001</b>	0.5035	<b>&lt;0.0001</b>	0.0370	0.0005	0.7182				
G-W	0.4444	0.3448	0.2963	0.2462	0.1938	0.1818	0.2000	0.2821	0.2737			

Tabla III CONTINUACIÓN

ARCHIPIÉ -LAGO	ATOLON	IND		Pmarg2	Pmarg7	Pmarg11	Pmarg37	Pmarg45	Pmarg68	Pmarg77	Pmarg79	MEDI A
SOCIETE	Mopelia 1+	16	(A)	13	8	14	12	17	8	13	13	12.250 0
			D	0.9380	0.8790	0.8980	0.9100	0.9860	0.8710	0.9480	0.9020	0.9165
			R	8.9070	6.8400	8.5630	8.2940	11.3520	6.6790	8.9960	8.3520	8.4979
			(He)	0.9254	0.8669	0.8989	0.9052	0.9709	0.8575	0.9254	0.8972	0.9059
			(Ho)	0.5625	0.5000	0.9333	0.7500	0.5714	0.4667	0.2500	0.7500	0.5980
			FIS	0.4000	0.4310	-0.0400	0.1760	0.4210	0.4640	0.7360	0.1690	0.3480
			H-W	<b>0.0002</b>	0.0095	0.6436	0.0336	<b>&lt; 0.0001</b>	0.0052	<b>&lt;0.0001</b>	0.0951	
			G-W	0.1688	0.3810	0.2295	0.2105	0.1478	0.2963	0.1781	0.2000	0.2265
	Mopelia 2	40	(A)	22	11	26	22	-	12	14	15	17.429 0
			D	0.9520	0.8170	0.9450	0.9250	-	0.7910	0.9130	0.8570	0.8857
			R	10.0460	6.2400	10.1610	9.3440	-	6.3380	8.3980	7.3490	8.2680
			(He)	0.9445	0.8165	0.9424	0.9253	-	0.7848	0.9077	0.8567	0.8826
			(Ho)	0.4571	0.8158	0.7250	0.9250	-	0.3333	0.5429	0.8000	0.6570
			FIS	0.5200	0.0010	0.2330	0.0000	-	0.5790	0.4050	0.0670	0.2580
			H-W	<b>&lt;0.0001</b>	0.5281	0.0009	0.1996	-	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.5648	
			G-W	0.4151	0.4783	0.3133	0.3860	-	0.2927	0.2154	0.2381	0.3341
	Scilly x	40	(A)	22	10	21	16	-	10	16	15	15.714 0
			D	0.9510	0.8030	0.9470	0.8980	-	0.6920	0.8880	0.8340	0.8590
			R	10.1700	5.6690	9.9480	8.4370	-	4.9710	8.0470	6.6720	7.7020
			(He)	0.9464	0.8007	0.9432	0.8974	-	0.6862	0.8814	0.8338	0.8556
			(Ho)	0.6765	0.6579	0.6842	0.8205	-	0.2778	0.5000	0.7949	0.6303
			FIS	0.2880	0.1800	0.2770	0.0870	-	0.5990	0.4370	0.0470	0.2660
			H-W	0.0022	0.0287	<b>&lt; 0.0001</b>	0.2824	-	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.8170	
			G-W	0.4490	0.3448	0.3044	0.3404	-	0.4348	0.2462	0.2632	0.3404

Tabla III CONTINUACIÓN

ARCHIPIE -LAGO	ATOLON	IND		Pmarg2	Pmarg7	Pmarg11	Pmarg37	Pmarg45	Pmarg68	Pmarg77	Pmarg79	MEDIA
SALOMÓN	Eastern	47	(A)	20	10	30	16	25	15	17	14	18.3750
			D	0.9460	0.9270	0.9660	0.9150	0.9670	0.8030	0.8840	0.8480	0.9070
			R	9.8790	8.0510	11.2360	8.7270	11.0460	6.9130	8.0940	6.4990	8.8056
			(He)	0.9405	0.9113	0.9636	0.9126	0.9623	0.8005	0.8760	0.8462	0.9016
			(Ho)	0.5500	0.4375	0.7778	0.7647	0.6471	0.6667	0.3056	0.7381	0.6109
			FIS	0.4180	0.5280	0.1950	0.1640	0.3310	0.1690	0.6540	0.1290	0.3260
			H-W	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.0419	<b>&lt;0.0001</b>	0.0023	<b>&lt;0.0001</b>	0.5963	
			G-W	0.3175	0.4348	0.3704	0.4103	0.2475	0.1948	0.2329	0.2456	0.3067
	Western	50	(A)	21	14	24	23	26	13	15	20	19.5000
			D	0.9460	0.9160	0.9700	0.9050	0.9300	0.7730	0.8650	0.8650	0.8963
			R	9.8010	8.3730	10.9950	8.7090	9.5810	5.8300	7.3900	7.5150	8.5243
			(He)	0.9411	0.9104	0.9610	0.9036	0.9253	0.7697	0.8575	0.8647	0.8917
			(Ho)	0.5500	0.4318	0.5000	0.7959	0.4898	0.4583	0.3243	0.8600	0.5513
			FIS	0.4190	0.5290	0.4840	0.1200	0.4730	0.4070	0.6250	0.0050	0.3850
			H-W	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.2050	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.2647	
			G-W	0.3443	0.3784	0.3478	0.4035	0.2261	0.3714	0.1948	0.1980	0.3080

\*  $\alpha=0.0003$  se señalan en negritas aquellos casos que fueron significativos después del ajuste de  $\alpha'$

- = análisis no realizado debido a que no hubo amplificación en ningún individuo.

+ cultivo

x colectores

Los valores del índice Garza-Williamson se encontraron en un intervalo de  $G-W=0.1370$  y  $G-W=0.4828$ . Al comparar el índice  $G-W$  para el total de loci por localidad se encontró que Arutua1 presentó el menor valor de  $G-W=0.2179$ , mientras que Takapoto1 presentó el valor mas alto para este índice  $G-W=0.3450$  (Tabla 3).

La deficiencia significativa de heterocigotos y las desviaciones del equilibrio de  $H-W$  en la mayoría de las muestras para los diferentes loci, podrían deberse a la presencia de alelos nulos. Lo anterior fue confirmado con el análisis de los datos mediante MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout *et al.*, 2004) detectando la presencia de alelos nulos. Al realizar la estimación de la frecuencia de alelos nulos por localidad y locus empleando el algoritmo Brookfiel 2 (Brookfield, 1996) se observan valores entre 0 y 0.8624 (Tabla 4).

Los valores positivos de  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  indicaron una deficiencia de heterocigotos dentro de las localidades y en el total de las localidades respectivamente (Tabla 5). Se obtuvieron valores globales de  $F_{IS}=0.293$  y  $F_{IT}=0.305$ , ambos significativamente mayores de cero (Tabla 5). Un valor global significativo de  $F_{ST}=0.017$  indicó diferencias genéticas entre las localidades de *Pinctada margaritifera* para todos los loci (Tabla 5). El valor calculado de  $F_{ST}$  empleando el algoritmo ENA ( $F_{STENA}$ ) que corrige la presencia de alelos nulos fue de  $F_{STENA}=0.016$ , el cuál también fue significativamente diferente de cero reforzando las diferencias genéticas entre las poblaciones.

Tabla IV. Frecuencia estimada de alelos nulos por locus en las muestras de *Pinctada margaritifera* empleando el algoritmo Brookfield 2 (Brookfield, 1996).

Localidad	LOCUS								MEAN
	Pmarg2	Pmarg7	Pmarg11	Pmarg37	Pmarg45	Pmarg68	Pmarg77	Pmarg79	
TA x	0.3376	0.3488	0.2370	0.1642	0.2547	0.1250	0.1553	0.0000	0.2028
AR-1	0.4602	0.5102	0.4485	0.3954	0.5638	0.4732	0.3760	0.2045	0.4290
AR-2	0.2159	0.0819	0.2093	0.0000	0.1572	0.2601	0.2601	0.0473	0.1540
RA-1	0.4736	0.4269	0.6314	0.3396	0.3053	0.4208	0.2679	0.1199	0.3732
RA-2 x	0.3827	0.3353	0.3513	0.2459	0.4314	0.3841	0.2914	0.0300	0.3065
HERE	0.3590	0.1542	0.1691	0.0000	0.0847	0.2569	0.5220	0.0000	0.1932
MRT-1	0.6616	0.3267	0.2010	0.0455	0.0562	0.2091	0.2582	0.0769	0.2294
MRT-2	0.3621	0.1690	0.2015	0.0883	0.2603	0.3026	0.3952	0.1020	0.2351
KA	0.1787	0.1769	0.0658	0.0583	0.0965	0.2633	0.2097	0.1116	0.1451
TKP-1	0.2621	0.1452	0.1201	0.0197	0.1674	0.3176	0.6884	0.0179	0.2173
TKP-2	0.3284	0.1491	0.2221	0.0056	0.2182	0.3988	0.3255	0.1224	0.2213
GB +	0.4285	0.0718	0.1202	0.1205	0.0613	0.4224	0.3102	0.0570	0.1990
NH	0.1566	0.1138	0.2580	0.0000	0.1890	0.2935	0.6695	0.0096	0.2113
HO	0.1442	0.0481	0.1926	0.0000	0.1718	0.1024	0.4893	0.0000	0.1436
MO-1 +	0.1761	0.1847	0.0921	0.0676	0.3590	0.2967	0.3409	0.0637	0.1976
MO-2	0.3621	0.1690	0.2015	-	0.0883	0.3026	0.3952	0.1020	0.2315
SCI x	0.1787	0.1769	0.0658	-	0.0583	0.2633	0.2097	0.1116	0.1520
SOLO-1	0.3936	0.8624	0.3956	0.4357	0.4947	0.4734	0.5605	0.2332	0.4811
SOLO-2	0.4491	0.4040	0.6927	0.0954	0.2541	0.2452	0.5735	0.0000	0.3393
<b>MEAN</b>	0.3321	0.2555	0.2566	0.1225	0.2249	0.3058	0.3841	0.0742	0.2445

- analisis no realizado debido a que no hubo amplificación en ningún organismo

+ cultivo

x colectores

**Tabla V. Estadísticos  $F$  (Weir y Cockerham, 1984) para *Pinctada margaritifera* en 19 localidades del Indopacífico**

<b>LOCI</b>	<b><math>F_{IT}</math></b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b><math>F_{ST}</math></b>	<b><math>F_{STENA}</math></b>
Pmarg 2	0.451	0.451	0.001	0.001
Pmarg7	0.265	0.247	0.024	0.024
Pmarg11	0.254	0.247	0.010	0.010
Pmarg37	0.101	0.087	0.015	0.015
Pmarg45	0.316	0.309	0.010	0.009
Pmarg68	0.512	0.487	0.049	0.042
Pmarg77	0.444	0.434	0.018	0.015
Pmarg79	0.094	0.078	0.017	0.017
<b>Total</b>	<b>0.305</b>	<b>0.293</b>	<b>0.017</b>	<b>0.016</b>

En negritas se indican aquellos valores que fueron significativos porque el bootstrap no incluye al cero.

## VI.II Diferenciación genética

Las comparaciones entre poblaciones se estimaron mediante la frecuencia de los alelos o genotipos (índice  $F_{ST}$ ) y también mediante la variación del número de copias ( $R_{ST}$ ) (Tablas 6-8).

Los valores de las comparaciones pareadas del índice  $F_{ST}$  no corregidas para la presencia de alelos nulos (Tabla 6) mostraron diferencias genéticas altamente significativas ( $P < 0.001$ ) entre la localidad de Nuku Hiva y las localidades de: Takaroa, Arutua2, Raroia cultivo, Hereheretue, Marutea1, Marutea2, Kauehi, Takapoto1, Takapoto2, Gambier, Mopelia1, Mopelia2, Scily, Solo1 y Solo2; Entre la localidad de HivaOa y Takaroa, Raroia cultivo, Hereheretue, Kauehi, Marutea2, Takapoto1, Takapoto2, Gambier, Mopelia1, Mopelia2, Solo1 y Solo2. También se encontraron diferencias genéticas altamente significativas entre las localidades de Takapoto2 y Scily y entre las localidades de Solo2 y Raioa cultivo, Marutea1, Takapoto1 y Takapoto2, Nuku Hiva e Hiva Oa.

Estos resultados indicaron que las ostras de las Islas Marquesas (Nuku Hiva, HivaOa), las de las Islas Salomón (Solo2) y en menor grado las de Scilly (Sociedad) fueron las mas disímiles (Tablas 6).

Con la finalidad de determinar si la presencia de alelos nulos creó un sesgo considerable en las estimaciones del índice  $F_{ST}$ , los valores de  $F_{ST}$  para las comparaciones pareadas fueron también calculados empleando la base de datos corregida para alelos nulos (Tabla 7). Con base al análisis de diferencias pareadas se encontraron diferencias significativas entre localidades que no fueron diferenciadas mediante las estimaciones de  $F_{ST}$ , como Takaroa y Takapoto2, Raroia2 y Takapoto2, Arutua2 y HivaOa, Raroia1 y HivaOa, Solo2 y Arutua2, Gambier y Solo2; así como también se perdieron algunas diferencias significativas que fueron previamente identificadas. De acuerdo con las comparaciones pareadas de  $F_{ST}$  utilizando la base de datos corregida para alelos nulos, las poblaciones de Takapoto2, Nuku-Hiva, HivaOa y Salomón2 se encontraron significativamente diferenciadas del resto de las localidades (Tabla 7).

Por otra parte, los Valores  $R_{ST}$  en las comparaciones pareadas señalan diferenciación genética únicamente entre la localidad de Nuku Hiva y las localidades de Takapoto1 ( $R_{ST}=0.05518$ ) y Solo2 ( $R_{ST}=0.0531$ ) después de la corrección de Bonferroni (Tabla 8).

Se utilizó el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para probar si había un patrón de estructuración genética a nivel de archipiélagos y se obtuvo un índice de fijación  $F_{CT}= 0.0174$  ( $p=0.00587$ ) y con un 1.74 % de varianza entre los archipiélagos con base en las frecuencias alélicas. En el caso de análisis basado en el tamaño de los alelos se obtuvo un índice de fijación  $R_{CT}=0.01025$  ( $p=0.03421$ ) y un 1.03% de variación entre archipiélagos (Tabla 9). Los resultados con ambos índices sugirieron una pequeña pero significativa diferenciación genética entre archipiélagos. Sin embargo, se observó una homogeneidad genética entre atolones dentro de archipiélagos ( $F_{SC}=0.0016$ ,  $p=0.25122$  y  $R_{SC}=-0.00994$ ,  $p=0.98436$ ). Lo cual sugiere que la estructura genética se presenta a grandes distancias geográficas (nivel de archipiélago) (Tabla 9).

Al examinar la estructura genética mediante comparaciones pareadas (Tablas 6 y 8), se observó que la diferencia entre archipiélagos obtenida mediante el análisis de AMOVA (Tabla 9) puede ser atribuida principalmente a las diferencias entre los archipiélagos de las Islas Marquesas y las Islas Salomón.

### **VI.III Patrones filogeográficos**

Las distancias genéticas se estimaron mediante el algoritmo de Cavalli-Sforza y Edwards (1967) mediante el método INA para la corrección de alelos nulos y sin la corrección de alelos nulos (Figuras 2 y 3). De manera general en ambos árboles no fue posible identificar ningún patrón de agrupación de acuerdo a la ubicación geográfica. Sin embargo en los dos cladogramas se observó un grupo formado por algunas islas del archipiélago Tuamotu-Gambier: Raroia1, Gambier, Kauei, Takaroa, Raoia2, Arutua2, Marutua2, Arutua1, Marutua1 y Mopelia1, así como por Mopelia1(Sociedad) que corresponde a individuos de cultivo. También se observó que Hereheretue, Takapoto1 y Takapoto2 son divergentes del resto de las localidades de Tuamotu-Gambier. Las dos muestras de las islas Marquesas se agrupan en un cluster que se observa en ambos árboles y de igual manera sucede con las muestras de las islas Salomón.

**Tabla VI. Comparaciones pareadas del índice de fijación  $F_{ST}$  entre pares de muestras de *Pinctada margaritifera*. Debajo de la diagonal valor de  $F_{ST}$  y sobre la diagonal su valor P, en negritas los valores significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni. Abreviaturas según Tabla 1.**

	TA*	AR-1	AR-2	RA-1	RA-2*	HR	MRT-1	MRT-2	KAU	TKP-1	TKP-2	GB+	NH	HO	MO-1+	MO-2	SCI*	SOLO-1	SOLO-2
TA*		0.937	0.405	0.279	0.604	0.613	0.144	0.315	0.793	0.423	0.036	0.117	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.730	0.243	0.477	0.748	0.099
AR-1	-0.013		0.883	0.541	0.748	0.892	0.459	0.919	0.946	0.847	0.297	0.351	0.045	0.054	0.937	0.973	0.432	0.477	0.306
AR-2	0.004	-0.017		0.811	0.396	0.613	0.216	0.414	0.532	0.324	0.324	0.207	<b>&lt;0.0001</b>	0.009	0.649	0.541	0.279	0.982	0.054
RA-1	0.008	0.000	-0.011		0.306	0.288	0.009	0.243	0.586	0.180	0.063	0.135	0.054	0.027	0.270	0.649	0.468	0.477	0.171
RA-2*	0.000	-0.005	0.003	0.008		0.757	0.153	0.243	0.757	0.901	0.072	0.072	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.721	0.586	0.144	0.225	<b>&lt;0.0001</b>
HERE	-0.002	-0.011	-0.003	0.006	-0.002		0.306	0.532	0.649	0.297	0.405	0.198	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.550	0.360	0.117	0.964	0.063
MRT-1	0.016	0.004	0.013	0.036	0.016	0.006		0.018	0.270	0.198	0.045	0.207	<b>&lt;0.0001</b>	0.018	0.306	0.180	0.117	0.180	<b>&lt;0.0001</b>
MRT-2	0.003	-0.013	0.004	0.007	0.004	-0.001	0.026		0.225	0.252	0.252	0.018	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.586	0.144	<b>&lt;0.0001</b>	0.955	0.054
KA	-0.005	-0.014	0.001	0.001	-0.003	-0.003	0.014	0.007		0.279	0.162	0.658	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.973	0.775	0.631	0.973	0.523
TKP-1	0.002	-0.012	0.003	0.008	-0.005	0.003	0.010	0.004	0.007		0.063	0.018	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.315	0.189	0.126	0.919	<b>&lt;0.0001</b>
TKP-2	0.011	0.004	0.004	0.020	0.009	0.000	0.027	0.003	0.008	0.007		0.045	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.252	0.045	<b>&lt;0.0001</b>	0.937	<b>&lt;0.0001</b>
GB+	0.011	0.007	0.011	0.014	0.014	0.006	0.019	0.018	0.000	0.020	0.017		<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.793	0.045	0.180	0.090	0.027
NH	<b>0.040</b>	0.024	<b>0.044</b>	0.020	<b>0.038</b>	<b>0.048</b>	<b>0.040</b>	<b>0.052</b>	<b>0.055</b>	<b>0.034</b>	<b>0.070</b>	<b>0.070</b>		0.604	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>
HO	<b>0.041</b>	0.021	0.037	0.031	<b>0.041</b>	<b>0.048</b>	0.033	<b>0.053</b>	<b>0.065</b>	<b>0.028</b>	<b>0.067</b>	<b>0.075</b>	-0.002		<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>	0.009	<b>&lt;0.0001</b>	<b>&lt;0.0001</b>
MO-1+	-0.003	-0.019	-0.001	0.010	0.000	-0.002	0.015	0.000	-0.015	0.008	0.007	-0.006	<b>0.059</b>	<b>0.063</b>		0.324	0.369	0.910	0.459
MO-2	0.005	-0.016	-0.002	-0.003	0.000	0.001	0.008	0.006	-0.004	0.004	0.007	0.013	<b>0.040</b>	<b>0.041</b>	0.003		0.018	0.991	0.018
SCI*	0.002	0.001	0.006	0.000	0.008	0.007	0.016	<b>0.021</b>	-0.002	0.010	<b>0.017</b>	0.009	<b>0.034</b>	0.038	0.004	0.009		0.838	0.045
SOLO-1	-0.004	0.002	-0.016	0.002	0.005	-0.012	0.013	-0.012	-0.021	-0.006	-0.007	0.012	<b>0.039</b>	<b>0.044</b>	-0.012	-0.018	-0.006		0.982
SOLO-2	0.009	0.005	0.015	0.009	<b>0.019</b>	0.011	<b>0.027</b>	0.011	0.000	<b>0.015</b>	<b>0.019</b>	0.020	<b>0.050</b>	<b>0.060</b>	0.001	0.011	0.010	-0.010	

+ cultivo

\* colectores

**Tabla VII. Comparaciones pareadas del Índice de fijación  $F_{ST}$  entre pares de muestras de *Pinctada margaritifera***

después de la corrección de alelos nulos. Debajo de la diagonal valor de  $F_{ST}$  y sobre la diagonal su valor  $P$ , en negritas los valores significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni. Abreviaturas según Tabla 1.

	TA*	AR-1	AR-2	RA-1	RA-2 × HR	MRT-1	MRT-2	KAU	TKP-1	TKP-2	GB +	NH	HO	MO-1 +	MO-2	SCI ×	SOLO-1	SOLO-2	
TA ×		0.883	0.297	0.441	0.378	0.640	0.072	0.270	0.802	0.315	0.000	0.054	<0.0001	<0.0001	0.721	0.126	0.423	0.748	0.081
AR-1	-0.013		0.856	0.568	0.559	0.919	0.378	0.928	0.964	0.856	0.207	0.414	0.045	0.081	0.946	0.973	0.450	0.351	0.315
AR-2	0.005	-0.017		0.694	0.162	0.595	0.261	0.342	0.523	0.351	0.153	0.144	<0.0001	<0.0001	0.505	0.550	0.234	0.892	<0.0001
RA-1	0.001	-0.004	-0.010		0.378	0.378	0.018	0.333	0.486	0.135	0.018	0.162	0.009	<0.0001	0.216	0.676	0.459	0.613	0.261
RA-2 ×	0.001	-0.002	0.009	0.003		0.306	0.027	0.099	0.450	0.288	0.000	0.018	<0.0001	<0.0001	0.405	0.270	0.018	0.288	<0.0001
HERE	-0.001	-0.011	-0.003	0.003	0.003		0.315	0.550	0.640	0.261	0.234	0.207	<0.0001	<0.0001	0.631	0.351	0.162	0.937	0.009
MRT-1	0.016	0.004	0.013	0.034	0.019	0.006		0.063	0.225	0.162	0.018	0.108	0.018	0.009	0.243	0.207	0.072	0.144	0.000
MRT-2	0.002	-0.013	0.004	0.005	0.008	-0.001	0.026		0.252	0.342	0.108	0.036	<0.0001	<0.0001	0.541	0.216	0.018	0.937	0.009
KA	-0.004	-0.014	0.001	-0.001	0.001	-0.003	0.014	0.007		0.234	0.117	0.604	<0.0001	<0.0001	0.964	0.811	0.694	0.973	0.414
TKP-1	0.003	-0.012	0.003	0.010	0.002	0.003	0.010	0.004	0.007		0.009	0.027	<0.0001	<0.0001	0.306	0.171	0.090	0.496	0.009
TKP-2	<b>0.014</b>	0.005	0.007	0.021	<b>0.018</b>	0.003	0.031	0.006	0.010	0.010		0.018	<0.0001	<0.0001	0.216	0.027	<0.0001	0.342	<0.0001
GB +	0.012	0.007	0.011	0.012	0.019	0.006	0.019	0.018	0.000	0.020	0.018		<0.0001	<0.0001	0.811	0.018	0.171	0.018	<0.0001
NH	<b>0.038</b>	0.024	<b>0.044</b>	0.024	<b>0.041</b>	<b>0.048</b>	<b>0.040</b>	<b>0.052</b>	<b>0.055</b>	<b>0.034</b>	<b>0.072</b>	<b>0.070</b>		0.622	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
HO	<b>0.040</b>	0.021	<b>0.037</b>	<b>0.035</b>	<b>0.045</b>	<b>0.048</b>	0.033	<b>0.053</b>	<b>0.065</b>	<b>0.028</b>	<b>0.070</b>	<b>0.075</b>	-0.002		0.009	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
MO-1 +	-0.003	-0.019	-0.001	0.007	0.003	-0.002	0.015	0.000	-0.015	0.008	0.007	-0.006	<b>0.059</b>	<b>0.063</b>		0.279	0.315	0.820	0.505
MO-2	0.005	-0.016	-0.002	-0.004	0.004	0.001	0.008	0.006	-0.004	0.004	0.009	0.013	<b>0.040</b>	<b>0.041</b>	0.003		0.054	0.991	0.009
SCI ×	0.002	0.001	0.006	0.002	0.012	0.007	0.016	<b>0.021</b>	-0.002	0.010	<b>0.019</b>	0.009	<b>0.034</b>	<b>0.038</b>	0.004	0.009		0.676	0.009
SOLO-1	-0.005	0.003	-0.012	-0.005	0.002	-0.009	0.016	-0.008	-0.018	-0.001	0.001	0.015	<b>0.039</b>	<b>0.044</b>	-0.009	-0.015	-0.003		0.973
SOLO-2	0.006	0.004	<b>0.017</b>	0.003	<b>0.018</b>	0.012	<b>0.030</b>	0.011	0.000	<b>0.016</b>	<b>0.021</b>	<b>0.022</b>	<b>0.049</b>	<b>0.061</b>	0.002	0.012	0.011	-0.008	

+ cultivo

× colectores

Nota: en un recuadro se indican los valores significativos que difieren del análisis sin la corrección de alelos nulos presentado en la tabla IV.

**Tabla VIII. Comparaciones pareadas del índice de fijación  $R_{ST}$  entre pares de muestras de *Pinctada margaritifera*. Debajo de la diagonal valor de  $R_{ST}$  y sobre la diagonal su valor P, en negritas los valores significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni. Abreviaturas según Tabla 1.**

	TA <sup>x</sup>	AR-1	AR-2	RA-1	RA-2 × HR	MRT-1	MRT-2	KAU	TKP-1	TKP-2	GB+	NH	HO	MO-1+	MO-2	SCI ×	SOLO-1	SOLO-2	
TA ×		0.982	0.234	0.919	0.459	0.757	0.486	0.892	0.189	0.090	0.189	0.306	0.162	0.468	0.883	0.604	0.532	0.991	0.378
AR-1	-0.053		0.405	0.694	0.811	0.991	0.595	0.991	0.586	0.486	0.766	0.631	0.387	0.865	0.991	0.991	0.955	0.793	0.784
AR-2	0.015	-0.005		0.252	0.432	0.261	0.072	0.414	0.243	0.946	0.829	0.766	0.063	0.144	0.333	0.216	0.622	0.477	0.207
RA-1	-0.039	-0.024	0.015		0.324	0.964	0.180	0.991	0.216	0.225	0.649	0.784	0.730	0.856	0.937	0.838	0.757	0.405	0.342
RA-2 ×	-0.002	-0.024	-0.005	0.005		0.757	0.387	0.649	0.685	0.477	0.333	0.315	0.009	0.081	0.892	0.658	0.667	0.982	0.486
HERE	-0.015	-0.057	0.003	-0.032	-0.012		0.685	0.802	0.423	0.261	0.396	0.414	0.081	0.441	0.964	0.775	0.730	0.991	0.649
MRT-1	-0.007	-0.012	0.045	0.037	0.001	-0.017		0.505	0.712	0.162	0.180	0.117	0.036	0.108	0.874	0.865	0.459	0.649	0.919
MRT-2	-0.017	-0.060	0.003	-0.050	-0.006	-0.015	-0.005		0.342	0.198	0.405	0.631	0.577	0.838	0.829	0.586	0.649	0.991	0.459
KA	0.009	-0.016	0.009	0.026	-0.011	-0.004	-0.023	0.010		0.387	0.153	0.198	0.018	0.018	0.658	0.604	0.523	0.937	0.748
TKP-1	0.023	-0.004	-0.021	0.014	-0.003	0.008	0.026	0.013	0.003		0.811	0.568	<b>&lt;0.0001</b>	0.027	0.279	0.171	0.568	0.667	0.117
TKP-2	0.011	-0.018	-0.015	-0.010	0.000	0.002	0.025	0.001	0.012	-0.007		0.892	0.054	0.117	0.432	0.189	0.694	0.991	0.081
GB +	0.004	-0.015	-0.019	-0.023	0.006	-0.001	0.042	-0.009	0.026	-0.005	-0.014		0.207	0.559	0.432	0.207	0.441	0.541	0.108
NH	0.010	0.000	0.044	-0.017	0.055	0.015	0.067	-0.004	0.080	<b>0.055</b>	0.028	0.012		0.784	0.162	0.018	0.072	0.117	<b>&lt;0.0001</b>
HO	-0.005	-0.035	0.024	-0.028	0.025	-0.002	0.041	-0.014	0.050	0.033	0.014	-0.002	-0.011		0.288	0.117	0.252	0.865	0.036
MO-1 +	-0.023	-0.069	0.002	-0.044	-0.022	-0.024	-0.032	-0.018	-0.017	0.006	0.000	-0.002	0.019	0.000		0.991	0.820	0.991	0.937
MO-2	-0.008	-0.044	0.014	-0.016	-0.007	-0.013	-0.025	-0.005	-0.010	0.016	0.013	0.017	0.036	0.016	-0.022		0.550	0.991	0.946
SCI ×	-0.003	-0.034	-0.011	-0.018	-0.009	-0.012	-0.005	-0.008	-0.005	-0.005	-0.007	-0.006	0.024	0.005	-0.016	-0.004		0.991	0.378
SOLO-1	-0.059	-0.026	-0.004	-0.005	-0.028	-0.064	-0.015	-0.068	-0.030	-0.008	-0.019	-0.007	0.023	-0.017	-0.092	-0.053	-0.038		0.991
SOLO-2	0.000	-0.022	0.018	0.000	0.000	-0.008	-0.025	0.003	-0.013	0.019	0.018	0.029	<b>0.053</b>	0.029	-0.020	-0.011	0.001	-0.031	

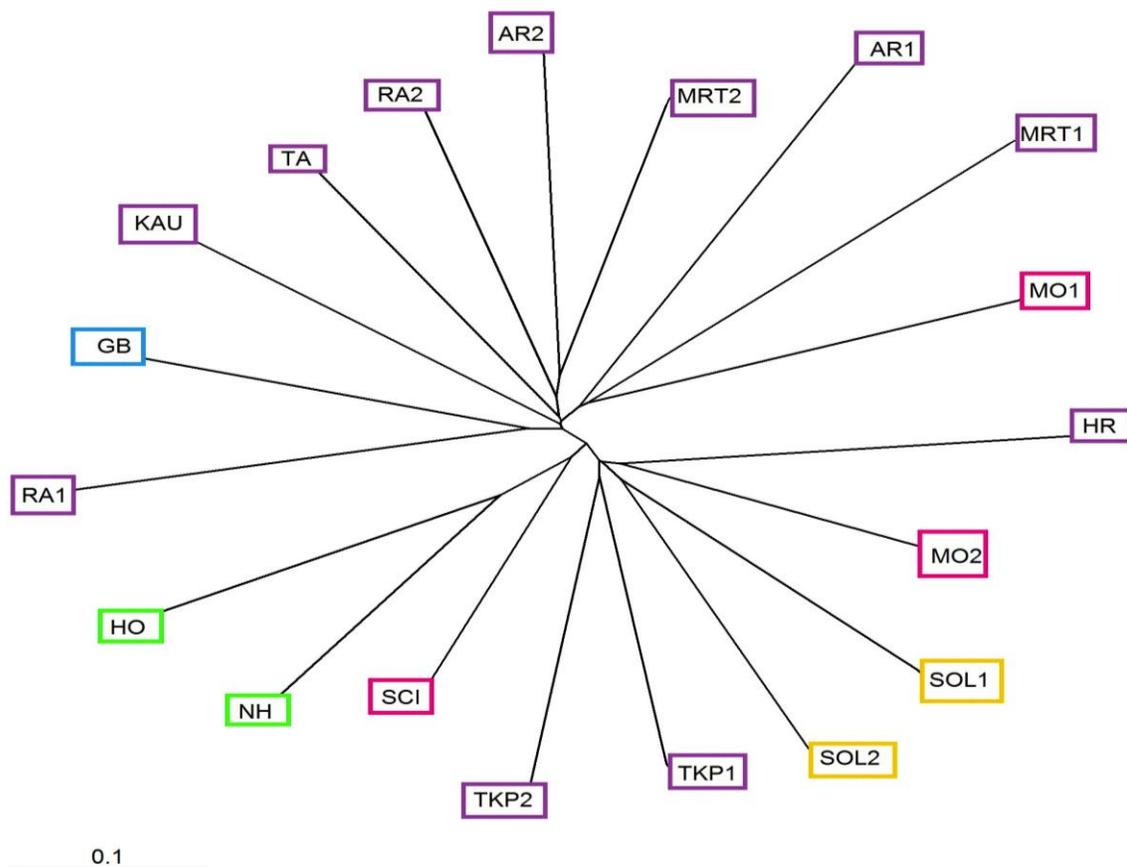
+ cultivo

× colectores

**Tabla IX. Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para *Pinctada margaritifera*.**

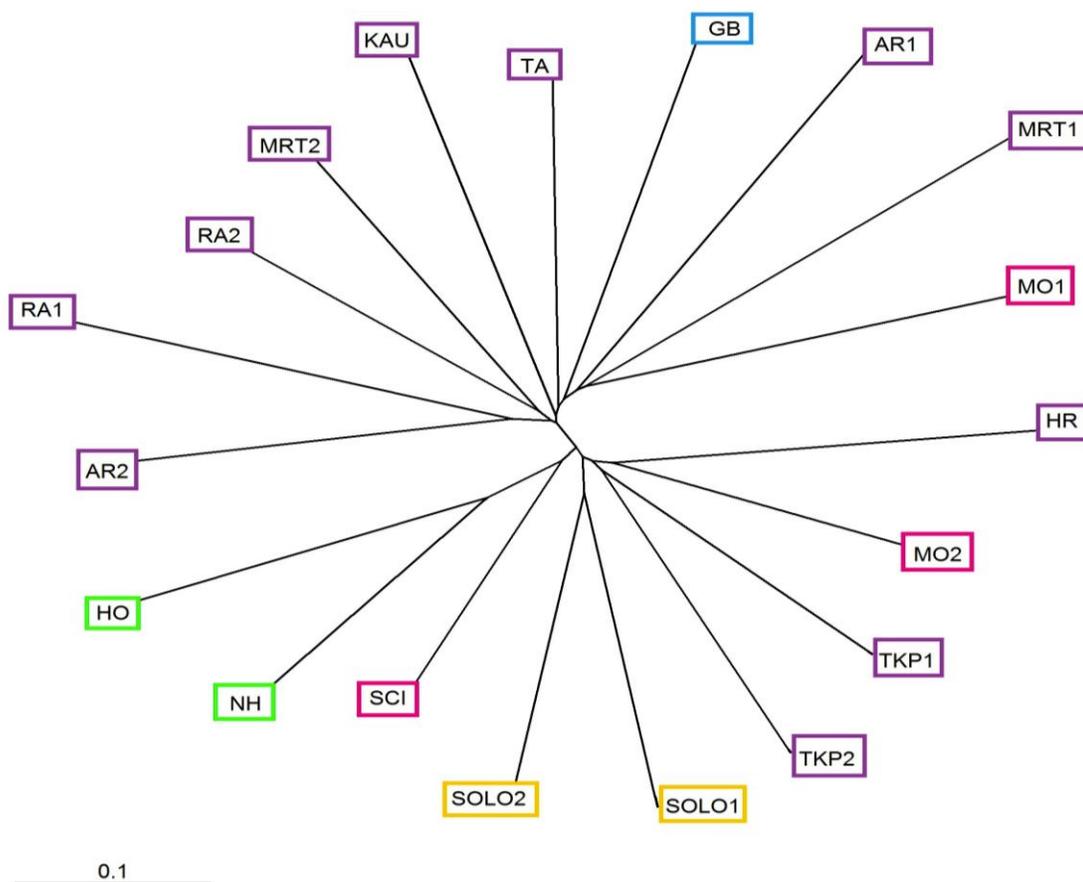
Porcentaje de variación	a) Índice de fijación FST (varianza genética).				b) Índice de fijación RST (varianza molecular).			
	GL	CV	Porcentaje de variación	P	GL	CV	Porcentaje de variación	P
Entre Archipiélagos	4	0.0147	1.74	0.0059	4	2.8653	1.03	0.0342
Entre poblaciones dentro de archipiélagos	14	0.0013	0.16	0.2512	14	-2.7503	-0.98	0.9844
Entre individuos dentro de poblaciones	551	0.0528	6.24	<0.0001	551	24.8594	8.89	0.0029
Dentro de individuos	570	0.7763	91.86	<0.0001	570	254.5447	91.07	0.0068
Total	1139	0.8451			1139	279.5192		

FIS= 0.0636	P= 0.0000	Variación entre individuos dentro de poblaciones	RIS= 0.08897	P= 0.00293
FSC= 0.0016	P= 0.25122	Variación entre poblaciones dentro de archipiélagos	RSC= -0.00994	P= 0.98436
FCT= 0.0174	P= 0.00587	Variación entre archipiélagos	RCT= 0.01025	P= 0.03421
FIT= 0.0814	P= 0.0000	Variación de individuos entre poblaciones y archipiélagos	RIT= 0.08935	P= 0.0068



**Figura. 2** Árbol sin enraizar de Nei-Joining de las relaciones entre localidades de *Pinctada margaritifera* basado en distancias Cavalli-Sforza y Edwards (1967).

- Tuamotu
- Gambier
- Societe
- Marquesas
- Solomon



**Figura. 3** Árbol sin enraizar Neibor-Joining de las relaciones entre localidades de *Pinctada margaritifera* basado en distancias Cavalli-Sforza y Edwards (1967) corregidas para alelos nulos mediante el método INA (Chapuis y Estoup, 2007).



## VII. DISCUSIÓN

### VII.I Diversidad genética

El intervalo del tamaño alélico de todos los loci en este estudio fué mayor al reportado inicialmente por Herbinger *et al.* (2006), debido al mayor número de individuos y localidades analizados aquí.

El grado de polimorfismo encontrado en las muestras de *Pinctada margaritifera* (entre 22 y 66 alelos por locus) fue mayor que los niveles reportados para la ostra perlera del archipiélago Indo-Australiano *P. maxima* (entre 4 y 23 alelos por locus) utilizando seis loci microsatélites (Lind *et al.*, 2007). A la fecha, no se han encontrado publicaciones con valores de diversidad genética evaluada con microsatélites para *P. margaritifera*. Sin embargo, se han realizado estudios con otros marcadores moleculares observando que los valores de diversidad alélica encontrados en este estudio fueron mayores que los reportados para marcadores nucleares anónimos (MNA) (entre 5 y 7 alelos por locus) en esta especie (Arnaud-Haond *et al.*, 2002 y Arnaud-Haond *et al.*, 2003).

El intervalo de riqueza alélica encontrado para *Pinctada margaritifera* fue de  $R_S=2.984$  a  $R_S=11.851$ . La riqueza alélica corregida para el tamaño de la muestra es un buen indicador de la diversidad genética. La localidad de Hereheretue presentó el promedio mas alto de riqueza alélica ( $R_S=9.19$ ). Las dos muestras de Takapoto, así como las dos muestras de las islas Salomón también presentaron altos valores de riqueza alélica (Tabla 3). Mientras que los promedios mas bajos de riqueza alélica se observaron en las dos muestras de las Marquesas. Lo anterior concuerda con el patrón de agrupación observado en los árboles (figuras 2 y 3).

La diversidad genética observada en este estudio (entre 0.5570 y 0.9860) fue considerablemente más alta que la registrada para aloenzimas y MNA en la misma especie. Para aloenzimas se encontró una diversidad genética entre 0.238 y 0.292; mientras que mediante MNA, la diversidad genética fue entre 0.383 y 0.518 (Arnaud-Haond *et al.*, 2003a).

El intervalo de la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) en el presente estudio (de 0.231 a 0.941), fue similar a lo encontrado en *P. maxima* (de 0.242 a 0.890) (Lind *et al.*, 2007). Mientras que Arnaud-Haond *et al.* (2004) reportaron niveles más bajos de  $H_o$  empleando MNA en su estudio sobre la composición y variación genética de las poblaciones de *P. margaritifera* relacionadas con los eventos de translocación. Los autores reportaron una  $H_o$  de 0.13 a 0.76 en muestras colectadas antes de las translocaciones, mientras que en las muestras analizadas posteriormente a estos eventos la  $H_o$  fue de 0.04 a 0.64 (Arnaud-Haond *et al.*, 2004).

Por otro lado, en el presente trabajo se detectaron desviaciones significativas del Equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) para la mayoría de las pruebas para cada locus en cada muestra: 62 de 152 casos totales (41%) (Tabla 3). Estas desviaciones de H-W fueron causadas debido al exceso de homocigotos. En la madre perla *P. maxima* se han encontrado desviaciones significativas de H-W en 21 de 64 pruebas (33%) (Benzie y Smith-Keune, 2006). Este fenómeno también ha sido reportado para otras especies de importancia comercial como abulón (Miller *et al.*, 2009), mejillones (Beaumont, 1991; Appio y Weber, 2007) y ostión (Carlsson *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2006; Rose, *et al.*, 2006).

La elevada deficiencia de heterocigotos en *P. margaritifera* ha sido encontrada también en aloenzimas (Arnaud-Haond *et al.*, 2003a) y MNA (Arnaud-Haond *et al.*, 2008). Este es un fenómeno que se presenta comúnmente en ostras perleras (Johnson y Joll, 1993; Benzie y Smith-Keune, 2006; Lind *et al.*, 2007) y otros invertebrados marinos (Berger 1983, Fujio *et al.*, 1983; Zourus y Foltz, 1984; Gaffney *et al.*, 1990; Beaumont y Zouros, 1991; Corte-Real, 1992; Gaffney, 1994; Zouros y Pogson 1994; Corte-Real *et al.*, 1996; Del Rio-Portilla y Beaumont, 2001; Reece *et al.*, 2004; Carlsson, *et al.*, 2006; Rose, *et al.*, 2006; Weber y Hawkins, 2006; Appio y Weber, 2007).

El déficit de heterocigotos se ha atribuido a diversos factores como el muestreo de poblaciones genéticamente discretas o efecto de Wahlund (Gaffney, 1994), presión selectiva diferencial actuando sobre genotipos específicos a lo largo

del ciclo de vida (Durand y Blanc, 1989), debido a una heterogeneidad en las tasas y fuentes de reclutamiento (Johnson y Black, 1984), apareamiento selectivo (Smith, 1987), debido a la presencia de alelos nulos (Zouros y Foltz, 1984; Foltz, 1986; Reece *et al.*, 2004) y también a causa de la alta carga genética presente en los bivalvos (Hedgecock *et al.*, 1996; Bierne *et al.*, 1998, 2000). Al no encontrar evidencia de selección post-asentamiento en dos clases de juveniles de *P. maxima* en años consecutivos Benzie y Smith-Keune (2006) asumieron que las deficiencias de heterocigotos se deben principalmente a dos causas: i) endogamia causada por la variación en el éxito reproductivo y ii) a la presencia de alelos nulos. La presencia de alelos nulos ha sido altamente evidenciada en moluscos encontrando altas frecuencias en sus estimaciones (Hare *et al.*, 1996; Launey y Hedgecock, 2001; Li *et al.*, 2003; Hedgecock *et al.*, 2004; Astanei *et al.*, 2005; Benzie y Smith-Keune, 2006).

Lemer *et al.* (2011) demostraron que en *P. margaritifera* la presencia de alelos nulos es la causa de las deficiencias de heterocigotos en los loci Pmarg37, Pmarg45 y Pmarg68 previamente desarrollados por Herbinger *et al.* (2006). En dicho estudio se analizó la presencia de alelos nulos empleando el método “paso por paso” (en inglés step-by-step) para reamplificar homocigotos e individuos nulos con pares de primers rediseñados. Después de la amplificación con el par de primers originales, las poblaciones analizadas presentaron desviaciones del equilibrio de H-W supuestamente por la presencia de alelos nulos. Posterior a tres pasos de amplificación con pares de primers modificados, todos los loci fueron corregidos para la presencia de alelos nulos y se demostró que éstos fueron la causa de las desviaciones de equilibrio iniciales (Lemer *et al.*, 2011).

En este estudio se detectó la presencia de alelos nulos de manera inicial cuando se analizaron los datos obtenidos para los loci Pmarg44 y Pmarg79; misma que fue corregida de manera similar al método empleado por Lemer *et al.* (2011) complementando los genotipos de ambos loci. Como resultado de lo anterior se observó que todas las localidades se ajustaron al equilibrio H-W para el loci Pmarg79. Lemer *et al.* (2011) registraron presencia de alelos nulos para el locus

Pmarg37. Sin embargo, en nuestros resultados no se encontraron desviaciones del equilibrio H-W en ninguna de las localidades en el locus Pmarg37 y las frecuencias de alelos nulos en este locus fueron bajas y en algunos casos nulas (Tabla 4) .

Las frecuencias más altas de alelos nulos se encontraron el locus Pmarg2 (de 0.1312 a 0.3160). De la misma manera, el mayor número de desviaciones del equilibrio H-W (17 de 19 localidades) por locus se presentaron en Pmarg2. Mientras que en los loci Pmarg37 y Pmarg79 donde no se registraron desviaciones del equilibrio H-W en ninguna de las localidades, la estimación de alelos nulos fue mínima y en algunos casos nula. De esta manera se hizo evidente que las desviaciones de equilibrio de H-W ocurridas por el exceso de heterocigotos están ampliamente relacionadas con la presencia de alelos nulos.

Las frecuencias de alelos nulos por muestra por locus estimadas en este estudio (entre 0.0000 y 0.3422) son similares a los valores reportados para la ostra perlera *P. maxima*, para la cual se encontraron frecuencias de 0.062 a 0.309 (Benzie y Smith-Keune, 2006).

En este trabajo se ha demostrado que la presencia de alelos nulos puede causar sobrestimaciones importantes de los valores del índice  $F_{ST}$  (Chapuis y Estoup, 2007). Dicha sobrestimación se observó en este estudio al encontrar una pequeña diferencia entre el valor global de  $F_{ST}$  ( $F_{ST}=0.017$ ) después de la corrección de alelos nulos ( $F_{ST}ENA=0.016$ ) pero fue más evidentemente al comparar los valores de  $F_{ST}$  y  $F_{ST}ENA$  por locus como es el caso de Pmarg45, Pmarg68 y Pmarg77 (Tabla 5).

## VII.II Estructura genética

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y las comparaciones pareadas entre las poblaciones se estimaron mediante la frecuencia de los alelos o genotipos (índice  $F_{ST}$ ) y también mediante la variación del número de copias ( $R_{ST}$ ). Sin embargo, en el caso del AMOVA se obtuvo un mayor grado de diferenciación de los archipiélagos mediante el índice  $F_{ST}$  (1.74% de varianza,  $F_{CT}=0.0174^{**}$ ) que con  $R_{ST}$  (1.03% de variación,  $R_{CT}=0.01025^*$ ). En el caso de las estimaciones

pareadas con ambos índices es altamente evidente la diferencia de resultados. Mediante  $F_{ST}$  se encontraron 33 diferencias genéticas, a partir de las cuales se observa el patrón de estructuración genética entre los archipiélagos Tuamotu-Gambier y Sociedad, y las poblaciones de las Marquesas y Salomón; mientras que mediante  $R_{ST}$  se encontró diferenciación genética únicamente entre la localidad de Nuku Hiva y las localidades de Takapoto1 y Solo2 (Tabla 7).

La diferencia en las estimaciones de ambos índices se deben a los distintos modelos de mutación que suponen. En el caso de  $F_{ST}$ , este supone el modelo de mutación de alelos infinitos (IMM) en el que cada mutación genera un alelo distinto de manera que no consideran la posibilidad de homoplasia. La homoplasia se da cuando dos alelos son idénticos por convergencia, es decir, provienen de alelos distintos y por mutación convergen en un mismo tamaño, uno por borrado y otro por la inserción de un motivo de repetición. Por otra parte  $R_{ST}$  sigue el modelo de mutación por pasos (SMM) en el que los alelos de tamaños cercanos están más relacionados, por lo que se requiere un mayor número de mutaciones y transcurrirá mayor tiempo para que se produzcan grandes diferencias en los tamaños, reflejando relaciones más antiguas entre las poblaciones (Nauta y Weissing, 1996; Benzie y Smith-Keune, 2006). El estadístico  $R_{ST}$  resultará impreciso cuando los microsatélites no siguen el modelo de mutación SMM (Nauta y Weissing, 1996, Balloux y Lugon-Moulin, 2002). En cambio, de acuerdo con Gaggiotti *et al.* (1999),  $R_{ST}$  resulta ser un buen estimador bajo condiciones ideales, es decir, un amplio tamaño de muestras (>50) y gran cantidad de loci (>20). Mientras que cuando el tamaño de muestra es pequeño (<10) y se cuenta con pocos loci (<20),  $F_{ST}$  siempre proporcionará mejores estimaciones. De manera que los resultados de  $F_{ST}$  pueden presentar una mejor estimación en el caso de este estudio ya que se utilizaron únicamente 8 loci y los tamaños de muestra de las poblaciones son igual o menores a 50 individuos, además  $F_{ST}$  es más sensible que  $R_{ST}$  detectando estructura poblacional reciente (Benzie y Smith-Keune, 2006). Aunado a lo anterior, dada la gran cantidad de alelos encontrados en todos los loci, es probable que los microsatélites utilizados en este estudio sigan el modelo de mutación IMM.

En gran cantidad de estudios donde se analiza la estructura poblacional no se corrige la presencia de alelos nulos a pesar de los sesgos que estos producen en las estimaciones. Sin embargo, como se observó en el presente estudio, es recomendable realizar la corrección. Si no se realizan estos análisis se puede sobreestimar el número de homocigotos y por consiguiente obtener una deficiencia de heterocigotos.

En este estudio se obtuvieron resultados que revelan de manera significativa la existencia de estructura genética para la especie *P. margaritifera* en la región de la Polinesia Francesa empleando microsatélites.

Mediante el AMOVA se reveló una significativa variación genética entre archipiélagos al obtener los valores para  $R_{CT}=0.01025^*$  y  $F_{CT}= 0.0174^{**}$ ). De acuerdo con Hartl y Clark (1997), un valor de  $F_{ST}<0.05$  indica poca diferenciación genética. A pesar de que los índices de diferenciación son pequeños, son significativos y se encuentran en el rango de valores que se han reportado para *P. maxima* por Benzie y Smith-Keune (2006) ( $F_{ST}=0.009$  y  $R_{ST}=0.016$ ) y Lind *et al.* (2007) ( $F_{ST}=0.027$  y  $R_{ST}=0.023$ ).

Los resultados de este estudio difieren de la nula subdivisión poblacional entre archipiélagos reportada anteriormente por Arnaud-Haond y colaboradores (2004). A partir de MNA no se detectó divergencia genética significativa entre los archipiélagos Sociedad y Tuamotu-Gambier, ni entre localidades dentro de los archipiélagos (Arnaud-Haond *et al.*, 2004), mientras que en este estudio se observó que la localidad de Scilly presenta diferencias con alguna localidades de Tuamotu. La diferencia entre archipiélagos obtenida mediante el AMOVA en nuestro estudio puede ser causada principalmente por las diferencias entre los archipiélagos de las Islas Marquesas y las Islas Salomón.

Mediante el análisis de diferencias pareadas de  $F_{ST}$ , Arnaud-Haond y colaboradores (2008) encontraron que de manera general, no hay diferenciación genética significativa entre los archipiélagos Tuamotu-Gambier y Sociedad y la única diferencia entre estos archipiélagos es entre los atolones de Mopelia (Sociedad) y Arutua (Tuamotu-Gambier) y entre Scilly (Sociedad) y Makemo

(Tuamotu-Gambier). Sin embargo, los resultados de las comparaciones pareadas de  $F_{ST}$  después de la corrección secuencial de Bonferroni obtenidos en este estudio revelan diferencias significativas entre la población de Scilly (Sociedad) y las poblaciones de Marutea2 (al sur de Tuamotu-Gambier) y Takapoto2 (al norte de Tuamotu-Gambier) (Tabla 6), esta última diferencia se mantiene posterior a la estimación de alelos nulos (Tabla 7).

Dentro del archipiélago Tuamotu-Gambier, los autores Arnaud-Haond *et al.* (2008) encontraron diferencias significativas entre los atolones de Marutea y Arutua (0.031), Marutea y Kauehi (0.04), Marutea y Hereheretue (0.048), Makemo y Hereheretue (0.029), Mangareva y Hereheretue (0.042), Mangareva y Kauehi (0.040), Takapoto3 y Arutua (0.034), Takapoto1 y Takapoto3 (0.029). Dichos resultados evidenciaron de manera particular la diferenciación del atolón mas aislado del archipiélago: Hereheretue y los atolones mas al sur: Marutea y Mangareva, del resto de los atolones del archipiélago. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio posterior a la corrección secuencial de Bonferroni muestran un esquema de homogeneidad genética entre los atolones del archipiélago Tuamotu-Gambier, ya que la única diferencia encontrada es entre la muestra Takapoto2 con Takaroa y Raroia2 fue posterior a la estimación de alelos nulos (Tabla 7).

La homogeneidad genética entre las poblaciones del archipiélago de Tuamotu-Gambier podría deberse al efecto que han tenido los grandes eventos de transferencia de larvas entre las islas que se llevaron a cabo durante los 20 años anteriores a la colecta de nuestras muestras, considerando además la posible reproducción de las ostras en cultivo como se han mencionado por Arnaud-Haond y colaboradores (2003b, 2004). Sin embargo, también podría ser a causa de una amplia dispersión de las larvas de manera natural a lo largo de esta región en conjunto con la ausencia de corrientes que actúan como barreras limitando la dispersión.

En los árboles sin enraizar de Neighbor Joining (Figs 2 y 3) se observó de manera interesante que las muestras provenientes de los atolones Hereheretue

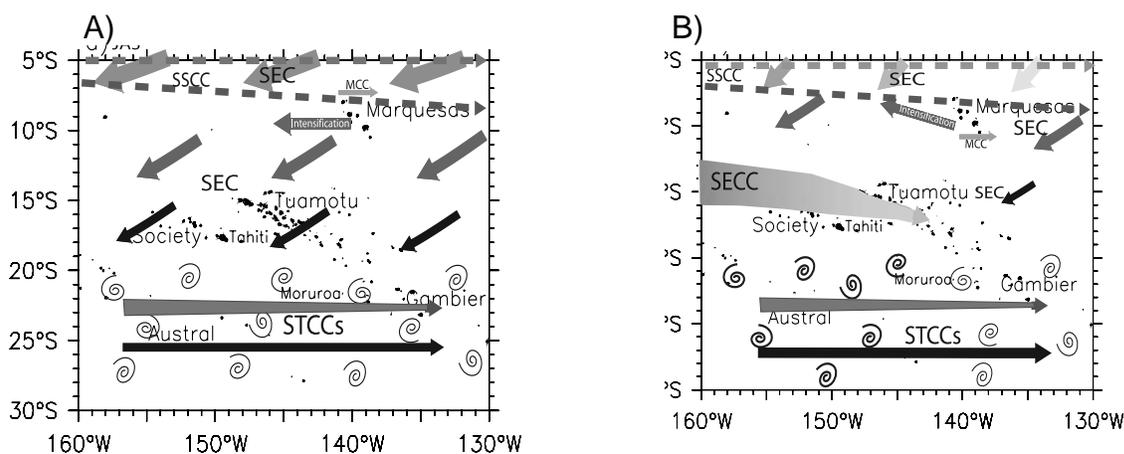
(HERE) y Takapoto (TKP1 y TKP2) se agrupan en un cluster separado del resto de las muestras provenientes del archipiélago Tuamotu-Gambier. También se observó que las muestras HERE, TKP1 y TKP2 presentaron los valores más altos de riqueza alélica (Tabla3). La divergencia genética observada para estas muestras con respecto al resto de las muestras de Tuamotu-Gambier puede ser a consecuencia del limitado flujo genético de estas localidades debido a que Hereheretue y Takapoto son los únicos atolones completamente cerrados en este archipiélago, por lo que no existe mucho intercambio de agua entre la laguna y océano abierto.

En relación con el archipiélago de las Marquesas, nuestros resultados reflejan diferencias genéticas entre Nuku-Hiva y el resto de las localidades con excepción de Arutua1, Raroia1 y Marutea1, mientras que Hiva-Oa no presenta diferencias únicamente con Arutua1 y Marutea1 después de la corrección para alelos nulos (Tablas 6 y 7) y la divergencia de estas poblaciones se ve claramente en los árboles de distancias genéticas; de manera que nuestros resultados reafirman la estructura genética del archipiélago Marquesas reportada previamente (Arnaud-Haond *et al.*, 2003a, 2004, 2008).

La alta divergencia genética de la población de las islas Marquesas que ha sido identificada a través de ADN mitocondrial, aloenzimas, MNA, es actualmente confirmada mediante microsatélites. El evidente aislamiento genético de las Islas Marquesas podría ser explicado por dos diferentes escenarios: i) el efecto de las corrientes oceánicas en la región y ii) condiciones paleogeográficas históricas, o por la combinación de ambos.

La región de la Polinesia Francesa está influenciada principalmente por los flujos de la Corriente Sur Ecuatorial (por sus siglas en inglés SEC) que fluye hacia el oeste entre los 0° y 20° de latitud Sur, la Contra Corriente Sur Ecuatorial (por sus siglas en inglés SECC) con dirección hacia el este, y la Contra Corriente de las Marquesas (MCC) que durante todo el año fluye de oeste a este en dirección opuesta a la SEC y se extiende hasta 500km de longitud (Rougerie y Wauthy,

1986). El patrón de corrientes presenta un cambio dependiendo de la época del año.



**Fig. 4 Patrón de corrientes en la región de la Polinesia Francesa. A) durante el invierno, B) durante el verano. SEC: Corriente Sur Ecuatorial, MCC: Contra Corriente de las Marquesas, SECC: Contra Corriente Sur Ecuatorial, STCC: Contra Corriente Sur Tropical (Imagen modificada de Martinez *et al.*, 2009).**

Durante el verano Austral (de Noviembre a Abril) la SEC fluye hacia el suroeste pasando por el archipiélago de las Marquesas ( $6^{\circ}\text{S}$ - $12^{\circ}\text{S}$ ) y a partir de diciembre y hasta marzo aparece el flujo de la SECC entre los  $7^{\circ}\text{S}$  y  $14^{\circ}\text{S}$ . La CCM se presenta al sur del archipiélago Marquesas (a los  $10^{\circ}\text{S}$ ,  $140^{\circ}\text{O}$ ) (Rougerie y Wauthy, 1986) (Fig.4). Durante el invierno (de Mayo a Octubre) el flujo de la SEC presenta fuertes velocidades y se intensifica alrededor de las islas Marquesas mientras que disminuye alrededor de los archipiélagos Tuamotu-Gambier y Sociedad. Durante el invierno la CCM fluye al norte de las islas Marquesas y desaparece el flujo proveniente de la SECC (Fig. 4) (Martinez *et al.*, 2006, 2009). Este patrón de circulación en la Polinesia Francesa da lugar a la formación de una barrera que impide la dispersión de las larvas principalmente entre las islas Marquesas y Tuamotu Gambier (Vermeij 1987; Planes y Fauvelot 2002).

De acuerdo con la segunda hipótesis, durante las glaciaciones del Pleistoceno se efectuó un cambio drástico en el nivel del mar que provocó la emersión y drenado de los atolones de la Polinesia Francesa, haciendo imposible la sobrevivencia de las especies que habitaban al interior de las lagunas de los atolones (Ladd, 1960; Paulay, 1990, Woodroffe *et al.*, 1990; Planes *et al.*, 1993; Bard *et al.*, 1996; Cabioch *et al.*, 1999). De acuerdo con Paulay (1990, 1991) los bivalvos de sustratos blandos y que habitaban al exterior de las lagunas como *P. margaritifera* se vieron menos afectadas que las habitantes exclusivamente de las lagunas. Sin embargo, las islas Marquesas representaron una zona de refugio para algunas de las especies entre ellas *P. margaritifera* (Paulay, 1990). Esto debido a que, algunas poblaciones de la ostra perlera de labios negros permanecerían en las Marquesas durante los episodios de glaciación mientras en el resto de las islas de la Polinesia Francesa se llevaría a cabo un proceso de extinción y recolonización (Arnaud-Haond *et al.* 2003a). La hipótesis anterior es apoyada por mediante los análisis con ADN mitocondrial donde se observaron bajos niveles de diversidad haplotípica y nucleotídicas y un reciente cuello de botella en los archipiélagos Tuamotu-Gambier, Sociedad y Cook, contrario a la alta diversidad haplotípica y nucleotídica observada en las Marquesas (Arnaud-Haond *et al.* 2003a). La diversidad genética reportada para MNA fue mayor en las Marquesas, pero este patrón no se observó con aloenzimas (Arnaud-Haond *et al.* 2003a). Contrario a lo anterior, las islas Marquesas presentan los niveles más bajos de diversidad y riqueza alélica a partir de microsatélites. La fuerte diferenciación de las poblaciones de las Marquesas con el resto de las poblaciones de la Polinesia Francesa y regiones del Indo-Pacífico ha sido reportada también en el pez arrecifal *Acanthurus triostegus* (Planes, *et al.*, 1993; Planes y Fauvelot, 2002).

Aunado a lo anterior los arrecifes de las Marquesas pudieron haber sido colonizados durante condiciones climáticas y oceanográficas diferentes del resto de los arrecifes de la Polinesia Francesa provocando así un fuerte aislamiento de las mismas.

Por otra parte, de manera interesante nuestros resultados revelan un reducido número de diferencias apareadas entre la localidad Solo1 al este del archipiélago Salomón con Tuamotu-Gambier e islas de la Sociedad a pesar de la distancia geográfica. Mientras que la muestra de Solo2 (al oeste del archipiélago) no presentó diferenciación genética con el archipiélago de la Sociedad, pero sí con varios atolones de Tuamotu-Gambier (Tablas 6 y 7), lo anterior también se ve reflejado en el árbol de distancias genéticas (Figs. 2 y 3). Los archipiélagos Tuamotu-Gambier y Sociedad están formados en su mayoría por atolones que forman grandes lagunas y presentan un escaso intercambio de agua con el océano abierto (Gabrie y Salvat, 1985). A diferencia de la estructura de los atolones de la Polinesia Francesa, la mayoría de los arrecifes en el Pacífico centro-occidental, donde se localizan las islas Salomón, tienen una boca más "abierta" propiciando un mayor flujo de agua entre los atolones y mar abierto (Wells, 1988; Andrews y Pickard, 1990; Friedman *et al.*, 1998). Bajo este escenario, las larvas de *P. margaritifera* de esta región pueden tener una mayor oportunidad de ser transportadas por las corrientes oceánicas al mar abierto proporcionándoles mayor capacidad de dispersión.

### **VII.III Impacto de las translocaciones**

En la región de la Polinesia Francesa se han documentado grandes movimientos de larvas entre las islas de distintos archipiélagos (Arnaud-Haond *et al.*, 2004) y es posible que se sigan llevando a cabo aún más sin quedar registrados. Estas translocaciones han ocurrido sin tener un conocimiento previo de la composición genética de las poblaciones de los lugares de origen y destino de las larvas. Recientemente se ha evidenciado una reducción en la estructura genética de las poblaciones de *P. margaritifera* en la Polinesia Francesa, misma que se confirma con nuestros resultados.

El intercambio de larvas entre poblaciones genéticamente distintas, ha permitido el incremento de la homogeneidad entre poblaciones de diferentes archipiélagos.

La alta densidad de ostras en los cultivos podrían optimizar la sincronización de los desoves e incrementar el éxito de la fertilización, ya que se sabe que hay una relación lineal entre la densidad y el éxito de la fecundación en varias especies de invertebrados acuáticos (Levitan *et al.*, 1992; Metaxas *et al.*, 2002). Conforme a lo anterior y si hay eventos reproductivos en los cultivos como se ha mencionado (Arnaud-Haond *et al.*, 2004), los individuos exógenos estarán contribuyendo a la poza genética de las poblaciones locales.

Estos movimientos masivos pueden provocar efectos desfavorables para la industria del cultivo de perlas al reducir la capacidad de adaptación de las poblaciones nativas y contribuir a la pérdida de algunas adaptaciones locales favorables. En relación con lo anterior, se ha mencionado la pérdida de algunas diferencias en el color y brillo de las perlas que alguna vez fueron características de determinadas islas. Por ejemplo, Benzie y Ballment (1994) mencionan que en el pasado, era posible identificar el lugar de origen de las perlas en base a su color, brillo, iridiscencia y forma. Sin embargo a partir de las transferencias masivas de larvas entre las distintas islas se ha tornado difícil diferenciar las perlas cultivadas en diferentes lagunas de Tahití (Benzie y Ballment, 1994).

## VIII. CONCLUSIONES

Los marcadores nucleares microsatélites mostraron altos valores de diversidad genética en la ostra perlera *Pinctada margaritifera* en la región de la Polinesia Francesa.

Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg fueron a consecuencia de la presencia de alelos nulos. La presencia de alelos nulos en *P. margaritifera* debe ser considerada y corregida en los estudios de genética de poblaciones para evitar sobreestimación de los resultados.

Se corroboró que la amplificación de un locus mediante al menos dos pares de primers diferentes representa una buena técnica para corregir la presencia de alelos nulos. Por lo que se considera esencial hacer la corrección para estudios subsiguientes de *P. margaritifera*.

La alta variación observada en los microsatélites en este estudio tuvo resolución suficiente para permitir la diferenciación poblacional que no se detectó en estudios anteriores con otros marcadores nucleares (Arnaud-Haond *et al.*, 2005, 2008).

Se confirmó la divergencia genética de la población de las islas Marquesas respecto a las poblaciones del resto de la Polinesia Francesa e islas Salomón. La fuerte diferenciación de estas islas puede ser a consecuencia del patrón de circulación oceánica en la región, como resultado de condiciones biogeográficas en el pasado así como posibles adaptaciones locales y falta de prácticas de cultivo.

## IX. RECOMENDACIONES

- 1.- Evaluar la frecuencia de los alelos nulos mediante por lo menos un par de primers adicionales en el resto de los loci microsatelitales para *Pinctada margaritifera*.
- 2.- Incrementar el número de localidades de *Pinctada margaritifera* en el intervalo de distribución de la especie con el fin de evaluar el grado de divergencia genética.
- 3.- Realizar estudios que relacionen aspectos genéticos con las características de la perla
- 4.- No se recomienda la transferencia de postlarvas entre atolones, si se desean mantener las características genéticas de las poblaciones silvestres.
- 5.- Dada la gran divergencia genética de las ostras perleras en las islas Marquesas, hacer un estudio para evaluar su posible causa.

## X. LITERATURA CITADA

- Andrews, J.C. y G.L. Pickard. 1990. The physical oceanography of coral-reef systems. En: Z. Dubinsky (ed.). Ecosystems of the World. Vol. 25, Coral Reefs. Elsevier, Amsterdam, 11-45 p.
- Appio, K.T. y L.I. Weber. 2007. Temporal genetic differentiation in cultured and natural beds of the brown mussel *Perna perna* (Mytilidae). Genet. Mol. Res. 6(1): 127-136 p.
- Arnaud-Haond, S., F. Bonhomme y F. Blanc. 2003a. Large discrepancies in differentiation of allozymes, nuclear and mitochondrial DNA loci in recently founded Pacific populations of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. J. Evol. Biol. 16: 388-398 p.
- Arnaud-Haond, S., P. Boudry, D. Saulnier, T. Seaman, V. Vonau, F. Bonhomme y E. Goyard. 2002. New anonymous nuclear DNA markers for the pearl oyster *Pinctada margaritifera* and other *Pinctada* species. Mol. Ecol. Notes. 2: 220-222 p.
- Arnaud-Haond, S., V. Vonau, F. Bonhomme, P. Boudry, F. Blanc, J. Prou, T. Seaman y E. Goyard. 2004. Spatio-temporal variation in the genetic composition of wild populations of pearl oyster (*Pinctada margaritifera cumingii*) in French Polynesia following 10 years of juvenile translocation. Mol. Ecol. 13: 2001–2007 p.
- Arnaud-Haond, S., V. Vonau, F. Bonhomme, P. Boudry, J. Prou, T. Seaman, M. Veyret y E. Goyard. 2003b. Spat collection of the pearl oyster (*Pinctada margaritifera cumingii*) in French Polynesia: an evaluation of the potential impact on genetic variability of wild and farmed populations after 20 years of commercial exploitation. Aquaculture. 219: 181–192 p.
- Arnaud-Haond, S., V. Vonau, C. Rouxel, F. Bonhomme, Jean Prou, E. Goyard y P. Boudry. 2008. Genetic structure at different spatial scales in the pearl oyster (*Pinctada margaritifera cumingii*) in French Polynesian lagoons:

- beware of sampling strategy and genetic patchiness. *Mar Biol.* 155(2): 147-157p.
- Ashley, M.V. y B.D. Dow. 1994. The use of microsatellite analysis in population biology: Background, methods and potential applications. En: B. Schierwater, B. Streit, G.P. Wager. y R. Deisake (eds.). *Molecular ecology and evolution: Approaches and applications*. Birkhaeuser Verlag. Basel, Switzerland, 185-210p.
- Astanej, I., E. Gosling, J. Wilson y E. Powell. 2005. Genetic variability and phylogeography of the invasive zebra mussel, *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Mol. Ecol.* 14: 1655-1666 p.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. Sinauer & Associates Inc. Segunda edición. Sunderland., Massachusetts. USA. 541p.
- Balloux, F. y N. Lugin Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.* 11: 155-165 p.
- Bard, E.B., M.A., Hamelin, M., Arnold, L., Montaggioni, G., Cabioch, G.Faure, y F, Rougerie. 1996. Deglacial sea-level record from Tahiti corals and the timing of global meltwater discharge. *Nature* 382: 241-244
- Beaumont, A.R. y E.R. Zouros. 1991. Genetics of scallops. En: S.E. Shumway (ed.). *Scallops: biology, ecology and aquaculture*. Elsevier Publishers, Amsterdam, 585-617 p.
- Beaumont, A.R. 1991. Genetic studies of laboratory reared mussels, *Mytilus edulis*: heterozygote deficiencies, heterozygosity and growth. *Biol. J. Linn. Soc.* 44: 273-285 p.
- Benzie, J.A.H. 2000. The detection of spatial variation in widespread marine species: methods and bias in the analysis of population structure in the crown of thorns starfish (Echinodermata: Asteroidea). *Hydrobiologia.* 420: 1-14p.
- Benzie, J.A.H. y C. Smith Keune. 2006. Microsatellite variation in Australian and Indonesian pearl oyster (*Pinctada maxima*) populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 314: 197-211 p.

- Benzie, J.A.H. y E. Ballment. 1994. Genetic differences among black-lipped pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) populations in the western Pacific. *Aquaculture*. 127: 145–156 p.
- Benzie, J.A.H. 1999. Genetic Structure of Coral Reef Organisms: Ghosts of Dispersal Past. *Amer. Zool.* 39: 131-145 p.
- Berger, M. 1983. Population genetics of marine gastropods and bivalves. En: W.D.D. Russel Hunter (ed.). *The Mollusca*, Vol 6. Academic Press, New York, 563-595 p.
- Bierne, N., S. Launey, Y. Naciri Graven y F. Bonhomme. 1998. Early effects of inbreeding as revealed by microsatellite analyses on *Ostrea edulis* Larvae. *Genetics*. 148: 1893-1906 p.
- Bierne, N., S.A. Lehnert, E. Bedier. 2000. Screening for intron- length polymorphisms in Penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC) PCR. *Mol. Ecol.* 9: 233-235 p.
- Blanc, F. 1983. Estimation du polymorphisme enzymatique dans trios p populations naturelle de nacre (*Pinctada margaritifera*) en Polynesie francaise. *C.R. Acad. Sci. Paris*. 297: 199-202 p.
- Blanc, F. y P. Durand. 1989. Genetic variability in natural bivalve populations: the case study of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *La Mer*. 27: 125-126 p.
- Blanc, F., P. Durand y M. Shine Milhaud. 1985. Genetic variability in populations of black pearl oyster *Pinctada margaritifera* (Mollusque, Bivalve) de Polynésie. *Proceedings of the Fifth International. Coral Reefs Congress, Tahiti*. 4: 113-118 p.
- Bondad Reantaso, M., S. McGladdery y F. Berthe. 2007. Pearl oyster health and management. *FAO Fisheries Technical Paper*. Número 503. ROME. Italy. 122 p.
- Boudry, P., B. Collet, F. Cornette, V. Hervouet y F. Bonhomme. 2002. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*,

- Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*. 204: 283–296 p.
- Brookfield, J.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Mol Ecol*. 5:453–455 p.
- Bueno, P., A. Lovatelli y H.P.C. Shetty. 1991. Pearl oyster farming and pearl culture. Regional Sea Farming Development and Demonstration Project. Project reports. FAO Fisheries Technical Paper. Número 8. 104 p.
- Carlsson, J., C.L. Morrison y K.S. Reece. 2006. Wild and aquaculture populations of the Eastern oyster compared using microsatellites. *J. Hered.* 97(6): 595-598 p.
- Cavalli Sforza, L.L. y A.W.F. Edwards. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.* 19: 233–257 p.
- Coeroli, M., D. De Gaillande y J.P. Landret. 1984. Recent innovations in cultivation of molluscs in French Polynesia. *Aquaculture*. 39: 45-67 p.
- Chapuis, M.P. y A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24(3): 621-631 p.
- Coeroli, M. y K. Mizuno. 1985. Study of different factors having an influence upon the pearl production of the black lip pearl oyster. *Proc. 5th Int. Coral Reef Symp, Tahiti*, 5: 551-556 p.
- Comps, M., Ch. Herbaut y A. Fougerouse. 1999. Virus-like particles in pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 19(2): 85 p.
- Comps, M., Ch. Herbaut, A. Fougerouse y F. Laporte. 2001. Progress in pathological characterization of Syndrome 85 in the black-lip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquat. Living Resour.* 14:195–202 p.
- Côrte Real H.B.S.M. 1992. Taxonomy and population genetics of exploited species of *Patella* in the Azores, Madeira and Canaries. Tesis de Doctorado, Liverpool University. Port Erin, Isle of Man.
- Côrte Real, H.B.S.M., S.J. Hawkins y J.P. Torpe. 1996. Population differentiation and taxonomic status of the exploited limpet *Patella candei* in the

- Macaronesian islands (Azores, Madeira, Canaries). *Mar. Biol.* 125: 141-152.
- Crawford, A.M. y R.P. Cuthbertson. 1996. Mutations in sheep microsatellites. *Genome Res.* 6: 876– 879 p.
- David, P., P. Berthou, P. Noel y P. Jarne. 1997a. Patchy recruitment patterns in marine invertebrates: a spatial test of the density-dependent hypothesis in the bivalve *Spisula ovalis*. *Oecologia.* 111: 331–340 p.
- David, P., M.A. Perdieu, A.F. Pernod y P. Jarne. 1997b. Fine-grained spatial and temporal population genetic structure in the marine bivalve *Spisula ovalis*. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 51(4): 1318–1322 p.
- Del Río Portilla, M.A. y A.R. Beaumont. 2001. Heterozygote deficiencies and genotype-dependent spawning time in *Mytilus edulis*. *J. Shell. Res.* 20: 1051–1057 p.
- Dempster, A.P., N.M. Laird y D.B. Rubin. 1977. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society B: Statistical Methodology.* 39: 1–38 p.
- Doroudi, M.S. y P.C. Southgate. 2003. Embryonic and larval development of *Pinctada margaritifera* (Linnaeus, 1758). *Molluscan Research.* 23: 101-107 p.
- Doroudi, M.S., P.C. Southgate y J.S. Lucas. 2003. Variation in clearance and ingestion rates by larvae of the black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) feeding on various microalgae. *Aquac. Nut.* 9: 11-16 p.
- Durand, P. y F. Blanc. 1986. Divergence geneique chez un bivalve marin tropical: *Pinctada margaritifera*. *Coll. Nat. CNRS. Biologie des populations.* 323–330 p.
- Durand, P. y F. Blanc. 1989. Diversite genetique chez un bivalve marin tropical: *Pinctada margaritifera* (Linne, 1758). *Bull. Soc. Zool. France.* 113, 293–304.
- Durand, P., K. Wada y F. Blanc. 1993. Genetic variation in wild and hatchery stocks of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, from Japan. *Aquaculture.*

- 110: 27–40 p.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.* 5: 435-445 p.
- Elnaeim, A.G. 1984. Variability in growth of the mother of pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) in the Red Sea (Sudan). M.S. Thesis. Dalhousie University, 120p.
- Elphinstone, M.S., G.N. Hinten, M.J. Anderson y C.J. Nock. 2003. An inexpensive and high-throughput procedure to extract and purify total genomic DNA for population studies. *Mol. Ecol. Notes.* 3: 317-320 p.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider .2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evo. Bio. Onl.* 1: 47-50p.
- Excoffier, L. y H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Eco. Res.* 10: 564-567 p.
- Fassler, R. 1995. Farming jewels, new developments in pearl farming. *World Aquacult.* 26: 4–10 p.
- Foltz, D.W. 1986. Null alleles as a possible cause of heterozygote deficiencies in the oyster *Crassostrea virginica* and other bivalves. *Evolution.* 40: 869–870 p.
- Friedman, K.J. y J.D. Bell. 1999. Variation in abundance of blacklip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* Linne.) spat from inshore and offshore reefs in Solomon Islands. *Aquaculture.* 178: 273–291 p.
- Friedman, K.J., J.D. Bell y G. Tiroba. 1998. Availability of wild spat of the blacklip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, from “open” reef systems in Solomon Islands. *Aquaculture.* 167: 283–299 p.
- Fujio, Y., R. Yamanaka y P.J. Smith. 1983. Genetic variation in marine mollusks. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 49: 1809-1817 p.
- Gabrie, C. y B. Salvat. 1985. Generalites sur les iles de la Polynesie francaise et leurs recifs coralliens. En: B. Delesalle, R. Galzin, B. Salvat, C. La Croix,

- A.E. Wolf, N. Thiebaut y G. Poli (eds.). Proc. 5th Int. Coral Reef Symp, Tahiti, 1: 1-15 p.
- Gaffney, P.M. 1994. Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: more light? En: A.R. Beaumont (ed.). Genetics and evolution of aquatic organisms. Chapman and Hall. London: 146–153 p.
- Gaffney, P.M., T.M. Scott, R.K. Koehn y W.J. Diehl. 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam *Mulinia lateralis*. Genetics. 124: 687–699 p.
- Gaggiotti, O.E., O. Lange, K. Rassmann y C. Gliddons. 1999. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. Mol. Ecol. 8: 1513–1520 p.
- Gaines, S.D. y M.D. Bertness. 1992. Dispersal of juveniles and variable recruitment in sessile marine species. Nature. 360: 579–580 p.
- Geist, J. y R. Kuehn. 2005. Genetic diversity and differentiation of central European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) populations: implications for conservation and management. Mol Ecol. 2005. 14(2): 425-39 p.
- Gervis, M.H. y N.A. Sims. 1992. The biology and culture of pearl oysters (Bivalvia Pteriidae). ICLARM Stud. Rev. 21. 49 p.
- Goudet, J. 2001. FSTAT ver. 2.9.3: a program to estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices. Disponible en: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Guo, S. y E. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics. 48: 361-372 p.
- Hare, M.P., S.A. Karl y J.C. Avise. 1996. Anonymous nuclear DNA markers in the American oyster and their implications for the heterozygote deficiency phenomenon in marine bivalves. Mol. Biol. Evol. 13: 334–345 p.
- Hartl, D.L. y A.G. Clark. 1997. Principles of Population Genetics, 3rd edn. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachuset.
- Hedgecock, D., D.J., McGoldrick, D.T., Manahan, J., Vavra, N. Appelmans, y B.L.

- Bayne. 1996. Quantitative and molecular genetic analyses of heterosis in bivalve molluscs. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 203: 49–59 p.
- Hedgecock, D., G. Li, S. Hubert, K. Bucklin y V. Ribes. 2004. Widespread null alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 23: 379–385 p.
- Herbinger, C.M., C.A. Smith y S. Langy. 2006. Development and characterization of novel tetra- and dinucleotide microsatellite markers for the French Polynesia black-lipped pearl oyster, *Pinctada margaritifera*. *Mol Ecol Notes.* 6:107–109.
- Jiuan Jiuan, H. 2007. Reproductive cycles of the pearl oysters, *Pinctada fucata* (Gould) and *Pinctada margaritifera* (Linnaeus) (Bivalvia: Pteriidae) in southwestern Taiwan waters. *J. Mar. Sci. Technol.* 15(2): 67-75 p.
- Johnson, M.S. y R. Black. 1982. Chaotic genetic patchiness in an intertidal limpet, *Siphonaria sp.* *Mar. Biol.* 70: 157–164 p.
- Johnson, M.S. y R. Black. 1984. Pattern beneath the chaos: the effect of recruitment on genetic patchiness in an intertidal limpet. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 38:1371–1383 p.
- Johnson, M.S. y L.M Joll. 1993. Genetic subdivision of the pearl oyster *Pinctada maxima* (Jameson, 1901) (Mollusca: Pteriidae) in Northern Australia. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 44: 519–526 p.
- Johnson, M.S. y J. Wernham. 1999. Temporal variation of recruits as a basis of ephemeral genetic heterogeneity in the western rock lobster *Panulirus cygnus*. *Mar. Biol.* 135: 133–139 p.
- Kalinowski, S.T. 2009. How well do evolutionary trees describe genetic relationships between populations? *Heredity* 102: 506-513 p.
- Keenan, E., R.E. Brainard y L.V. Basch. 2006. Historical and present status of the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, at Pearl and Hermes Atoll, Northwestern Hawaiian Islands. *Atoll Res. Bul.* 543: 333–344 p.

- Kimani, E.N. y K.M. Mavuti. 2002. Abundance and Population structure of the Blacklip Pearl Oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), in Coastal Kenya. Western Indian Ocean. J. Mar. Sci. 1(2): 169–179 p.
- Ladd, H.S. 1960. Origin of the Pacific island molluscan fauna. Am. J. Sci. 285A: 137–150p.
- Lane, L., O. Oengpepa y J. Bell. 2003. Production and Growout of the Black-Lip Pearl Oyster *Pinctada margaritifera*. Aquaculture Asia. 3(1): 5-7 p.
- Launey, S. y D. Hedgecock. 2001. High Genetic Load in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Genetics. 159: 255–265 p.
- Lemer, S., E. Rochel y S. Planes. 2011. Correction method for null alleles in species with variable microsatellite flanking regions, a case study of the black-lipped pearl oyster *Pinctada margaritifera*. J Hered. 102(2): 243-6 p.
- Levitan, D.R., M.A. Sewell y F-S Chia. 1992. How distribution and abundance influence fertilization success in the sea urchin *Strongylocentrus franciscanus*. Ecology, 73, 248–254p.
- Li, G., S. Hubert, K. Bucklin, V. Ribes y D. Hedgecock. 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Mol Ecol Notes. 3: 228–232 p.
- Li, Y.C., A.B. Korol, T. Fahima, A. Beiles y E. Nevo. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. Mol. Ecol.. 11: 2453-2465 p.
- Lind, C.E., B.S. Evans, J.J. Taylor y D.R. Jerry. 2007. Population genetics of a marine bivalve, *Pinctada maxima*, throughout the Indo-Australian Archipelago shows differentiation and decreased diversity at range limits. Mol. Ecol. 16(24): 5193-203 p.
- Litt, M. y J.A. Luty. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 44: 397–401 p.
- Liu, Z.J. y J.F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture. 238: 1–37 p.

- Liu, Z.J., P. Li, A. Kocabas, Z. Ju, A. Karsi, D. Cao, y A. Patterson. 2001. Microsatellite containing genes from the channel catfish brain: evidence of trinucleotide repeat expansion in the coding region of nucleotide excision repair gene RAD23B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289: 317–324 p.
- Loret, P., S. Le Gall, Ch. Dupuy, J. Blanchot, A. Pastoureaud, B. Delesalle, X. Caisey y G. Jonquière. 2000. Heterotrophic protists as a trophic link between picocyanobacteria and the pearl oyster *Pinctada margaritifera* in the Takapoto lagoon (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). *Aquat. Microb. Ecol.* 22: 215–226 p.
- Martínez E., K. Maamaatuaiahutapu, C. Payri y A. Ganachaud. 2006. *Turbinaria ornata* invasion in the Tuamotu Archipelago, French Polynesia: ocean drift connectivity. *Coral Reef.* 26(1): 79-86p.
- Martinez E, A. Ganachaud, J. Lefevre y K. Maamaatuaiahutapu. 2009. Central South Pacific thermocline water circulation from a high-resolution ocean model validated against satellite data: Seasonal variability and El Niño 1997–1998 influence. *J. Geophys. Res.* (114) 16p.
- Metaxas. A, R.E. Scheibling, C.M. Young. 2002. Estimating fertilization success in marine benthic invertebrates: a case study with the tropical sea star *Oreaster reticulatus*. *Marine Ecology-Progress Series*, 226, 87–101p.
- Miller, K.J., B.T. Maynard y C.N. Mundy. 2009. Genetic diversity and gene flow in collapsed and healthy abalone fisheries. *Mol. Ecol.* 18: 200–211 p.
- Nasr, D.H. 1984. Feeding and growth of the pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.) in Dongonab Bay, Red Sea. *Hydrobiologia.* 110: 241-245 p.
- Nauta, M. y F. Weissing. 1996. Constrains on allelic size at microsatellite loci: Implication for genetics differentiation. *Genetics.* 143: 1021-1032 p.
- Page, R.D.M. 1996. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 357-358 p.
- Palumbi, S.R. 1992. Marine speciation on a small planet. *TREE.* 7: 114–118p.
- Palumbi, S.R. 1996. Macrospatial genetic structure and speciation in marine taxa with high dispersal abilities. En: J.D. Ferraris y S.R. Palumbi (eds.).

- Molecular zoology: Advances, strategies, and protocols; Symposium held during Annual Meeting of the American Society of Zoologists. Wiley-Liss Inc., New York, 101-117 p.
- Palumbi, S.R. y A.C. Wilson. 1990. Mitochondrial DNA diversity in the sea Urchins *Stongylocentrotus purpuratus* and *S. droebachiensis*. *Evolution*. 44(2): 403–415 p.
- Park, S.D.E. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. Tesis de doctorado. University of Dublin.
- Planes S. y C. Fauvelot. 2002. Isolation by distance and vicariance drive genetic structure of a coral reef fish in the Pacific Ocean. *Evolution*. 56: 378–399 p.
- Paulay, G. 1990. Effects of late Cenozoic sea-level fluctuations on the bivalve faunas of tropical oceanic islands. *Paleobiology* 16:401–434 p.
- Paulay, G. 1991. Late Cenozoic sea level fluctuations and the diversity and species composition of insular shallow water marine fauna. *Proc. 4th Int. Cong. Syst. Evol. Biol.* 1: 184–193 p.
- Planes, S., F. Bonhomme y R. Galzin. 1993. Genetic Structure of *Dascyllus aruanus* populations in French Polynesia. *Mar. Biol.* 117: 665–674 p.
- Pouvreau, S., C. Bacher, M. Heral, 2000. Ecophysiological model of growth and reproduction of the black pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: potential applications for pearl farming in French Polynesia. *Aquaculture* 186, 117–144 p.
- Pouvreau, S., A. Bodoy y D. Buestel. 2000c. In situ suspension feeding behaviour of the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*: combined effects of body size and weather-related seston composition. *Aquaculture*. 181(1-2): 91-113 p.
- Pouvreau, S., A. Gangnery, J. Tiapari, F. Lagarde, M. Garnier, y A. Bodoy. 2000a. Gametogenic Cycle and Reproductive Effort of the Tropical Blacklip Pearl Oyster, *Pinctada margaritifera* (Bivalvia: Pteriidae), Cultivated in Takapoto Atoll (French Polynesia). *Aquat. Living Resour.* 13(1): 37-48 p.

- Pouvreau, S., G. Jonquière y D. Buestel. 1999. Filtration by the pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, under conditions of low seston load and small particles size in a tropical lagoon habitat. *Aquaculture*. 176: 295-314 p.
- Pouvreau, S. y V. Prasilo. 2001. Growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, at nine culture sites of French Polynesia: synthesis of several sampling designs conducted between 1994 and 1999. *Aquat. Living Resour.* 14: 155–163 p.
- Pouvreau, S., J. Tiapari, A. Gangnery, F. Lagarde, M. Garnier, H. Teissier, G. Haumani, D. Buestel y A. Bodoy. 2000b. Growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, in suspended culture under hydrobiological conditions of Takapoto lagoon (French Polynesia). *Aquaculture*. 184(1-2): 133-154 p.
- Reece, K.S., W.L. Ribeiro, P.M. Gaffney, R.B. Carnegie y S.K. Allen. 2004. Microsatellite marker development and analysis in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*): confirmation of null alleles and non-Mendelian segregation ratios. *J Hered* 95:346–352 p.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43: 223-225p.
- Robert, S., S. Pouvreau, D. Buestel, P. Gouletquer, A. Bennett, X. Caisey, H. Teissier, G. Jonquière, J. Tiapari y G. Haumani. 1998. Energy budget of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*: in situ respiration rate assessment and allometry relationship with dry meat weight oyster. *Aquaculture Europe*. 98: 7-10 p.
- Rose, C.G, K.T. Paynter y M.P. Hare. 2006. Isolation by distance in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, in Chesapeake Bay. *J. Hered.* 97(2): 158-170 p.
- Rougerie, F. y B. Wauthy. 1986. L'océan qui nous entoure. Pp. 73–88 in C. Gleizal, ed. *Encyclopédie de la Polynésie*. Vol. 1, Les îles océaniques. Multipress, Papeete, Polynésie française.
- Roughgarden, J., S. Gaines y H. Possingham. 1988. Recruitment dynamics in complex life cycles. *Science*. 241: 1460–1466 p.

- Saitou, N. y M. Nei. 1987. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 4(4): 406-425 p.
- Sims, N.A. 1990. The black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.), in the Cook Islands. Tesis de Maestría. University of New South Wales.
- Sims, N.A. 1992. Abundance and distribution of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.), in the Cook Islands, South Pacific. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 43:1409-1421 p.
- Sims, N.A. 1993a. Pearl oysters. En: A. Wright y L. Hill (eds.). *Nearshore Marine Resources of the South Pacific*. Institute of Pacific Studies, Suva, Forum Fisheries Agency. Honiara and International Centre for Ocean Development. 409–430 p.
- Sims, N.A., 1993b. Size, age and growth of the black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.) (Bivalvia, Pteriidae). *J. Shellfish Res.* 12(2): 223-228 p.
- Sims, N.A., 1994. Growth of wild and cultured black-lip pearl oysters, *Pinctada margaritifera* (L.) (Bivalvia, Pteriidae). *Aquaculture*. 122: 181-191 p.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 139: 457–462 p.
- Smith, P.J., 1987. Homozygote excess in the flounder, *Rhombosolea plebeia*, produced by assortative mating. *Mar. Biol.* 95, 489–492 p.
- Southgate, P.C., E. Strack, A. Hart, K.T. Wada, M. Monteforte, M. Cariño, S. Langy, C. Lo, H. Acosta-Salmón y A. Wang. 2008. Exploitation and Culture of Major Commercial Species. En: P. Southgate y J. Lucas (eds.). *Pearl Oyster*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 333- 355 p.
- Southgate, P., A.C. Beer, P.F. Duncan y R. Tamburri. 1998. Assessment of the nutritional value of three species of tropical microalgae, dried *Tetraselmis* and a yeast-based diet for larvae of the blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Aquaculture*. 162: 247–257 p.
- Takezaki, N. y M. Nei. 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*. 144: 389-399 p.

- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463–6471 p.
- Thielley, M., M. Weppe y C. Herbaut. 1993. Ultrastructural Study of Gametogenesis in the French Polynesian Black Pearl Oyster, *Pinctada margaritifera* (Mollusca, Bivalvia). I-Spermatogenesis. *J. Shellfish Res.* 12: 41-47 p.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills y P. Shipley. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes.* 4: 535–538.
- Vermeij, G. 1987. The dispersal barrier in the tropical Pacific: implications for molluscan speciation and extinction. *Evol Int J Org Evol* 41:1046–1058 p.
- Wada, K.T., y D.R. Jerry. 2008. Population Genetics and Stock Improvement. En: P. Southgate y J. Lucas (eds.). *Pearl Oyster*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 437- 471 p.
- Wada, K.T. y I. Tëmkin. 2008. Taxonomy and Phylogeny. En: P. Southgate y J. Lucas (eds.). *Pearl Oyster*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 37-75 p.
- Wang, J. 2004. Sibship reconstruction from genetic data with typing errors. *Genetics.* 166: 1963-1979 p.
- Watts, R.J., M.S. Johnson y R. Black. 1990. Effects of recruitment on genetic patchiness in the urchin *Echinometra mathaei* in Western Australia. *Mar. Biol.* 105: 145–151 p.
- Weber, J.L. y C. Wong. 1993. Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.* 2: 1123–1128 p.
- Weber, L.I. y S.J. Hawkins. 2006. Allozymic differentiation among geographically distant populations of *Patella vulgata* (Mollusca, Patellogastropoda). *Hydrobiologia.* 553: 267-275.
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38: 1358-1370 p.
- Wells, S.M., 1988. Coral reefs of the world, Vol. 3. Central and Western Pacific. United Nations Environment ProgrammerInternational Union for

Conservation of Nature and Natural Resources, Gland, Switzerland.

- Woodroffe, C.D., D.R. Stoddart, T. Spencer, T.P. Scoffin y A.W. Tudhope. 1990. Holocene emergence in the Cook Islands, South Pacific. *Coral Reefs* 9: 31–39 p.
- Wright, J.M. 1993. DNA fingerprinting of fishes. En: P.W. Hochachka y T. Mommsen (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Elsevier, Amsterdam, 2: 57-91 p.
- Yukihira, H., D.W. Klumpp y J.S. Lucas. 1999. Feeding adaptations of the pearl oysters *Pinctada margaritifera* and *P. maxima* to variations in natural particulates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 182:161-173 p.
- Zhan, A., J. Hu, X. Hu, Z. Zhou, M. Hui, S. Wang, W. Peng, M. Wang y Z. Bao. 2009. Fine-scale population genetic structure of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*): do local marine currents drive geographical differentiation? *Mar. Biotechnol.* 11(2): 223-35 p.
- Zouros, E. y D.W. Foltz. 1984. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve mollusks. *Malacología.* 25: 583–591 p.
- Zouros, E. y G.H. Pogson. 1994. Heterozygosity, heterosis and adaptation. En: A.R. Beaumont (ed.). *Genetics and evolution of aquatic organisms*. Chapman & Hall, London, 135–146 p.

## XI. ANEXOS

### ANEXO 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN MEDIANTE GLASSMILK

Soluciones requeridas:

- 1) Glassmilk
- 2) Solución amortiguadora de unión
- 3) Solución amortiguadora de digestión
- 4) Solución amortiguadora de lavado
- 5) TE

Digestión del tejido :

- 1) 1) Agregar 150µl de solución amortiguadora de digestión, 2 µl de Proteinasa K (20mg/mL) y aproximadamente de 0.5-10.0mg de tejido.
- 2) Dejar digerir durante toda la noche a 60°C con agitación a ~300rpm

Extracción:

- 3) Colocar una placa de filtro nueva (dos capas 3µm/0.2µm Pall#5053) sobre una caja de puntas abiertas de manera que los filtros no toquen ninguna superficie.
- 4) Agregar 150µl de solución amortiguadora de unión (NaI), 50µl de tejido digerido y 50µL de la solución Glassmilk (resuspender la solución glassmilk mediante vortex) en la placa de filtro.
- 5) Dar ligeros golpes a la placa para Mezclar
- 6) Colocar la placa de filtro en el sistema de vacío y aplicar vacío.
- 7) Agregar nuevamente 150µl de solución amortiguadora de unión, 50µL de tejido digerido en la placa de filtro y aplicar vacío. Repetir una vez mas este paso.
- 8) Una vez que los pozos de la placa de filtro han quedado vacíos (~30s) añadir 200 µL de solución amortiguadora de lavado (no se necesita apagar la cámara de vacío).
- 9) Repetir el paso anterior y aplicar vacío máximo durante 1min.

- 10) Apagar la cámara de vacío y retirar la placa. Cuidadosamente retirar las gotas de la parte inferior de la placa de filtro con una toalla de papel limpia.
- 11) Colocar nuevamente la placa de filtro en la cámara de vacío y aplicar vacío máximo por un mínimo de 10min (no más de 20min). Es importante eliminar cualquier remanente de solución amortiguadora de lavado cuidando de no perder el ADN por exceso de secado.
- 12) Retirar los residuos de la cámara de vacío y cuidadosamente colocar una placa de recolección
- 13) Agregar 100  $\mu$ L de TE (10mM Tris HCL, 0.1mM EDTA) a 65°C e incubar por 5 min.
- 14) Finalmente aplicar suave vacío por aproximadamente 1-2min para colectar el ADN en solución.

Para preparar las soluciones requeridas

#### Glassmilk

- 1) Preparar por suspensión 10g de sílice gel 60 (~ 15-40 $\mu$ m, Merck, Alemania) en 200 ml de ácido nítrico 5M (agregar el agua primero y luego HNO<sub>3</sub>)
- 2) Calentar cerca del punto de ebullición en la campana extractora de humos (~ 10-15 min, a alta temperatura)
- 3) Dejar enfriar por 30 minutos, posteriormente desechar el sobrenadante
- 4) Resuspender en 100 ml ddH<sub>2</sub>O, dejar reposar 10min, desechar el sobrenadante
- 5) Repetir 3 veces el paso anterior.
- 6) Añadir 100 ml de buffer ddH<sub>2</sub>O (pH 7) con 1M Tris (pH 8), dejar reposar por 10 minutos y desechar el sobrenadante (~ 100 $\mu$ l)
- 7) Resuspender en un volumen igual de ddH<sub>2</sub>O y llevar al autoclave. Añadir más ddH<sub>2</sub>O (~ 3-4x) si se almacenará por un tiempo antes de su uso.

Solución amortiguadora de unión (NaI) (para 100g, una botella de 100 ml)

NaI: FW = 149.9 = 6M

- 1) Disolver NaI en <100 ml ddH<sub>2</sub>O
- 2) Añadir 2.4 g de sulfito de sodio
- 3) Disolver y completar el volumen de ddH<sub>2</sub>O a 111ml
- 4) Aclarar la filtración a través de w 0.45um y guardar en un frasco de color ámbar a 4 ° C

TE 100ml

- 1) TrisHCl 2M(pH 8), se requieren 0,01 M = 200x dilución

$$\frac{100 \text{ ml}}{200x} = 0.5 \text{ ml}$$

- 2) 0,5 M EDTA, requieren 0,01 mm = 0.0001M = 5000 veces dilución

$$\frac{100 \text{ ml}}{5000X} = 0.02 \text{ ml} \quad \text{ó} \quad \frac{250 \text{ ml}}{5000X} = 0.05 \text{ ml}$$

- 3) ddH<sub>2</sub>O = 99.48ml para aforar.

Solución amortiguadora de lavado: 250ml

- 1) 90-100% Ethanol, require 50%, 2x dilution

$$\frac{250 \text{ ml}}{2x} = 125 \text{ ml}$$

- 2) 5M NaCl (pH7.4), require 0.05M = 100x dilution

$$\frac{250 \text{ ml}}{100x} = 2.5 \text{ ml}$$

- 3) 1M TrisHCl (pH 8), require 0.01M = 100x dilution

$$\frac{250 \text{ ml}}{100x} = 2.5 \text{ ml}$$

- 4) 0.5 M EDTA, require 0.0005M = 1000x dilution

$$\frac{250 \text{ ml}}{1000x} = 0.25 \text{ ml}$$

- 5) ddH<sub>2</sub>O = 119.75ml para aforar

Solución amortiguadora de digestion: 100ml

- 1) 5M NaCl, requiere 0.1m =50x dilución

$$\frac{100\text{ml}}{50x} = 2\text{ml} \quad \text{ó} \quad \frac{200\text{ml}}{50} = 4\text{ml}$$

- 2) 2M TrisHCl (pH 8), requiere 0.05M = 40x dilución

1M TrisHCl (pH8) → 20x dilución

$$\frac{100\text{ml}}{40x} = 2.5\text{ml} \quad \text{ó} \quad \frac{100\text{ml}}{20} = 5\text{ml} \quad \text{ó} \quad \frac{200\text{ml}}{20} = 10\text{ml}$$

- 3) 0.5 M EDTA, requiere 0.01M = 50x dilución

$$\frac{100\text{ml}}{50x} = 2\text{ml} \quad \text{ó} \quad \frac{200\text{ml}}{50} = 4\text{ml}$$

- 4) 20% SDS, requiere 0.5% SDS = 40x dilución

$$\frac{100\text{ml}}{40x} = 2.5\text{ml} \quad \text{ó} \quad \frac{200\text{ml}}{40} = 5\text{ml}$$

- 5) ddH<sub>2</sub>O = 91ml (para aforar)

ó 88.5ml (1M Tris HCl) 177ml

## ANEXO 2

### FRECUENCIAS ALELICAS POR POBLACIÓN Y LOCUS

Pmarg2	TA×	AR-1	169	RA-1	RA-2 × HR	MRT-1	MRT-2	KAU	TKP-1	TKP-2	GB +	NH	HO	MO-1 +	MO-2	SCI ×	SOLO-1	SOLO-2		
151										0.98										
167										0.98								2.50		
169	1.92	5.00	5.88	7.69		7.14	5.56	5.26	11.11	4.90				3.13	1.43					
171					4.00						2.63							2.50		
173	3.85									0.98	5.26									
175			2.94	12.90	2.00				1.39			1.16	1.61	15.63		1.47	3.75	1.25		
177	5.77	5.00		7.69	3.23	6.00	14.29	3.70		2.78	3.92	5.26	1.16		6.25					
179		5.00				4.00		1.85		2.78		5.26	4.65	3.23		1.43	1.47	1.25		
181			8.82	3.85	4.84	4.00		3.70	10.53	5.56	11.76	5.26		1.61		2.86	2.94	3.75	5.00	
183	9.62	15.00	11.76	15.38	11.29	8.00		9.26	7.89	6.94	4.90		5.81	1.61	9.38		7.14	2.94	7.50	7.50
185	13.46	25.00	26.47	7.69	4.84	14.00	42.86	3.70	10.53	9.72	6.86	13.16	6.98	8.06	15.63	8.57	11.76	7.50	11.25	
187	3.85	10.00		3.85					5.26	5.56	8.82	7.89	1.16	8.06	12.50	2.86	2.94	7.50	6.25	
189	3.85			3.85	3.23	8.00				8.33	4.90	10.53	8.14	9.68	9.38	1.43	2.94		10.00	
191			8.82	3.85	8.06	8.00	7.14	3.70	2.63	4.17	2.94		11.63	3.23	3.13	4.29	8.82	5.00	6.25	
193	13.46		5.88	7.69	3.23	8.00	7.14	12.96	2.63	2.78	9.80		8.14	6.45		12.86	8.82	15.00	6.25	
195	3.85		5.88	7.69	8.06	8.00	7.14	5.56	7.89	5.56	4.90	2.63	9.30	9.68	9.38	10.00	5.88	5.00	7.50	
197				4.84	2.00			3.70		2.78	1.96	7.89	5.81	9.68		1.43	5.88	5.00	2.50	
199	5.77	5.00	8.82	15.38	9.68	6.00		18.52	10.53	15.28	6.86	18.42	9.30	14.52	3.13	8.57	1.47	6.25	10.00	
200										0.98										
201	7.69	5.00			4.84			7.41	5.26	5.56	8.82	2.63	4.65	1.61		7.14	11.76	10.00	8.75	
203	11.54		2.94		3.23			1.85	5.26	1.39	3.92		3.49	3.23	6.25	2.86	4.41	1.25		
205			5.88		3.23	2.00	7.14	9.26	5.26	2.78	1.96	5.26	5.81	3.23		2.86	5.88	3.75	3.75	
207		10.00							10.53	2.78	1.96		5.81	6.45	3.13	7.14	5.88	1.25	1.25	
209	5.77			3.85								2.63	2.33	1.61		4.29	2.94	5.00	2.50	
211								1.85			0.98		1.16	1.61		2.86	2.94	3.75		
213	3.85		2.94		3.23	4.00	7.14	1.85			1.96		2.33			5.71	4.41	1.25	2.50	
215	3.85	10.00				2.00			5.26	2.78							1.47			
217					3.23	2.00		1.85						3.23					1.25	
219				3.85		2.00					0.98			1.61		1.43	1.47	2.50		
221	1.92	5.00			4.84	4.00		1.85	5.26			1.16			1.43					
223								1.85			0.98						1.47			
225					1.61						1.96								1.25	
227																			1.25	
233																			2.50	
239						2.00														
241			2.94	3.85																
245												2.63			3.13					
251				3.85	1.61															
255												2.63								



## Continuación

Pmarg11	TA*	AR-1	168	RA-1	RA-2 × HR	MRT-1	MRT-2	KAU	TKP-1	TKP-2	GB +	NH	HO	MO-1 +	MO-2	SCI ×	SOLO-1	SOLO-2	
164					3.57			2.63		1.00					2.50			5.36	
166				11.11				2.63	1.39		4.76						2.78		
168					3.70	3.57									1.25				
170																			
172		11.11	3.13		5.56	5.36			1.39		2.38								
173			3.13								2.38	3.75		3.33	1.25	1.32	4.17		
174		5.56			3.70			2.63		5.00				3.33	2.50	2.63	1.39		
175							1.79		2.78			1.25							
176			3.13	5.56	1.85	8.93	13.64	10.71	5.56	6.00	2.38	3.75	8.33	3.33	5.00	2.63	4.17	5.36	
177										2.00									
178	9.62	11.11			11.11	3.57		5.26	6.94	8.00	4.76	6.25	1.67		1.25	5.26	1.39	3.57	
179	9.62					5.36		5.26	1.39	2.00		10.00				2.63	1.39		
180	13.46	5.56	9.38	16.67	11.11	12.50	36.36	7.14	5.26	11.11	3.00	11.90	6.25	13.33	23.33	8.75	6.58	4.17	3.57
182	3.85	11.11	3.13	11.11	5.56			5.36	7.89	5.56	2.00		3.75	3.33		6.25		11.11	1.79
183						1.79													
184	3.85	5.56		5.56		5.36		12.50	7.89	2.78	3.00	9.52	1.25		3.75	5.26	2.78	8.93	
185																			3.57
186	5.77		3.13	5.56		3.57	4.55	1.79	7.89	2.78	12.00	2.38	2.50		12.50	6.58	5.56	8.93	
188	5.77		18.75		1.85	3.57	4.55	8.93	7.89		3.00	10.00		3.33	2.50	3.95	6.94	3.57	
190	3.85				3.70			7.89	8.33	5.00	2.38			3.33	2.50		2.78	3.57	
191							1.79		2.78		4.76	1.25					2.63		
192	3.85		15.63	16.67	7.41	7.14	9.09	8.93	2.63	4.17	1.00	7.14	2.50	3.33	20.00	15.00	11.84	1.39	5.36
194	1.92					10.71					3.00	2.38		3.33		1.25		2.78	5.36
195													1.67						
196	1.92		6.25	5.56	1.85	8.93		1.79	8.33	7.00	9.52	3.75	3.33				2.63	8.33	10.71
198	1.92			11.11						3.00	2.38		1.67						3.57
200	1.92		12.50		1.85			5.36		1.39	6.00	2.38	3.75	3.33	3.33	2.50	1.32	5.56	1.79
202											1.00	1.25	1.67						1.79
204	1.92		3.13		7.41	3.57		3.57	2.63				10.00				1.32	5.56	
206	1.92				3.70	1.79					4.00		3.75	1.67		1.25		1.39	
208	1.92	11.11	6.25			1.79	9.09	7.14	2.63	2.78	1.00	11.90	2.50	3.33	3.33	5.00	7.89		1.79
210	1.92	5.56			1.85					2.78	1.00	2.38	2.50						
212	1.92				3.70	1.79		1.79		2.78				6.67	5.00	6.58	1.39		
214		11.11			3.70						2.00		1.25				4.17	1.79	
216				11.11	3.70	1.79		3.57	5.26	5.56	1.00	2.38	8.75	5.00		1.25	11.84	2.78	5.36
218								1.79			3.00		1.67				2.78	5.36	
220			6.25		5.56	3.57	4.55	1.79	2.63	6.94	1.00	2.38	8.33	3.33			2.78	1.79	
222	1.92									4.17	3.00	2.38			5.00		1.39	3.57	
224	7.69	11.11			5.56	1.79	9.09	1.79	7.89	2.78	1.00	2.38	5.00	1.67	13.33	7.89	1.39	1.79	
226						1.79							1.25	1.67		2.50		4.17	
228														3.33				1.39	
230	1.92				1.85						3.00		1.25	6.67				1.39	
232	5.77	11.11	3.13			1.79	4.55	3.57	18.42	4.17	2.00	2.38	3.75	8.33	6.67	1.25	6.58		1.79
234	1.92		3.13										2.50			5.00	1.32		
236	3.85										1.00	2.38	2.50					1.39	
238						1.79				1.39			2.50						
240					1.85		4.55				4.00						1.32		
242															1.25				
244					1.85														
246													3.33		1.25			1.39	
252													1.67						
254												1.25							
256													1.67						











