

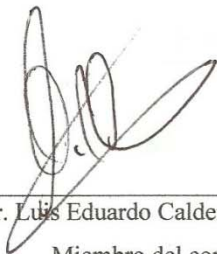
Tesis defendida por
Pablo de Jesús Suárez Moo

y aprobada por el siguiente comité



Dr. Axáyacatl Rocha Olivares

Director del Comité



Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera

Miembro del comité



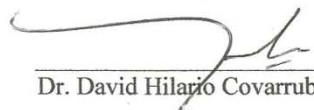
Dr. Miguel Ángel del Río Portilla

Miembro del comité



Dra. María Lucila del Carmen
Lares Reyes

Coordinador del Programa de Posgrado
en Ecología Marina



Dr. David Hilario Covarrubias Rosales

Director de la Dirección de Estudios
de Posgrado

26 de octubre del 2012

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE
EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA



PROGRAMA DE POSGRADO
EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MARINA

Variabilidad genética del género *Panopea* en el Pacífico nororiental:
implicaciones ecológicas y evolutivas

Tesis

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Presenta:

Pablo de Jesús Suárez Moo

Ensenada, Baja California, México
2012

Resumen de la tesis de Pablo de Jesús Suárez Moo, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS en ECOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California. Octubre 2012.

Variabilidad genética del género *Panopea* en el Pacífico nororiental: implicaciones ecológicas y evolutivas

Resumen aprobado por:



Dr. Axayacatl Rocha Olivares

El género *Panopea* representa un importante recurso pesquero a lo largo del Pacífico nororiental, con un creciente potencial comercial para el caso de México. Esto genera la necesidad de evaluar el estado biológico y genético de sus poblaciones, para proveer las bases de un manejo y conservación del recurso apropiados. Ante esto, en el presente estudio se analizó la diversidad y estructura genética poblacional de *Panopea generosa* en cuatro localidades del Pacífico nororiental: Alden Bank, Washington, EUA; Islas Coronado, San Quintín y Santa Rosalita, Baja California, México, mediante la utilización de información mitocondrial y nuclear. En el análisis de la diversidad genética, para Citocromo Oxidasa I (COI) y Citocromo Oxidasa III (COIII) encontramos valores moderados de diversidad haplotípica ($h_{COI}=0.66$ y $h_{COIII}=0.56$) y valores bajos de diversidad nucleotídica ($\pi_{COI}=0.001$ y $\pi_{COIII}=0.002$) para todas las localidades, mientras que los tres loci microsatelitales analizados presentaron valores altos de heterocigosidad ($H_e=0.95$ y $H_o=0.75$). Para ambos genes mitocondriales, la distribución de los haplotipos no mostró ningún patrón relacionado con la latitud, ni con las barreras biogeográficas propuestas para la Corriente de California. En cuanto a la estructura genética, tanto la información mitocondrial como la nuclear no permitieron rechazar la hipótesis de panmixia, (Φ_{ST} bajos, $p > 0.05$) sugiriendo homogeneidad genética a pequeña (<300 km) mediana (>500 km) y gran escala (>2000km) geográfica a lo largo del Pacífico nororiental. Esta carencia de estructura genética, la atribuimos al resultado de la combinación de las características de la historia de vida, un elevado flujo genético, y a la carencia de barreras al flujo genético de *P. generosa* a lo largo del Pacífico nororiental. Por otra parte, por medio de PCR-RFLPs de la región ITS del ADN ribosomal, así como de secuencias de COI, determinamos que *P. globosa* se encuentra habitando Bahía Magdalena (costa Pacífico de Baja California Sur, México), extendiendo el rango de distribución geográfica al exterior del Golfo de California, a esta nueva latitud (24°37' N). No encontramos estructura genética poblacional entre Bahía Magdalena y el Golfo de California ($\Phi_{ST}=0.047$ $p=0.06$), sin embargo, sugerimos que un análisis genético más robusto permitiría aclarar si existe o no divergencia genética entre Bahía Magdalena y localidades del Golfo de California, dicha divergencia no sería inesperada dado el contraste ambiental entre ambas regiones geográficas.

Palabras clave: ***Panopea generosa*, *P. globosa*, Citocromo Oxidasa I, Citocromo Oxidasa III, Microsatélites, PCR-RFLPs, diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica, Panmixia**

Abstract of the thesis presented by Pablo de Jesús Suárez Moo as a partial requirement to obtain the MASTER OF SCIENCE degree in MARINE ECOLOGY. Ensenada, Baja California, Ensenada, Baja California. October 2012.

Genetic variability in the genus *Panopea* in the Pacific northeast: ecological and evolutionary implications

Abstract approved by:



Dr. Axayacatl Rocha Olivares

The genus *Panopea* is an important natural resource along Northeast Pacific, with considerable and increased interest for commercial exploitation in Mexico. This generates the need to assess the biological and genetic status of Mexican Geoduck populations to provide a basis for their proper management and conservation. In the present study, we examined the genetic diversity and population genetic structure of *Panopea generosa* in four locations in the Northeast Pacific: Alden Bank, Washington, USA; Islas Coronado, San Quintín and Santa Rosalita, Baja California, Mexico, using mitochondrial and nuclear information. Cytochrome Oxidase I (COI) and Cytochrome Oxidase III (COIII) presented moderate levels of haplotype diversity ($h_{COI} = 0.66$ and $h_{COIII} = 0.56$) and small levels of nucleotide diversity ($\pi_{COI} = 0.001$ and $\pi_{COIII} = 0.002$) for all locations. The three analyzed microsatellite loci possessed high values of heterocigosity ($He = 0.95$ and $Ho = 0.75$). We found no phylogeographic pattern in neither of the mitochondrial genes, with respect to latitude or to biogeographic barriers proposed for the California current region. With respect to the genetic structure, mitochondrial and nuclear data failed to reject the hypothesis of panmixia, (low Φ_{ST} values, $p > 0.05$) suggesting genetic homogeneity, in small (< 300 km), moderate (> 500 km) and large (> 2000 km) geographical scales along the northeast Pacific. We suggest that this lack of genetic structure in *P. globosa* may result from a combination of extensive gene flow, life history traits, and lack of biogeographic barriers to gene flow along the northeast Pacific. On the other hand, using analyses of PCR-RFLP of the ITS ribosomal DNA region and COI sequences, we determined that *P. globosa* is inhabiting Bahia Magdalena in the Pacific coast of southern Baja California, Mexico. Our results extend the geographical range of *P. globosa* outside of their initial distributional range inside the Gulf of California, hence contradicting its status as a species endemic to the Gulf of California as previously stated. We found absence of genetic structure between Magdalena Bay and the Gulf of California ($\Phi_{ST} = 0.047$ $p = 0.06$), however, suggest that additional and more robust genetic analyses would clarify the potential genetic divergence between Bay Magdalena and Gulf of California locations, a divergence that is not unexpected given the contrasting environments between the regions.

Keywords: *Panopea generosa*, *P. globosa*, Cytochrome Oxidase I, Cytochrome Oxidase III, Microsatellites, PCR-RFLP, haplotype diversity, nucleotide diversity, panmixia

“Esta tierra es muy llana y limpia de sierras, que su costa es baja, y por eso los navíos grandes van algo apartados de la tierra, que es tierra muy caliente y el sol quema mucho, aunque no faltan aires frescos como brisa o solano, y por las tardes se siente la virazón de la mar. La naturaleza obró en esta tierra tan diferentemente en lo de los ríos y fuentes, que los ríos y las fuentes que en todo el mundo corren sobre la tierra, en ésta van y corren todos por sus meatos secretos por debajo de ella. En la tierra proveyó Dios de unas quebradas que los indios llaman cenotes, lo cuales tienen lindas aguas y son de muy buen ver. La flora es muy diversa, y entre sus animales existe una maravillosa abundancia y diversidad de aves y peces. Los indígenas se alimentan principalmente de maíz, del cual hacen diversos manjares y bebidas, que hacen pan de muchas maneras, que hacen guisados de legumbres y carne de venados, de aves monteses y domésticas, y de pescados. Los oficios de los indios eran olleros y carpinteros, había igual cirujanos, que curaban con yerbas. El oficio al que más inclinados estaban es el de mercaderes. Estos indios tienen la buena costumbre de ayudarse unos a otros en todos sus trabajos. Que los yucatanenses son muy partidos y hospitalarios porque no entra nadie en su casa a quien no den de la comida o bebida que tienen.”

Relación de las cosas de YUCATAN, Fray Diego de Landa

“Desde que era joven se me metió México en la carne, en la sangre y en los huesos; una gotita de luz insignificante, me metí dentro de la patria. Por ella, quiero seguir viviendo, para servirla con amor, con un amor inmenso, para contribuir a hacerla cada vez más justa, más libre y respetada.”

Jesus Silva Herzog

keshe banli huoló bo yeteli nogo´ bé má huoy shijóbé, ichili púksika´lé ti´an hu ki´kél maya, tu´patik ú kúchlé ma´x kun betke u su´te mayaobó

Aunque mis conocimientos y mi ropa sean de origen extranjero, en mi interior corre sangre maya, la cual espera la llegada de aquel guerrero de leyenda que nos guíe al realce de nuestra cultura

Pablolo

Dedicatoria

Al creacionista más evolutivo que conozco, mi Dios

A mis Padres Felipe y María del Rosario, por hacerme quien soy, por enseñarme a caminar, a leer, a luchar, el gusto por aprender, y sobre todo por brindarme todo el apoyo y cariño a lo largo de mi vida. Cada meta lograda va por ustedes ¡Los Amo!.

A mis Hermanos Cristina Evelyn y Felipe Armando, por todo lo vivido y lo que nos queda.

A mi hermosa y terca sobrinita “Zaira”.

A todos mis familiares Suárez y Moo, en especial a mi tío Víctor, que me ha enseñado de una manera crítica lo que se debe hacer y saber de la ciencia, demostrándome que es un camino difícil de recorrer, pero muy satisfactorio.

A todos los amigos que a lo largo de mi vida me han acompañado, salud!!!

A ti, que a pesar de todo seguimos adelante, por todo lo que nos queda y lo que nos falta, gracias Marisol

Agradecimientos:

A mi asesor, el Dr. Axayacatl Rocha Olivares por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección, de igual forma agradecer todo su apoyo y enseñanzas.

Al sínodo conformado por: Dr. Luis Eduardo Calderón Aguilera y el Dr. Miguel Ángel de Rio Portilla, por sus valiosos comentarios para el enriquecimiento del proyecto.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE) por permitir desarrollar la tesis y mi maestría en sus instalaciones.

Al CONACYT por la beca otorgada (no. 242938) para el desarrollo de mi posgrado.

Al Dr. Jonh Carlos Garza y Libby Gilbert-Horvath del NOAA Fisheries Service, Southwest Fisheries Science Center, por el apoyo en la genotipificación de los microsátélites.

Al Dr. Brent Vadopalas, de la School of Aquatic and Fishery Sciences, University of Washington por las muestras proporcionadas de Washington, además por el apoyo teórico en la estandarización de los microsátélites en *Panopea generosa*.

A la Dra. Raquel Muñiz Salazar de la UABC, por el apoyo en el manejo de programas de análisis moleculares.

Al Dr. Eduardo Sandoval Castro por el apoyo en el manejo del programa Migrate y Microchecker.

A todos los profesores del posgrado que me dieron clases, gracias por sus enseñanzas académicas y de la vida.

A todo el personal del DEP, así como a Elizabeth Farias por todo el apoyo brindado en estos 2 años de la Maestría.

A todos mis colegas y amigos del laboratorio más rifado del CICESE, obviamente el de "Ecología Molecular", por todas las experiencias científicas compartidas, y por los momentos gratos, gracias: Abigail, Ana, Andrea, Erik, Francesco, Geovana, Jorge, Mirayana, Nancy.

A todas las personas que hicieron grata mi estancia en el CICESE: los amigos del posgrado, compañeras de generación, a Miriam, Raquel, Tannia, y un especial agradecimiento a Elizabeth y a Mirayana "las esquizo" por todos los buenos ratos vividos.

CONTENIDO

	Página
Resumen en español.....	i
Resumen en inglés	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de tablas	x
1. Introducción general	1
2. Antecedentes generales.....	2
2.1. Importancia de la pesca del género <i>Panopea</i>	2
2.2. Biología de la especie	4
2.2.1 Taxonomía	4
2.2.2. Biología.....	4
2.2.3. Distribución.....	5
2.2.4. Reproducción	5
2.2.5. Ciclo de vida	6
2.2.6. Dispersión larvaria	6
2.3. Marcadores moleculares	7
2.3.1. ADN mitocondrial	8
2.3.2. Microsatélites.....	8
2.3.3 PCR-RFLPs.....	9
2.4 Estudios genéticos en el género <i>Panopea</i> en el Pacífico nororiental.....	9
3. Estructura genética poblacional de la almeja de sifón (<i>Panopea generosa</i>) en el Pacífico nororiental.....	12
3.1. Introducción	12
3.2 Justificación	13
3.3. Hipótesis	13
3.4. Objetivos.....	13
3.4.1. Objetivo general.....	13
3.4.2. Objetivos específicos	14
3.5. Materiales y métodos	14
3.5.1. Área de estudio	14
3.5.2. Trabajo de campo.....	15
3.5.3. Trabajo de laboratorio.....	15
3.5.3.1. Extracción de ADN.....	15
3.5.3. 2. Amplificación y secuenciación del ADN mitocondrial (ADNmt).....	16
3.5.3. 3. Amplificación de Microsatélites	17
3.5.4. Análisis de datos	18
3.5.4.1. Diversidad genética.....	18
3.5.4.1.1. ADN mitocondrial.....	18
3.5.4.1. 2. Microsatélites.....	18
3.5.4.2. Estructura genética poblacional	18
3.5.4.3. Flujo genético.....	19

3.5.4.4. Relaciones poblacionales y filogeografía	19
3.6. Resultados	20
3.6.1. ADN mitocondrial	20
3.6.1.1. Diversidad genética.....	20
3.6.1.2. Estructura genética poblacional	22
3.6.1.3. Flujo genético.....	23
3.6.2. Microsatélites	24
3.6.2.1. Diversidad genética.....	24
3.6.2.2. Estructura genética poblacional	25
3.6.2.3. Flujo genético.....	26
3.6.2.4. Relaciones poblacionales y filogeografía	27
3.7. Discusión.....	28
3.7.1. Diversidad genética.....	28
3.7.2. Estructura genética poblacional	32
3.7.2.1 Historia de vida	32
3.7.2.2. Pacífico Nororiental: barreras biogeográficas.....	35
3.7.2.3 Análisis de la Estructura genética poblacional en <i>P. generosa</i>	37
4. Evaluación de la diversidad genética y de la presencia de la almeja de sífon de Cortés (<i>Panopea globosa</i>) en Bahía Magdalena, BCS, México, mediante el uso de marcadores moleculares	39
4.1. Introducción	39
4.2. Justificación	40
4.3. Hipótesis	40
4.4. Objetivo general.....	41
4.4.1. Objetivos específicos	41
4.5. Materiales y métodos	41
4.5.1. Área de estudio	41
4.5.2. Colección de muestras	42
4.5.3. Extracción de ADN.....	43
4.5.4. PCR-RFLP	43
4.5.5. ADN mitocondrial	43
4.5.5.1. Análisis de datos	44
4.6. Resultados.....	45
4.6.1. PCR-RFLP	45
4.6.2. Citocromo Oxidasa I.....	45
4.6.2.1. Diversidad genética.....	46
4.6.2.2. Estructura genética poblacional	47
4.7 Discusión.....	48
5. Discusión general.....	51
6.1. Perspectivas para el manejo.....	52
7. Referencias bibliográficas.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figuras		Pagina
1	Captura comercial del género <i>Panopea</i> en el Pacífico nororiental. Desembarco de <i>Panopea generosa</i> en Canadá (Columbia Británica) y Estados Unidos de America (Washington); <i>P. generosa</i> y <i>P. globosa</i> en México. Tomado de Aragon Noriega et al. (2012), p. 735.	3
2	Captura mensual del género <i>Panopea</i> registrada durante el periodo 2002-2006 para el estado de Baja California, México. (Tomado del Diario Oficial de la Federación, 23 de marzo 2012, p.28)	4
3	Anatomía externa de <i>Panopea generosa</i> (tomado de Bradbury et al. 2000, p.27)	5
4	Estudios de estructura genética poblacional en bivalvos	8
5	Localidades muestreadas en el Pacífico nororiental (puntos negros). Las flechas rojas indican las barreras biogeográficas: Cabo Mendocino (CM) Punta Concepción (PC) Punta Eugenia (PE) Bahía Magdalena (BM). Cabo San Lucas (CSL) y los sitios limitantes de las regiones de la SCC: Isla Vancouver (IVa) Cabo Blanco (CB) Punta Concepción (PC) Punta Baja (PB) Cabo San Lucas (CSL).	14
6	Formula de Wright (1969)	19
7	Frecuencia de haplotipos del gen mitocondrial COI encontrados en <i>P. generosa</i> para cada localidad. Cada haplotipo es representado por un color y los haplotipos privados se encuentran sin color. La flecha azul representa la Corriente de California.	20
8	Frecuencia de haplotipos del gen mitocondrial COIII encontrados en <i>P. generosa</i> para cada localidad. Cada haplotipo es representado por un color y los haplotipos privados se encuentran sin color. La flecha azul representa la Corriente de California.	21
9	Árbol de Neighbor-joining basado en la distancia de Cavalli-Sforza y Edwards. Los números en los nodos indican el valor del bootstrap no paramétrico (3000 replicas).	27
10	Relación entre el F_{ST} (o su análogo Φ_{ST}) y la duración larval en el medio pelágico (PLD en sus siglas en inglés). Cada triangulo negro representa a una especie de bivalvo, y el triangulo blanco representa 2 especies con el mismo valor de PLD. Las líneas solidas representan los valores mínimos y máximos de F_{ST} .	33

Figuras		Pagina
11	Área de estudio, mostrando Bahía Magdalena, Santa Rosalita, San Quintín, San Felipe y Puerto Peñasco.	42
12	Patrón de bandeo PCR-RFLP con la digestión enzimática <i>RsaI</i> del ADNr para individuos de <i>Panopea</i> sp. de Bahía Magdalena (carriles 3-19 y 22-27); <i>P. generosa</i> (carril 1 y 2) y <i>P. globosa</i> (carril 20 y 21) en un gel de agarosa al 2%. El carril M se refiere a un marcador estándar (escalera molecular de 50-10000 pb).	45
13	Árbol filogenético Neighbor-joining basado en distancia Kimura 2-parametros de ADNmt COI y secuencias de ADNr de almejas de sifón mexicanas. El árbol nuclear es modificado de RochaOlivares et al. (2011), p.333.	46

LISTA DE TABLAS

Tablas	Pagina	
1	Numero de muestras (n) por localidad	15
2	Secuencias de los loci microsatélitales probados en este estudio	17
3	Índices de diversidad genética encontrados en COI y COIII. Número de individuos (n) número de haplotipos (A), diversidad haplotípica (<i>h</i>) y diversidad nucleotídica (π).	22
4	Resultados del análisis de varianza molecular encontrados en las secuencias del ADN mitocondrial COI y COIII de <i>P. generosa</i> .	22
5	Valores de Φ_{ST} pareados para la región de COI (bajo la diagonal) y sus niveles de significancia (sobre la diagonal).	23
6	Valores de Φ_{ST} pareados para la región de COIII (bajo la diagonal) y sus niveles de significancia (sobre la diagonal).	23
7	Valores del flujo genético (Nm) pareados estimados a partir Φ_{ST} de para la región de COI (bajo la diagonal) y para COII (sobre la diagonal). Los valores infinitos de flujo genético (∞) corresponden a valores Φ_{ST} de cero	24
8	Diversidad genética en los tres loci microsatélites de <i>P. generosa</i> provenientes de cuatro localidades. n, tamaño de muestra; A, número promedio de alelos; RA, Riqueza Alélica; AP, número de alelos privados; Ho, heterocigosidad observada, He, heterocigosidad esperada (Nei 1987), **p<0.01.	24
9	Diversidad genética y estimación de HWE de tres loci micro satelitales de <i>P. generosa</i> de las localidades de Baja California y Washington. n, tamaño de muestra; A, número promedio de alelos; RA, Riqueza Alélica; AP, número de alelos privados; Ho, heterocigosidad observada, He, heterocigosidad esperada (Nei 1987), **p<0.01.	25
10	Resultados del análisis de varianza molecular encontrados en los tres microsatélites aplicados en <i>P. generosa</i> .	26
11	Valores de Φ_{ST} pareados para los tres loci microsatélitales (bajo la diagonal) y sus niveles de significancia (sobre la diagonal).	26

Tablas		Pagina
12	Valores del flujo genético (Nm) pareados estimados a partir Φ_{ST} de para los microsatélites. Los valores infinitos de flujo genético (∞) corresponden a valores Φ_{ST} de cero	27
13	Diversidad y estructura genética poblacional en bivalvos y otros invertebrados marinos. #P, número de poblaciones; h, diversidad haplotípica; π , diversidad nucleotídica; H_e , heterocigosidad esperada; H_o , Heterocigosidad observada, PLD, Duración larval en medio pelágico; F_{ST} , índice de fijación; COI, Citocromo Oxidasa I; COIII, Citocromo Oxidasa III; M, Microsatélites; sncDNA, Marcadores nucleares de una sola copia.	31
14	Índices de diversidad genética encontrados en COI para <i>P. globosa</i> . n, número de individuos; A, número de haplotipos; h, diversidad haplotípica; π , diversidad nucleotídica.	46
15	Valores de Φ_{ST} pareados para la región de COI (bajo la diagonal) y sus niveles de significancia (sobre la diagonal).	47

1. Introducción general

El género *Panopea* está conformado por almejas que son reconocidas por ser extremadamente longevas, teniendo el registro de 148 años de vida para un individuo de *P. generosa* (Bureau et al. 2002). Estas almejas de sifón poseen un alto valor comercial en los lugares donde se distribuyen: *P. zelandica* en nueva Zelanda; *P. japonica* en las aguas costeras de Corea, China y Japón (Bernard et al. 1993); *P. abbreviata* en el norte de la Patagonia; y *P. globosa* que hasta ahora ha sido considerada como endémica del Golfo de California (GC). Sin embargo, evidencia reciente ha sugerido su presencia en Bahía Magdalena (Suárez Moo et al. en prensa), en la costa Occidental de Baja California Sur. Finalmente, *P. generosa* se distribuye desde Alaska hasta las costas de Baja California, México (Morris et al. 1980; Coan et al 2000). La captura comercial de las especies del género *Panopea* representa la pesquería de almejas más importante en el Pacífico nororiental, esta pesquería incluye a los países de Canadá, Estados Unidos de América (EUA) y México, en dichos países se obtienen ingresos mayores a los “30 millones de dólares anuales” (Recuperado de: <http://www.st.nmfs.noaa.gov>; Khan, 2006; SAGARPA, 2007). Sin embargo, para el caso de México, la pesca de las almejas de sifón es reciente y el registro de capturas incluye a las dos especies a *P. generosa* y *P. globosa*. Por otra parte, en Estados Unidos y Canadá actualmente se cuenta con una amplia base de investigación y planes de manejo de *P. generosa*, mientras que en México, la generación del conocimiento básico de las especies del género *Panopea* está iniciando (Rocha Olivares et al. 2010). Aunado a esto, existe una carencia de estudios genéticos en las poblaciones mexicanas, con excepción del estudio realizado por Rocha Olivares et al. (2010). Por lo anterior, es indispensable que se genere el conocimiento tanto biológico como genético de la especie explotada, que proporcione las bases para la administración de la pesquería, permitiendo mantener una relación óptima entre su explotación y su conservación. Ante esto, la genética poblacional permite conocer aspectos importantes de la dinámica poblacional de una especie, mediante análisis genéticos se pueden evaluar aspectos tales como diversidad genética, estructura poblacional, identificación taxonómica molecular, flujo genético, filogeografía y filopatria. Las diferencias genéticas entre poblaciones pueden ser cuantificadas para inferir procesos ecológicos relacionados con la conectividad entre ellas

(Hedrick, 2000). La diversidad y divergencia genéticas son potencialmente afectadas por factores tales como la selección natural, la endogamia, la deriva génica, el flujo genético, y la mutación (Hedrick, 2000). Para el caso de las especies sésiles infaunicas como las del género *Panopea*, la dispersión larval juega el papel principal en la facilitación del flujo genético y es determinante de los patrones de estructura poblacional. Actualmente los estudios de diversidad genética, de estructura genética y de identificación taxonómica molecular, se basan en el empleo de herramientas tales como marcadores moleculares basados en el ADN mitocondrial o nuclear. Entre dichos marcadores se encuentran: el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), los microsatélites, y el polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs) (Ferreira- Grattapaglia, 1998; Azofeifa, 2006; Montaña Perez et al. 2006).

En el presente estudio se evaluó la diversidad y estructura genética de *P. generosa* en localidades del Pacífico nororiental, abarcando desde Alden Bank (Washington, EUA) hasta Santa Rosalita (Baja California, México) utilizando información nuclear y mitocondrial. Por otra parte, también se evalúa la presencia y diversidad genética de *P. globosa* en Bahía Magdalena (Baja California Sur, México) presentando evidencia para extender su rango de distribución geográfica al exterior del Golfo de California a esta nueva latitud (24°37' N).

2. Antecedentes generales

2.1 Importancia de la pesca del genero *Panopea*

El género *Panopea* representa un valioso recurso pesquero en el Pacífico nororiental, siendo Canadá el país que registra las mayores capturas (principalmente en el estado de la Columbia Británica), seguido de EUA (principalmente en el estado de Washington), y recientemente en México (Figura 1). La pesquería de *P. generosa* inició en 1970 en la costa de Washington y 5 años más tarde en British Columbia (Orensanz et al 2004). La pesquería del Estado de Washington, para el periodo del 2006-2008, estuvo valorada en más de 33 millones de dólares (Recuperado de <http://www.st.nmfs.noaa.gov>). Para el caso de la Columbia Británica la pesquería de la almeja de sifón es valorada en

aproximadamente 35 millones de dólares anuales (Khan, 2006). Para el caso de México, la explotación de las almejas de sifón es reciente, con un volumen de capturas de alrededor de 1200 t/año para el periodo de 2006 al 2008 que representó un ingreso 30 millones de dólares por año (SAGARPA, 2007), estos reportes de capturas incluye tanto a *P. generosa* como a *P. globosa*.

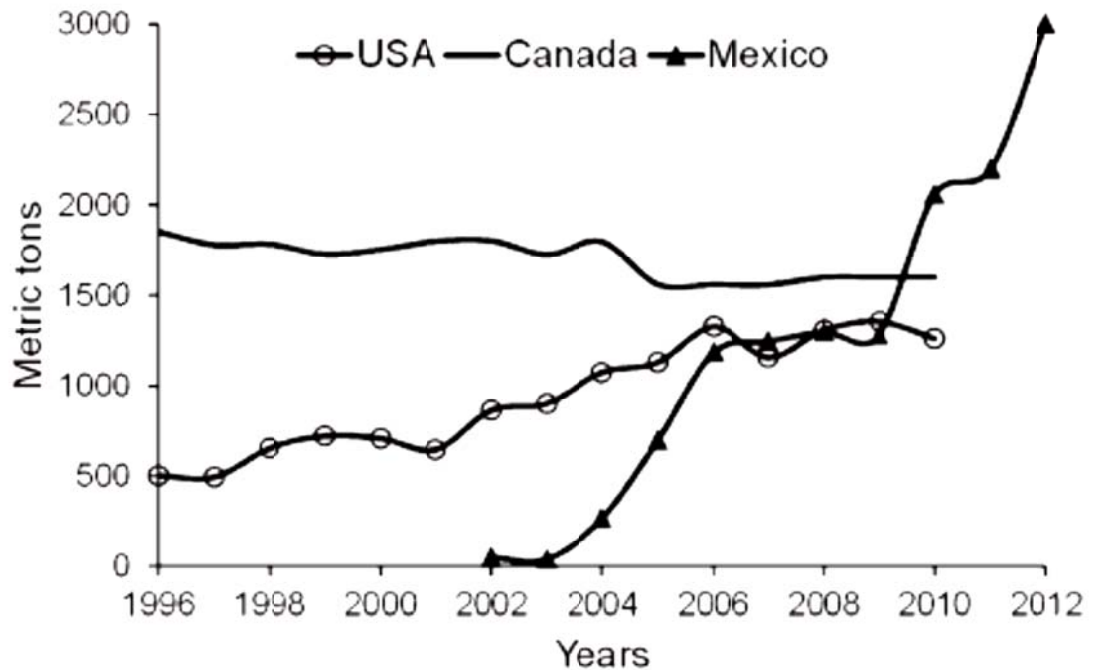


Figura 1. Captura comercial del género *Panopea* en el Pacífico Nororiental. Desembarco de *Panopea generosa* en Canadá (Columbia Británica) y Estados Unidos de America (Washington); *P. generosa* y *P. globosa* en México. Tomado de Aragón Noriega et al. (2012), p. 735.

Para el caso particular de México, la captura de las almejas de sifón inicia en el 2002 en el Golfo de California bajo el régimen de pesca de fomento y es hasta el 2004 cuando inicia como pesca comercial, habiendo en este año un incremento en el número de capturas (Figura 2). El recurso de la almeja de sifón para el estado de Baja California en el 2006 posee una captura en el Pacífico de 275,352 kg y en el litoral oriental de 1,037,586 kg de peso vivo. (Diario oficial de la federación, 23 de marzo del 2012)

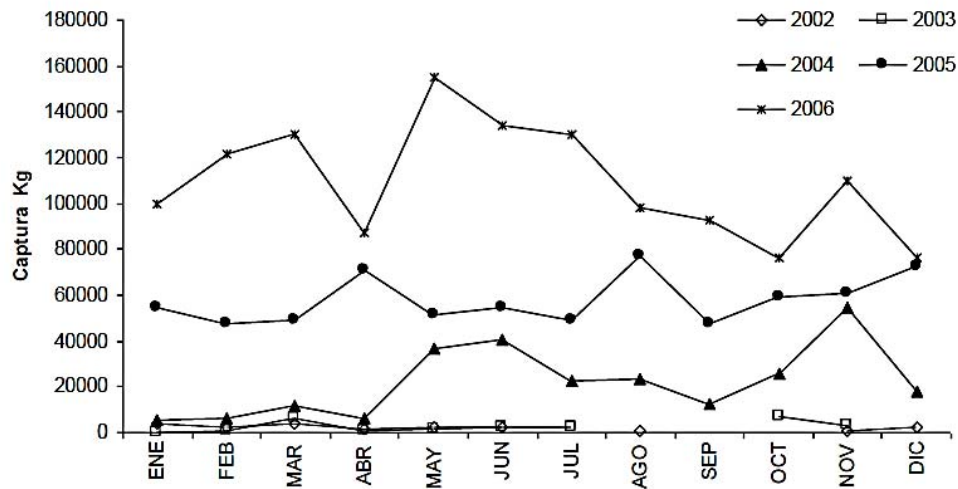


Figura 2. Captura mensual del género *Panopea* registrada durante el periodo 2002-2006 para el estado de Baja California, México. (Tomado del Diario Oficial de la Federación, 23 de marzo 2012, p.28)

2.2. Biología de las especies

2.2.1. Taxonomía (tomado de Goodwin, 1989)

Phylum	Mollusca
Clase	Bivalvia
Subclase	Heterodonta
Orden	Myoida
Superfamilia	Hiatelloidea
Familia	Hiatellidae
Genero	<i>Panopea</i>
Especie	<i>P. generosa</i> <i>P. globosa</i>

Panopea generosa es referida incorrectamente como el fósil *Panopea abruta* Conrad, 1849, en mucha literatura reciente (Vadopalas et al. 2010).

2.2.2. Biología

Las almejas de sifón son extremadamente longevas, teniendo registro de individuos de *Panopea generosa* con edades mayores de los 100 años (Campbell y Ming, 2003). El género es similar a otros bivalvos, con la diferencia de que esta especie posee un sifón

extremadamente largo que no puede ser retraído totalmente al interior de su concha (Figura 3). Los adultos y juveniles de las especies del género *Panopea* se alimentan por la filtración de partículas (fitoplancton, etc.) suspendidas en el mar.

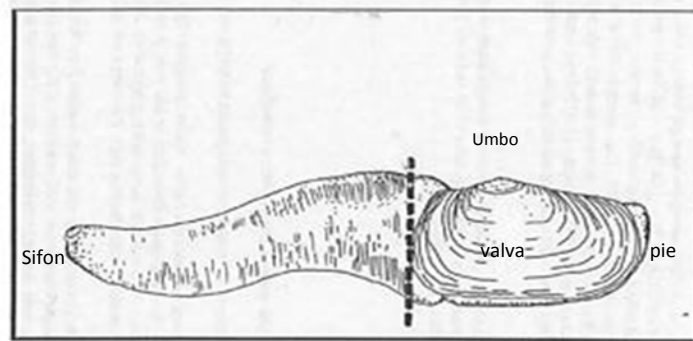


Figura 3. Anatomía externa de *Panopea generosa*. Tomado de Bradbury et al. 2000, p.27

2.2.3. Distribución

Panopea generosa se distribuye a lo largo de la costa noreste del océano Pacífico, desde Alaska hasta Baja California, (Morris et al. 1980; Coan et al 2000) mientras que *Panopea globosa* habita en el Golfo de California (Keen 1971; Hendickx et al. 2005; Arambula Pujol et al. 2008; Rocha Olivares et al. 2010); sin embargo, actualmente existe incertidumbre acerca de que si esta especie habita también fuera del Golfo de California. Estas almejas se encuentran desde la zona intermareal hasta profundidades de 110 m, habitando en sustratos de arena, fango-arena y fango-grava, teniendo una distribución en forma de “parches” con una alta abundancia relativa (Jamison et al. 1984). Se le puede encontrar enterrada hasta 1 m dentro del sedimento marino (Campbell et al. 2004).

2.2.4. Reproducción

Las almejas de sifón tienen sexos separados, aunque Campbell y Ming (2003) identificaron un organismo hermafrodita en *P. generosa*. Esta especie desova anualmente, usualmente en verano para el caso de las poblaciones de Canadá y Washington (Sloan y Robinson, 1984), mientras que para *P. globosa* se han documentando picos de desove entre enero y febrero (invierno) en la porción central del Golfo de California (Aragón-Noriega et al. 2007). Los adultos de las almejas de sifón, son altamente fecundos, sin

embargo, la edad de primera madurez reproductiva permanece incierta. Se han realizado muchos estudios para tratar de responder esta pregunta. Por ejemplo, Sloan y Robinson (1984) determinaron en *P. generosa* la edad de primera madurez a los 7 años para los machos y 8 años para las hembras, en un estudio de 404 almejas de British Columbia (Canadá). Por otra parte, no se ha observado senescencia reproductiva en la almeja de sifón. Todas las almejas de edad avanzada (>50 años) han sido examinadas y declaradas reproductivamente activas, teniendo espermatozoides y óvulos con morfología activa. Machos de la edad de 107 años y hembras de 89 años han sido documentados sin aparente reducción en su fecundidad (Sloan y Robinson, 1984).

2.2.5. Ciclo de vida

El ciclo comienza con una fertilización externa. Después de 48 horas de desarrollo embrionario, la larva trocofora se convierte en una larva velígera que se alimenta y nada activamente. La larva velígera tarda 47 días, durante los cuales se alimenta de microalgas y hay un crecimiento de 111 μm a 381 μm en la altura de la concha. Durante su metamorfosis temprana, la almeja de sifón se asienta en el fondo marino, pierde su velum, desarrolla espinas primarias en la concha y empieza arrastrarse de forma activa. Durante las siguientes 6 y 7 semanas el sifón crece y la almeja utiliza su pie para arrastrarse y para llevar la comida hacia la boca. Después de 2 a 4 semanas de estadio post-larval, la almeja llega a alcanzar los 1.5 y 2 mm de longitud y habrá cavado sobre el sustrato y empezará a alimentarse por filtración (Goodwin et al. 1979). Los juveniles son parecidos a los adultos y la longitud de las valvas incrementa aproximadamente 30 mm por año para los tres primeros años (Goodwin 1976). En México, se ha documentado que *P. generosa* tiene un rápido crecimiento durante los primeros 10 años, el cual disminuye en individuos mayores de 20- 25 años (Calderón Aguilera et al. 2010).

2.2.6. Dispersión larvaria

El estudio de la dispersión de las larvas en especies marinas es importante ya que son determinantes de la estructura genética y la dinámica poblacional de especies sésiles. De igual forma, es importante conocer la dispersión de las larvas ya que muchos de los

invertebrados marinos muestran altos niveles de fecundidad, larvas planctotróficas y con alta capacidad dispersiva, características que favorecen la panmixia genética (Bohonak, 1991). Por otra parte, algunos autores consideran que la dispersión de las larvas de invertebrados marinos es de forma pasiva y simple, es decir, que constituyen partículas a la deriva y sujetas a la acción de las corrientes. Sin embargo, la dispersión puede ser una compleja interacción entre el ambiente y el comportamiento de la larva (Shanks y Brink, 2003). Para el caso de las almejas de sifón, en la fase adulta el movimiento es restringido, ya que el pie (con el que otras almejas se mueven) es vestigial, haciéndola incapaz de tener mucho movimiento en el ambiente. La principal conectividad entre agregaciones de almejas de sifón es por vía de la dispersión larval planctónica (47 días de DLP), y por el potencial de dispersión de escala pequeña de los juveniles (Strauss et al. 2008).

2.3. Marcadores moleculares

Actualmente los estudios de diversidad genética, identificación taxonómica molecular, así como los que tratan de estructura genética poblacional, se basan en el empleo de herramientas tales como marcadores moleculares basados en el ADN. Un marcador molecular es un segmento específico de ADN (correspondiente a regiones expresadas o no del genoma) que permite diferenciar entre dos muestras de estudio (Ferreira y Grattapaglia 1998; Azofeifa 2006). Los marcadores moleculares se basan en el análisis de diferencias en la secuencia del ADN entre individuos. Las técnicas para su obtención y análisis son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998). Algunos de estos marcadores moleculares son: Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP); Amplificación Aleatoria de Fragmentos Polimórficos de ADN (RAPD); Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados (AFLP); Microsatélites y ADN mitocondrial (Ferreira y Grattapaglia 1998; Azofeifa 2006; Montaña Perez et al. 2006). Muchos de los marcadores moleculares han sido empleados para evaluar la diversidad y estructura genética poblacional de algunas especies de bivalvos (Figura 4).

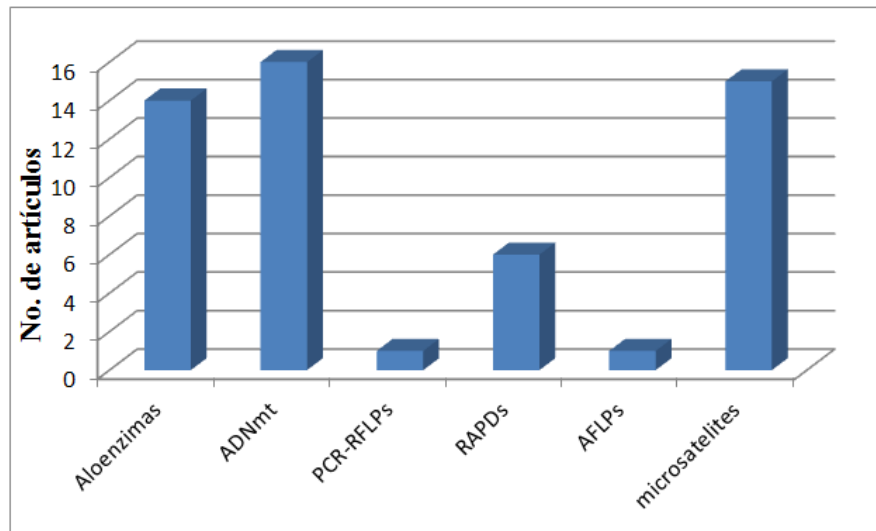


Figura 4. Estudios de estructura genética poblacional en bivalvos (Saavedra et al. 1993; Saavedra et al. 1995; Toro y Águila, 1996; Michinina y Rebordinos 1997; Chase et al 1998; Arnaud Haond et al. 2000; Arnaud Huvet, et al. 2000; Apte y Gardner, 2001; Mariani et al 2002; Launey et al. 2002; Ríos et al. 2002; Star et al. 2003; Arnaud Haond et al. 2003a; Arnaud-Haond et al. 2003b; Holms et al. 2003; Parker et al. 2003; Toro et al. 2004; Diaz Almela et al. 2004; Vandópalas et al. 2004; Casu et al. 2005; Zhang et al. 2005; Beaumont et al. 2006; Benzie y Smith-Keune 2006; Hui y Hou, 2006; Miller et al. 2006; Rose et al. 2006; Lind et al. 2007; Ort y Pogson , 2007; Yu y Li, 2007; Zardi et al. 2007; Zardi et al 2007; Cho et al. 2007; Addison et al. 2008; Riginos and Henzler, 2008; Kochzius y Nuryanto, 2008; Galindo Sánchez et al. 2008; Toro y González, 2009; Zhan et al. 2009; Joaquim et al. 2010; Gwak y Nakayama 2011; Arias et al. 2011).

2.3.1. ADN mitocondrial

El genoma mitocondrial animal o ADN mitocondrial codifica dos genes de ARN ribosomal (ARNr); de 20 a 35 genes de ARN de transferencia (ARNt); y 13 genes estructurales que codifican proteínas (involucradas en la cadena respiratoria y en la síntesis de ATP) (Castro et al. 1998). El ADN mitocondrial posee varias características que lo hacen idóneo para estudiar procesos macroevolutivos y microevolutivos como la genética poblacional, entre las que se encuentran: una alta tasa de mutación (por sustituciones), no sufre recombinación y es heredado por el linaje materno (Awise, 1994; Castro et al. 1998).

2.3.2. Microsatélites

También conocidos como secuencias simples repetidas (SSRs), los microsatélites consisten en repeticiones cortas en tándem (por ejemplo: CACACA..., ATGATGATG..., GATAGATAGATA...) y se caracterizan por ser altamente polimórficos, codominantes y

ser ubicuos en los genomas eucariotas (Vicente y Fulton, 2003; Liu, 2007). Una limitante en la utilización de microsatélites es la gran cantidad de trabajo involucrado en su desarrollo. Los microsatélites han sido aislados en diversos organismos tanto en peces, mamíferos, e invertebrados, entre otros (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Para el caso de bivalvos se han desarrollado en algunas especies, de los generos *Mytilus*, *Ostrea*, *Panopea*, *Pinctada* y *Crassostrea* (Adisson et al. 2008; Launey et al. 2002; Vadopalas et al. 2004; Lind et al. 2007; Rose et al. 2006).

2.3.3. PCR-RFLPs

Estos marcadores se obtienen por medio de una digestión enzimática con endonucleasas de restricción del producto de PCR. El polimorfismo que se detecta involucra mutaciones en los sitios de restricción, que producen variabilidad en los patrones de bandas de restricción separadas electroforéticamente, con lo que se desarrolla el análisis comparativo (Liu, 2007). Estos marcadores son comúnmente utilizados para la identificación taxonómica molecular, tal como se ha desarrollado en especies de ostras de los géneros *Crassostrea*, *Saccostrea* y *Striostrea* (Klinbunga *et al.* 2005) así como en estudios de diversidad genética, entre otras aplicaciones.

2.4. Estudios genéticos en el género *Panopea* en el Pacífico nororiental

Van Koeveringe, (1998) evaluó la estructura genética poblacional de seis localidades de la Columbia Británica, Canadá, utilizando el gen Citocromo Oxidasa III del genoma mitocondrial. El análisis de esta secuencia mostró que no existe estructura genética entre las localidades, sugiriendo que las muestras provienen de una misma población panmíctica. El análisis de varianza molecular (AMOVA) indicó que la mayor parte de la variación molecular se encontró dentro y no entre las localidades. Sin embargo, se menciona que los resultados pudieron estar afectados por el pequeño tamaño de muestra (promedio 6.5 individuos por localidad) y por la poca distancia geográfica existente entre las localidades.

Vadopalas et al. (2004) reportan valores de $F_{ST} = 0.002$ ($p < 0.001$) para 11 aloenzimas y $F_{ST} = 0.001$ ($p = 0.004$) para 7 Microsatélites, en 15 poblaciones de Washington y una en Alaska; sin embargo, los autores no detectan aislamiento por distancia, y encuentran homogeneidad genética en algunas poblaciones dentro de su área de estudio, sugiriendo que la dispersión larval está influenciada por la complejidad hidrológica y batimétrica de su área de estudio.

Miller et al. (2006) examinaron la estructura poblacional de *P. generosa* con la utilización de 8 loci microsatelitales, encontrando una estructuración geográfica significativa ($F_{ST} = 0.004$ ($p < 0.01$)) en almejas de Washington (EUA) y British Columbia (Canadá). Ellos encuentran aislamiento por distancia del tipo “stepping stone” sugiriendo que la panmixia sucede entre localidades de distancias cortas (50-300 km) mientras que en localidades que se encuentran a distancias mayores (500-1000 km) se observa una mayor estructuración.

Rocha Olivares et al. (2010) examinaron diferencias morfométricas y genéticas entre las especies *P. generosa* y *P. globosa*, como una información básica acerca de la distinción entre estas dos especies en la pesquería de la almeja de sifón en México. Los datos genéticos obtenidos del ADN ribosomal con la técnica de PCR-RFLP y secuenciación, mostraron mayor diversidad (haplotípica y nucleótida) en *P. globosa*. Por otra parte, los patrones de PCR-RFLP demostraron diferencias claras en la distinción entre las especies.

Pérez Valencia (2011) diseñó 36 pares de primers de microsatélites específicos para *P. globosa*, de los cuales sólo dos resultaron reproducibles y polimórficos. Estos fueron utilizados para evaluar la diversidad y genética poblacional en tres localidades del Golfo de California y una en la costa occidental de Baja California Sur, detectando diferencias genéticas significativas entre pares de localidades del Golfo de California (San Felipe y Puerto Peñasco) y una localidad de la costa oeste de Baja California Sur ($F_{ST} = 0.018$, $F_{ST} = 0.036$, respectivamente). Esta autora sugiere que los resultados son debidos a las diferencias ambientales entre las localidades que influyen en la dispersión larval.

Leyva Valencia (2012) analizó las relaciones filogenéticas entre *P. generosa* y *P. globosa* y otras especies del género *Panopea*: *P. japónica*, *P. abbreviata* y *P. zelandica*, utilizando el gen del ADN mitocondrial: Citocromo Oxidasa I (COI) y genes de ADN nuclear: 28 S y 18 S. El gen COI demostró valores altos de divergencia genética entre *P. globosa* y *P. generosa* (17.7%) mientras que 28S y 18S mostraron valores de 3.1% y 2.6% respectivamente.

Más recientemente, Vadopalas et al. (2012) examinaron la similitud genética temporal entre distintas cohortes de *P. generosa* en Puget Sound, Washington, EUA, con la utilización de 11 alonzimas y 7 loci microsatelitales. Contrariamente a lo previamente propuesto (Vadopalas et al. 2004), no encuentran evidencia que apoye el reclutamiento de tipo lotería como mecanismo responsable de la diferenciación genética entre poblaciones cercanas. En efecto, los autores no detectaron variación genética temporal, al no existir diferencias genéticas entre cohortes, al igual de que no detectaron un incremento significativo del parentesco, ni una reducción en el tamaño efectivo poblacional (Vadopalas et al. 2012).

3. Estructura genética poblacional de la almeja de sifón (*Panopea generosa*) en el Pacífico nororiental

3.1. Introducción

En México, *Panopea generosa*, es un importante recurso pesquero con un creciente potencial comercial (Calderón Aguilera et al. 2010). Por lo anterior, es necesario implementar programas de manejo adecuados, con el propósito de conservar el recurso. Dichos programas deben contemplar la evaluación de la diversidad genética, presencia de aislamiento reproductivo, conectividad entre poblaciones, así como la identificación de stocks. Una forma de evaluar todo lo anterior es mediante estudios de estructura genética poblacional, la cual podemos entender como aquella diferenciación genética entre grupos de una especie a lo largo de su distribución entre los que se espera encontrar diferencias en las frecuencias alélicas de cada grupo (Hedrick, 2000). Para el caso de las especies sésiles infaunicas, como es el caso de la especie *Panopea generosa*, el modo del desarrollo larval así como las corrientes oceánicas pueden ser determinantes de la estructura genética poblacional, de tal manera que éstas últimas podrían actuar tanto como barreras al flujo genético o como vehículos para la dispersión larval (Palumbi, 1994). En el Pacífico nororiental se ha sugerido la presencia de barreras biogeográficas al flujo genético (Figura 5), por ejemplo, Punta Concepción (USA) en la Corriente de California, es un lugar con muchos cambios ambientales donde se han documentado cambios genéticos en las poblaciones de algunos organismos marinos (Burton, 1998; Dawson, 2001; Kelly y Palumbi 2010). Sin embargo, en otras especies no se han encontrado dichos patrones de diferenciación, dándose poca o nula divergencia genética en la región (Debenham et al. 2000; Addison et al. 2008; Kelly y Palumbi, 2010). Por otra parte, Kelly y Palumbi (2010) proponen a Cabo Mendocino como una barrera biogeográfica, reportando cambios genéticos en cinco especies de invertebrados en esta región de California. Para el caso del Pacífico mexicano, Punta Eugenia es considerada como una barrera para la dispersión de distintas especies de peces (Terry et al. 2000; Bernardi et al. 2003). Otra región que ha sido propuesta como barrera biogeográfica, es Bahía Magdalena, una zona de transición biogeográfica, donde se mezcla fauna zooplanctónica proveniente de las zonas frías de

surgencia de la parte oceánica adyacente y especies de las aguas de la Bahía y esteros (Funes Rodriguez et al. 1998; Lluch Belda et al. 2000; Hernandez Trujillo et al. 2004).

3.2. Justificación

La pesquería de la almeja sifón, *Panopea generosa*, en México y Estados Unidos, representa un importante ingreso económico, y aun cuando es una especie de gran importancia comercial, hasta la fecha sólo existen en su mayoría estudios enfocados a describir algunos aspectos biológicos, reproductivos, demográficos y pesqueros, habiendo una carencia de estudios genéticos. Esto es más notable en el estado actual del conocimiento de las poblaciones mexicanas. Por lo tanto, es necesario incrementar la información disponible referente a la genética poblacional de ésta especie a lo largo del área de estudio. Con la información genética que será generada en el presente estudio, se podrá inferir procesos ecológicos y evolutivos, permitiendo contribuir a desarrollar estrategias de conservación y manejo del recurso. La información generada puede ser utilizada por los administradores de recursos pesqueros, para proponer aspectos pesqueros planificados a nivel regional, basados en el conocimiento tanto biológico como genético de esta especie, que permita mantener el rendimiento óptimo, su aprovechamiento racional y sustentable, para la conservación del recurso. Por otra parte, el uso complementario de marcadores moleculares de tipo nuclear (microsatélites) así como mitocondriales (COI y COIII), permite contar con una información genética más completa y representativa de todo el genoma del organismo, permitiendo un estudio genético robusto.

3.3. Hipótesis

Ho: No existe estructura genética poblacional en *Panopea generosa* a lo largo de las costas del océano Pacífico, es decir es una población panmíctica.

Ha: *Panopea generosa* posee estructura genética poblacional a lo largo de las costas del noreste del océano Pacífico.

3.4. Objetivos

3.4.1. Objetivo general

- Evaluar la diversidad y estructura genética poblacional de *Panopea generosa* en las aguas costeras del noreste del océano Pacífico.

3.4.2. Objetivos específicos

- Cuantificar la diversidad genética mitocondrial y nuclear de *P. generosa* en cuatro localidades del noreste del Pacífico.
- Cuantificar el grado de estructuración genética mitocondrial y nuclear, de *P. generosa* entre las localidades muestreadas.
- Evaluar la magnitud del flujo genético de las poblaciones de *P. generosa*

3.5. Materiales y métodos

3.5.1. Área de estudio

El área de estudio comprende las localidades de Alden Bank, en el Estado de Washington, EUA; San Quintín, Islas Coronado y Santa Rosalita en el estado de Baja California, México (Figura 5).

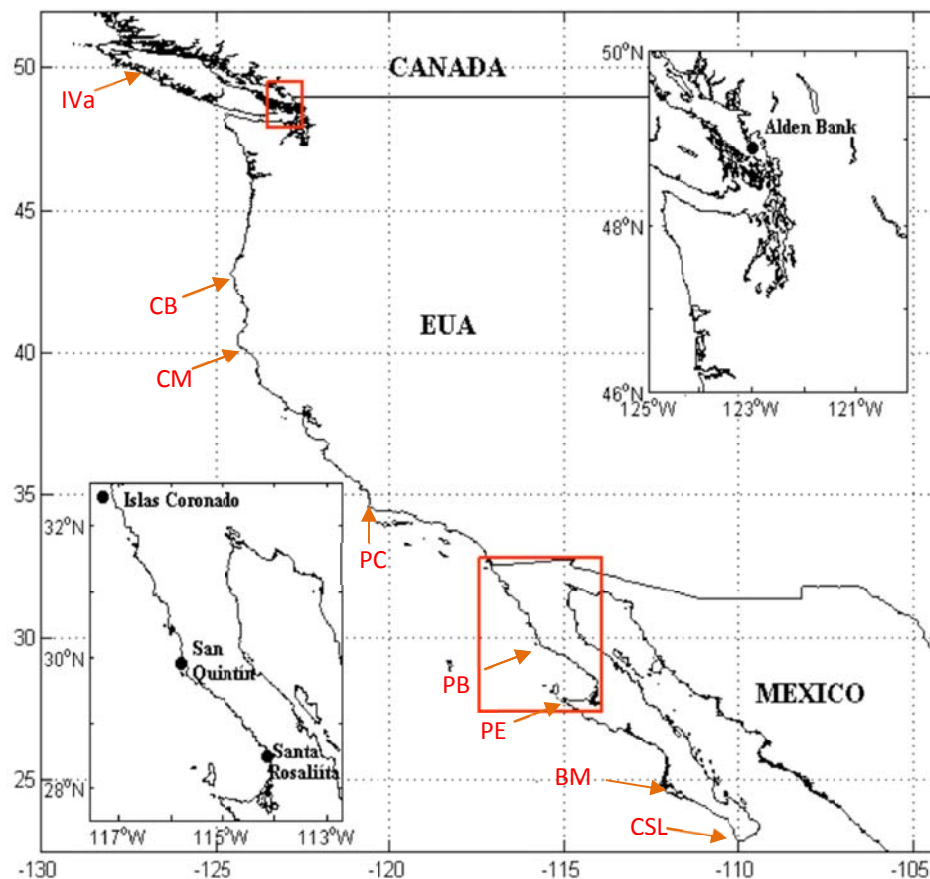


Figura 5. Localidades muestreadas en el Pacífico nororiental (puntos negros). Las flechas rojas indican las barreras biogeográficas: Cabo Mendocino (CM) Punta Concepción (PC) Punta Eugenia (PE) Bahía Magdalena (BM), Cabo San Lucas (CSL) y los sitios limitantes de las regiones de la SCC: Isla Vancouver (IVa) Cabo Blanco (CB) Punta Concepción (PC) Punta Baja (PB) Cabo San Lucas (CSL).

Todas las localidades, se encuentran influenciadas por el Sistema de la Corriente de California (SCC), la cual está caracterizada por ser altamente productiva debido al afloramiento de agua profunda la cual es rica en nutrientes. Su flujo es superficial y por encima de los 300 m de profundidad, llevando consigo aguas subárticas del Pacífico que tienen como características principales: baja temperatura, baja salinidad y alto contenido de oxígeno disuelto (Lynn y Simpson, 1987). La Corriente de California según, U.S. GLOBEC, 1994, puede ser definida en cuatro regiones las cuales cada una cuenta con características físicas, químicas y biológicas bien definidas. Los límites de estas regiones son difusos en la zona oceánica mientras que en la costa se puede definir (Figura 5):

Region I: va desde Isla Vancouver (Canadá) a Cabo Blanco (Oregón) 50-43 °N

Region II desde Cabo Blanco a Punta Concepción (California) 43-35 °N

Region III desde Punta Concepción a Punta Baja (Baja California) 35-30 °N

Region IV Desde punta Baja a Cabo San Lucas (Baja California) 30-23 °N

3.5.2. Trabajo de Campo

Las muestras de tejido del sifón y del callo de la almeja para las localidades de México y la localidad de Estados Unidos de América fueron conservadas en etanol al 96% para su posterior utilización en laboratorio.

Tabla 1. Numero de muestras (n) por localidad

Localidad	Estado	País	N
Alden Bank (AB)	Washington	EUA	30*
San Quintín (SQ)	Baja California	México	33
Islas Coronado (IC)	Baja California	México	33
Santa Rosalita (SR)	Baja California	México	33

* Para el análisis de los microsatélites se utilizaron 10 individuos extras de una localidad (Hood Canal) cercana Alden Bank, ubicada en el estado de Washington.

3.5.3. Trabajo de laboratorio

3.5.3. 1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se hizo mediante una digestión enzimática con proteínasa K en presencia de Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, CA), basada en el protocolo de Walsh et

al. (1991), como se describe brevemente a continuación. Alrededor de 0.1 g de tejido muscular se incubó a 55 °C por 1 hora en 400 µl de Chelex 100 (10%) y 7 µl de proteínas K (25ml/g) posteriormente la enzima fue desactivada a 95 °C por 20 minutos. El líquido sobrenadante fue utilizado para realizar las amplificaciones de ADN.

3.5.3. 2. Amplificación y secuenciación del ADN mitocondrial (ADNmt)

A cada individuo se le realizó una Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para amplificar secuencias parciales de los genes Citocromo Oxidasa I (COI) y Citocromo Oxidasa III (COIII) del ADNmt. Para el caso del COI, se utilizaron los cebadores: HCOI (5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3) y LCOI (5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') (Folmer et al. 1994). Para COIII se utilizaron: G12SF1 (5'- AGG CGT GTA CAA ATT GCC CG -3) y GC3R2 (5'- CGC CGC CTC CAA CCC G.-3'), los cuales amplifican 50 pb del extremo 3' del gen 12S adyacentes al gen COIII (Van koeveringe, 1998). Cada PCR de 25µl consistió de: 0.18mM dNTPs, 1X solución amortiguadora de PCR (Tris10mM, KCl 50mM, 1.5mM MgCl₂), 0.4µM de cada cebador, 1U de *Taq* DNA-Pol y 2 µl de ADN genómico (25-100 ng). Las condiciones de termociclado para COI fueron: un periodo inicial de desnaturalización 2 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 35°C, 1.5 min a 72°C, y una extensión final de la polimerización de 7 min a 72°C. Las condiciones de termociclado para COIII fueron: un periodo inicial de desnaturalización 2 min a 94°C, 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 1.5 min a 72°C, y una extensión final de la polimerización de 7 min a 72°C. Posteriormente, los productos de PCR se verificaron en geles de agarosa al 1.5 % para evaluar la integridad del producto de PCR. Los productos de PCR fueron purificados utilizando columnas QIAquick PCR Purification Kit de acuerdo al protocolo del fabricante (QUIAGEN Inc., Valencia CA). Para verificar la calidad y cantidad de producto de PCR, se realizó un gel de agarosa al 1.5 % a 95 V durante 45 min. Posteriormente, los productos fueron secuenciados en el laboratorio de Langebio (Cinvestav, Irapuato.) en un secuenciador ABI 3730 usando protocolos del fabricante.

3.5.3. 3. Amplificación de Microsatélites

Primeramente se hizo una revisión bibliográfica acerca de los microsatélites reportados para la especie, encontrándose 15 loci microsatelitales: 6 de Kauinen et al. (2004); 6 de Vandopalas y Bentzen (2000) y 3 de Vandopalas et al. (2004). De estos 15 microsatélites se escogieron 6 (Pab3;Pab6; Pab9; Pab101e; Pab106e; Pab112), que fueron recomendados por Brent Vadopalas (com. pers.) como los más consistentes y polimórficos para aplicarlos en todos los individuos del estudio (Tabla 2). Para amplificar los microsatélites, cada PCR consistió de: 15µl volumen total, conteniendo 1X solución amortiguadora de PCR (Tris10mM, KCl 50mM, 1.5mM MgCl₂), 0.18 mM de cada dNTP, 0.4 µM de cada cebador, 0.5U *Taq* DNA polimerasa, y 2 µl de ADN genómico (25-100 ng). El perfil de termociclado fue: periodo inicial de 95 °C por 10 minutos; 5 ciclos de 95 °C (30s), 52 °C(30s) y 72 °C (30s); 35 ciclos de 90 °C (15s), 52 °C(15s), 72 °C(30s); y una extensión final de 72 °C por 40 minutos. Posteriormente los productos de PCR se verificaron en geles de agarosa al 2% para evaluar la calidad y cantidad del producto de PCR. La genotipificación de los microsatélites se realizó mediante la visualización de los marcadores en un secuenciador semiautomático 377 Applied Biosystems, para lo cual se marcaron fluorescentemente los primers forward (Tabla 2). Posteriormente, se utilizó el programa Microchecker V.2.2.3 (Oosterhout et al. 2004) para detectar la presencia de alelos nulos.

Tabla 2. Secuencias de los loci microsatelitales probados en este estudio

Loci		Secuencia de los cebadores	Motivo esperado	Fluoroforo	Acceso GenBank	Autor
Pab 3	F	AAGCTGTTACGACATTGGA	GATA	FAM(Azul)	AF213657	Vandopalas y Bentzen, 2000
	R	TGAAAGTTGAACCTCTTCTTTGG				
Pab 6	F	GGCAATGTGTTGTGCCTTG	GATA(GATC) (GATA)	TET (Amarillo)	AF213660	Vandopalas y Bentzen, 2000
	R	CAAAAGACTGGAAACATATTAGC				
Pab9	F	CGTAAATGTTTATGCCTGCAA	GATA	HEX (Verde)	AF541258	Vandopalas et al. 2004
	R	GATCACAACCTCTTTTTTCTTC				
Pab101e	F	GTACCTGATGGTGTTAATAGTA	GACA	HEX (Verde)	AY520566	Kaukinen et al. 2004
	R	TTGATCATTATATTTTGCATAGAC				
Pab 106e	F	GGCAGTCAGACAGACCAG	GACA	TET (Amarillo)	AY520568	Kaukinen et al. 2004
	R	ATGATCTCTCTATATCTGCTTCAAC				
Pab 112	F	GCGCTTAGAATACTGCGGAAT	GCAC	FAM(Azul)	AY520569	Kaukinen et al. 2004
	R	GTTTACCATTACCATTGTCACGGTA				

3.5.4. Análisis de datos

3.5.4.1. Diversidad genética

3.5.4.1.1. ADN mitocondrial

Con ayuda del software DNAsp (Librado y Rozas, 2009), se determinaron el índice de diversidad haplotípica (h) y el índice de diversidad nucleotídica (π).

3.5.4.1.2. Microsatélites

Para el cuantificar la diversidad genética con este tipo de marcadores, se calculó el número y la frecuencia de los alelos, así como el nivel de heterocigosidad (H), es decir, la probabilidad de muestrear al azar un organismo heterocigoto, dichos análisis se hicieron con el programa GDA 1.1 (Lewis & Zaykin 2001). La riqueza alélica por locus y por población fue calculada usando el FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). Por otra parte, se realizó una prueba global para detectar desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg, así como el análisis de desequilibrio en el ligamiento entre todos los pares de loci con el programa GENEPOP 4.0 (Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008). La significancia para todas las pruebas múltiples se fijó en 0.05, con la corrección de Bonferroni (Rice 1989).

3.5.4.2. Estructura genética poblacional

Se estimó el índice de fijación Φ_{ST} , análogo del F_{ST} , para probar la hipótesis nula de panmixia. Este índice es la medida de diferenciación genética basada en la frecuencia de los alelos en cada localidad. Valores de Φ_{ST} igual o cercano a 0 reflejan que la heterocigosidad promedio de todas las subpoblaciones es equivalente a la esperada para el total de la población, por lo que existe homogeneidad genética o panmixia, por el contrario cuando Φ_{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 et al., 2005). Para el cálculo de Φ_{ST} tanto del ADN mitocondrial como para los microsatélites, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el programa Arlequín v3.1 (Excoffier et al. 2005), este análisis se basa en el análisis de la varianza de las frecuencias genotípicas. El cálculo del Φ_{ST} incorpora tanto las frecuencias alélicas, así como las distancias

genéticas como componente de varianza. La significancia se calculó por medio del método no paramétrico de permutaciones (20 000).

3.5.4.3. Flujo genético

El flujo genético nos indica hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo genético entre poblaciones locales, entonces todas las subpoblaciones evolucionan juntas; pero si hay flujo génico restringido entre ellas, entonces la evolución de cada una puede ser independiente (Slatkin, 1993). Para calcular el flujo genético (Figura 6), estimamos el número de migrantes efectivos entre poblaciones por generación (Nm) entre las poblaciones de acuerdo a la fórmula descrita por Wright (1969) utilizando los valores de Φ_{ST} obtenidos del programa Arlequín v3.1 (Excoffier et al. 2005).

$$Nm = \frac{1 - F_{ST}}{4F_{ST}}$$

Figura 6. Fórmula de Wright (1969)

Para estimar la magnitud y polaridad del flujo genético utilizamos inferencia bayesiana en el programa Migrate v3.2.19 (Beerli and Felsenstein, 1999) posteriormente hicimos una prueba estadística de comparación de medias (t-student) para determinar si la tasa de migración entre pares de poblaciones era significativamente diferente y poder establecer la dirección del flujo genético. El programa MIGRATE utiliza la teoría de la coalescencia para estimar tasas de migración (Nm) asimétrica entre poblaciones, asumiendo una tasa de mutación constante por locus. Las simulaciones fueron realizadas para las secuencias de ADN mitocondrial (COI y COIII) y para los tres microsatélites. Se realizaron 10 simulaciones para evaluar la consistencia de los resultados.

3.5.4.4. Relaciones poblacionales y filogeografía

Se generó un cladograma basado en las frecuencias alélicas para evaluar la agrupación de localidades con base en alelos compartidos y explorar la existencia de algún patrón espacial de los organismos entre localidades. Para lo anterior, se generó un árbol Neighbour-Joining basado en la distancia Cavalli-Sforza y Edward en el Programa Phylip 3.69 (Felsenstein, 2009).

3.6. Resultados

3.6.1. ADN mitocondrial

3.6.1.1. Diversidad genética

En cuanto a la distribución de los haplotipos de los genes COI y COII, no se encontró ningún patrón genético relacionado con la presencia de barreras biogeográficas así como con las regiones del sistema de la Corriente de California. En el gen mitocondrial COI, de los 14 haplotipos encontrados, dos fueron los más comunes (A_{COI} y B_{COI}) en todas las localidades, encontrándose en un 53% y 26% en todos los organismos, sin ningún patrón geográfico aparente (Figura 7). El haplotipo más dominante fue A_{COI} , el cual se encuentra dominando en la población más norteña (Alden Bank), en la población intermedia (Islas Coronado) así como en una población sureña (San Quintín). El haplotipo B_{COI} se encuentra dominando en la población sureña (Santa Rosalíita) con un 38%, sin embargo, A_{COI} , se encuentra en 33% en esta localidad. De igual forma, en el haplotipo B_{COI} al igual que A_{COI} , y los demás haplotipos no se encontró un patrón relacionado a la latitud.

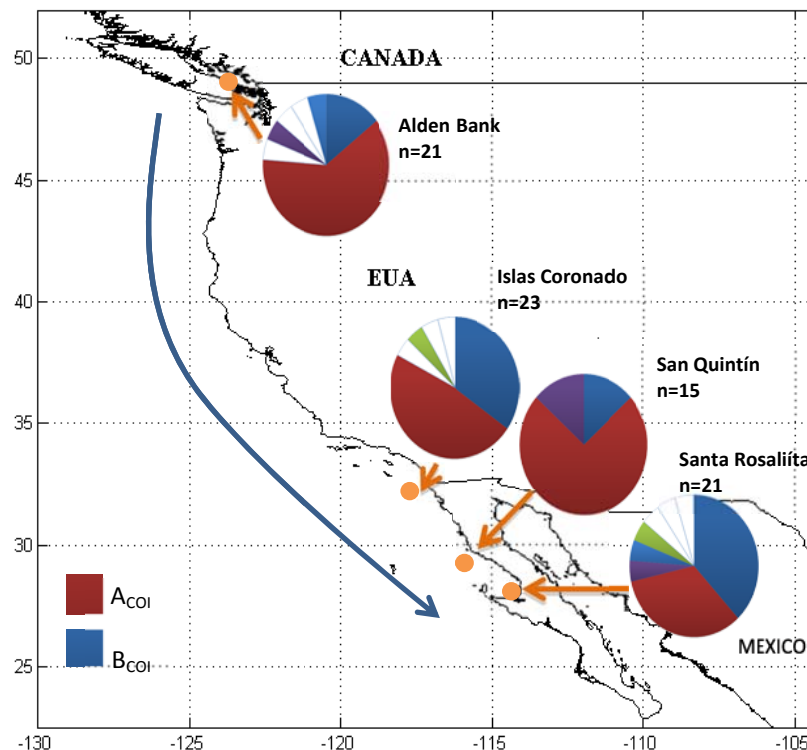


Figura 7. Frecuencia de haplotipos del gen mitocondrial COI encontrados en *P. generosa* para cada localidad. Cada haplotipo es representado por un color y los haplotipos privados se encuentran sin color. La flecha azul representa la Corriente de California.

En cuanto al número de haplotipos por localidad (Tabla 3), tampoco se observó un patrón latitudinal, siendo similar el número encontrado en Santa Rosalíta (población más sureña) con ocho, de los cuales tres resultaron haplotipos únicos y privados. En Alden Bank (población más norteña) se encontraron siete haplotipos, de los cuales tres fueron únicos y privados. Para Islas coronado se encontraron seis haplotipos de los cuales tres son únicos y privados. El menor número de haplotipos fue encontrado en San Quintín con tres de los cuales ninguno fue privado.

Por otra parte, en el gen mitocondrial COIII se encontró un total de 16 haplotipos, siendo un haplotipo el dominante (P_{COIII}) en todas las localidades, y estando presente en el 66% de los organismos, Este haplotipo como los demás, no presentaron algún patrón geográfico aparente (Figura 8).

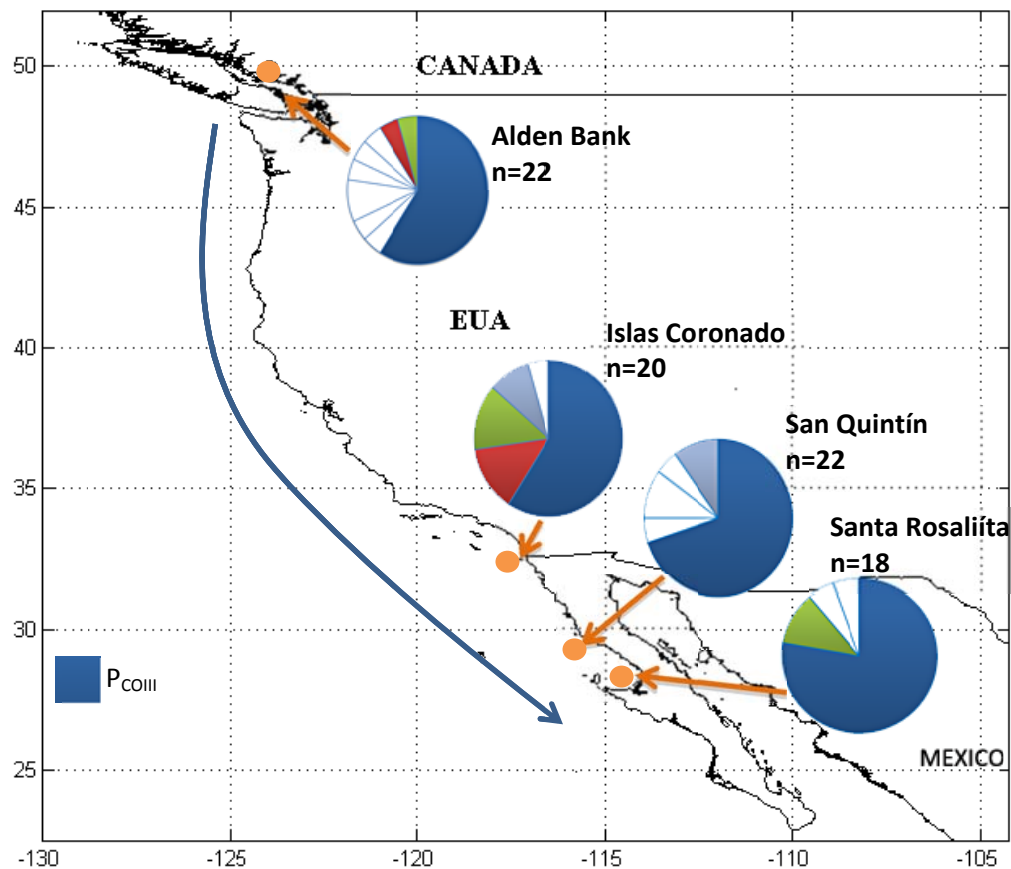


Figura 8. Frecuencia de haplotipos del gen mitocondrial COIII encontrados en *P. generosa* para cada localidad. Cada haplotipo es representado por un color y los haplotipos privados se encuentran sin color. La flecha azul representa la Corriente de California.

El número de haplotipos por localidad fue similar en tres de las cuatro localidades (Tabla 3), con excepción de Alden Bank, en donde se encontró el mayor número de haplotipos. En esta localidad norteña se encontraron nueve haplotipos, de los cuales seis son únicos y privados. El resto de las localidades presentaron cuatro o cinco haplotipos, de los cuales entre uno y tres fueron privados. En cuanto a la diversidad haplotípica, en el Citocromo Oxidasa I se encontró un valor de 0.66 para todas las muestras, siendo significativamente mayor (t Hutcheson= -6.75, $p < 0.0001$) que la diversidad encontrada en el Citocromo Oxidasa III ($h = 0.56$, Tabla 3). La diversidad nucleotídica (π) se encontró un valor de 0.0013 +/- 0.0011 para COI y 0.0021 +/- 0.0015 para COIII, no siendo diferentes significativamente (t Hutcheson= -1.16, $p = 0.25$)

Tabla 3. Índices de diversidad genética encontrados en COI y COIII. Número de individuos (n) número de haplotipos (A), diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π).

Localidad	COI				COIII			
	n	A	h	π	n	A	h	π
Alden Bank	21	7	0.61 +/-0.12	0.0012 +/-0.0010	22	9	0.68 +/-0.11	0.0021 +/-0.0015
Islas Coronado	15	3	0.46 +/-0.14	0.0010 +/-0.0009	20	5	0.51 +/-0.13	0.0009 +/-0.0008
San Quintín	23	6	0.67 +/-0.07	0.0013 +/-0.0011	22	5	0.63 +/-0.10	0.0011 +/-0.0010
Santa Rosalita	21	8	0.77 +/-0.07	0.0017 +/-0.0013	18	4	0.40 +/-0.14	0.0008 +/-0.0008
Promedio/total	80	14	0.66 +/-0.046	0.0013 +/- 0.0011	82	16	0.56 +/-0.06	0.0021 +/- 0.0015

3.6.1.2. Estructura genética poblacional

El ADN mitocondrial no mostró evidencia de estructura genética significativa, los valores de Φ_{ST} para ambos genes fueron de 0.007 ($p = 0.29$) y de 0.015 ($p = 0.09$) para COI y COIII respectivamente (Tabla 4). En ambos genes el mayor porcentaje de la variación estuvo dentro de las localidades (arriba del 98%).

Tabla 4. Resultados del análisis de varianza molecular encontrados en las secuencias del ADN mitocondrial COI y COIII de *P. generosa*.

	COI			COIII		
	Grados de libertad	Componentes de la varianza	% de variación	Grados de libertad	componentes de la varianza	% de variación
Entre poblaciones	3	0.003 Va	0.72	3	0.007 Va	1.56
Dentro de poblaciones	76	0.430 Vb	99.28	78	0.430 Vb	98.44
Total	79	0.433		81	0.437	
Índice de fijación $\Phi_{ST} = 0.007$ ($p = 0.29$)			Índice de fijación $\Phi_{ST} = 0.015$ ($p = 0.09$)			

Con el fin de determinar el grado de diferenciación entre localidades, se calcularon los índices de fijación pareados para COI (Tabla 5) y para COIII (Tabla 6). Dicho análisis corroboró que ninguna localidad se encuentra diferenciada genéticamente de forma significativa en ambos genes, a excepción de la comparación entre Alden bank vs. Islas Coronado con el gen COIII que fue significativa individualmente ($\Phi_{ST}=0.033$, $p=0.01$), pero no después de hacer la corrección de Bonferroni.

Tabla 5. Valores de Φ_{ST} pareados para la región de COI (bajo la diagonal) y sus niveles de significancia (sobre la diagonal).

Φ_{ST}/p	Alden Bank	Islas Coronado	San Quintín	Santa Rosaliíta
Alden Bank	-	0.71	0.25	0.10
Islas Coronado	-0.028	-	0.45	0.29
San Quintín	0.008	-0.013	-	0.48
Santa Rosaliíta	0.052	0.011	-0.01	-

Tabla 6. Valores de Φ_{ST} pareados para la región de COIII (bajo la diagonal) y sus niveles de significancia (sobre la diagonal).

Φ_{ST}/p	Alden Bank	Islas Coronado	San Quintín	Santa Rosaliíta
Alden Bank	-	0.01	0.64	0.31
Islas Coronado	0.033	-	0.1	0.079
San Quintín	-0.005	0.032	-	0.33
Santa Rosaliíta	0.008	0.029	0.008	-

3.6.1.3. Flujo genético

La distribución de los valores de Nm obtenidos de la inferencia bayesiana basada en las simulaciones de Markov Chain Monte Carlo en el programa MIGRATE resultaron no tener suficiente poder estadístico para calcular la estimación de los parámetros del modelo, incluyendo los valores de Nm, así como el tamaño efectivo poblacional (N_e). Por otra parte el flujo genético (Nm) estimado a partir del Φ_{ST} del gen COI sugiere que el mayor flujo genético (Nm=31) se da entre las poblaciones de Alden Bank y San Quintín, mientras que el menor (Nm=4.6) se da entre Alden Bank y Santa Rosaliíta (Tabla 7). Para el caso del gen COIII el mayor flujo genético (Nm=31) se dio entre las poblaciones de Santa Rosaliíta

comparada con Alden Bank así como con San Quintín, por el contrario, el menor flujo genético ($Nm=7.3$) se dio entre las poblaciones de Alden Bank vs Islas Coronado.

Tabla 7. Valores del flujo genético (Nm) pareados estimados a partir Φ_{ST} de para la región de COI (bajo la diagonal) y para COII (sobre la diagonal). Los valores infinitos de flujo genético (∞) corresponden a valores Φ_{ST} de cero

	Alden Bank	Islas Coronado	San Quintín	Santa Rosalíita
Alden Bank	-	7.3	∞	31
Islas Coronado	∞	-	7.6	8.4
San Quintín	31.0	∞	-	31
Santa Rosalíita	4.6	22.5	∞	-

3.6.2. Microsatélites

3.6.2.1. Diversidad genética

De los seis microsatélites probados, solo tres (Pab3; Pab9; Pab106e) pudieron ser utilizados para los estudios de diversidad y estructura genética poblacional. El análisis de los tres microsatélites registró 94 alelos distintos en los 152 individuos de *P. generosa* analizados (Tabla 8). El locus Pab106e fue el que presentó la mayor heterocigosidad observada ($H_o=0.90$) siendo el locus que obtuvo el mayor número de alelos, así como mayores valores de riqueza alélica y de alelos privados. Por otra parte, si bien el locus Pab3 presentó la menor heterocigosidad observada ($H_o=0.48$), no presentó el menor número de alelos, riqueza alélica y número de alelos privados de los tres loci. En cuanto al análisis de alelos nulos, el análisis de la distribución esperada de homocigotos en cada loci (Micro-Checker ver. 2.2.3) sugirió la presencia de alelos nulos sólo en el alelo Pab3 en todas las localidades.

Tabla 8. Diversidad genética en los tres loci microsatélites de *P. generosa* provenientes de cuatro localidades. n, tamaño de muestra; A, número promedio de alelos; RA, Riqueza Alélica; AP, número de alelos privados; He, heterocigosidad esperada (Nei 1987); Ho, heterocigosidad observada; F_{IS} , coeficiente de endogamia; HWE (p), estimación del equilibrio de Hardy-Weiberg, ** $p<0.01$.

Locus	n	A	RA	AP	He	Ho	F_{IS}	HWE (p)
Pab 3	149	30	21.7	5	0.95	0.48	0.49	**
Pab9	143	20	15.9	2	0.93	0.85	0.09	**
Pab106e	150	44	29.6	8	0.97	0.90	0.07	**

En cuanto a los índices de diversidad genética por localidad (Tabla 9), se encontró la mayor riqueza alélica en San Quintín (RA =22.2) seguido de Islas Coronado (21.7), Alden Bank (20.4) y Santa Rosalíita (20.8). Los alelos privados variaron entre 2 en Santa Rosalíita a 6 en San Quintín. La prueba de equilibrio de Hardy-Weiberg demostró que las poblaciones no se encuentran en equilibrio HWE debido a un déficit de heterocigotos ($p < 0.05$) en todas las localidades: Alden Bank (déficit de heterocigotos en loci Pab3; Pab9; Pab106e); Islas Coronado (déficit en loci Pab3; Pab9; Pab106e) San Quintín (déficit en loci Pab3; Pab106e) Santa Rosalíita (déficit en locus Pab3). Las pruebas pareadas de desequilibrio de ligamiento no fueron significativas ($p > 0.05$), confirmando que los tres loci se segregan de manera independiente y no se encuentran ligados en ninguno de los sitios de colecta. Por lo que los tres fueron utilizados para el análisis de la estructura genética de la especie.

Tabla 9. Diversidad genética y estimación de HWE de *P. generosa* de las localidades de Baja California y Washington. n, tamaño de muestra; A, número promedio de alelos; RA, Riqueza Alélica; AP, número de alelos privados; He, heterocigosidad esperada (Nei 1987); Ho, heterocigosidad observada; F_{IS}, coeficiente de endogamia, ** $p < 0.01$.

Localidad	n	A	RA	AP	He	Ho	F _{IS}	HWE(p)
AB*	37	22	20.4	3	0.94	0.72	0.24	**
IC	43	23	21.7	4	0.95	0.72	0.19	**
SQ	40	24	22.2	6	0.95	0.77	0.25	**
SR	32	21	20.8	2	0.94	0.77	0.19	**

*Los 10 individuos de Hood Canal no influyeron en una sub o sobrestimación de la diversidad genética y de los valores de las comparaciones pareadas de Φ_{ST} en relación a Alden Bank.

3.6.2.2. Estructura genética poblacional

El análisis de los tres loci microsatelitales no mostró evidencia de estructura genética significativa ($\Phi_{ST} = 0.004$, $p = 0.20$, Tabla 10). Por lo que el mayor porcentaje de la variación estuvo dentro de las localidades (99.6 %). Los resultados obtenidos con el ADN nuclear concuerdan con los obtenidos por el ADN mitocondrial, indicando la ausencia de estructura y presencia de panmixia a todo lo largo del Pacífico nororiental.

Tabla 10. Resultados del análisis de varianza molecular encontrados en los tres microsatélites aplicados en *P. generosa*.

	Grados de libertad	Componentes de la varianza	% variación
Entre poblaciones	3	0.006 Va	0.41
Dentro de poblaciones	300	1.336 Vb	99.59
Total		1.34	
Índice de fijación $\Phi_{ST}=0.004$ ($p=0.20$)			

Con el fin de determinar el grado de diferenciación entre localidades, se calcularon los índices de fijación pareados (Tabla 11). Dicho análisis corroboró que ninguna localidad se encuentra diferenciada genéticamente de forma significativa en los tres microsatélites.

Tabla 11. Valores de Φ_{ST} pareados para los tres loci microsatélites (bajo la diagonal) y sus niveles de significancia (sobre la diagonal).

Φ_{ST}/p	Alden Bank	Islas Coronado	San Quintín	Santa Rosaliíta
Alden Bank	-	0.13	0.08	0.29
Islas Coronado	0.006	-	0.27	0.45
San Quintín	0.007	0.004	-	0.86
Santa Rosaliíta	0.005	0.003	-0.001	-

3.6.2.3. Flujo genético

Por otra parte el flujo genético (Nm) estimado a partir del Φ_{ST} de los microsatélites sugiere que el mayor flujo genético ($Nm=83.1$) se da entre las poblaciones de Islas Coronado y Santa Rosaliíta, siendo estas localidades la que reportan el mayor flujo genético en el gen COIII. El menor flujo genético ($Nm=35.5$) se da entre Alden Bank y San Quintín (Tabla 12).

Tabla 12. Valores del flujo genético (Nm) pareados estimados a partir Φ_{ST} de para los microsatélites. Los valores infinitos de flujo genético (∞) corresponden a valores Φ_{ST} de cero

	Alden Bank	Islas Coronado	San Quintín	Santa Rosaliíta
Alden Bank	-			
Islas Coronado	41.4	-		
San Quintín	35.5	62.3	-	
Santa Rosaliíta	49.8	83.1	∞	-

3.6.2.4. Relaciones poblacionales y filogeografía

El árbol Neighbour-joining basado en la distancia Cavalli–Sforza y Edward (Figura 9) no reflejó ningún patrón geográfico claro, con excepción de la agrupación de San Quintín y Santa Rosaliíta las cuales son localidades geográficamente cercanas, sin embargo el consenso de 3000 replicas de remuestreo (bootstrap no paramétrico), agrupó a estas dos localidades solo 44% de las veces, considerando a esta y a todas las agrupaciones poco consistentes.

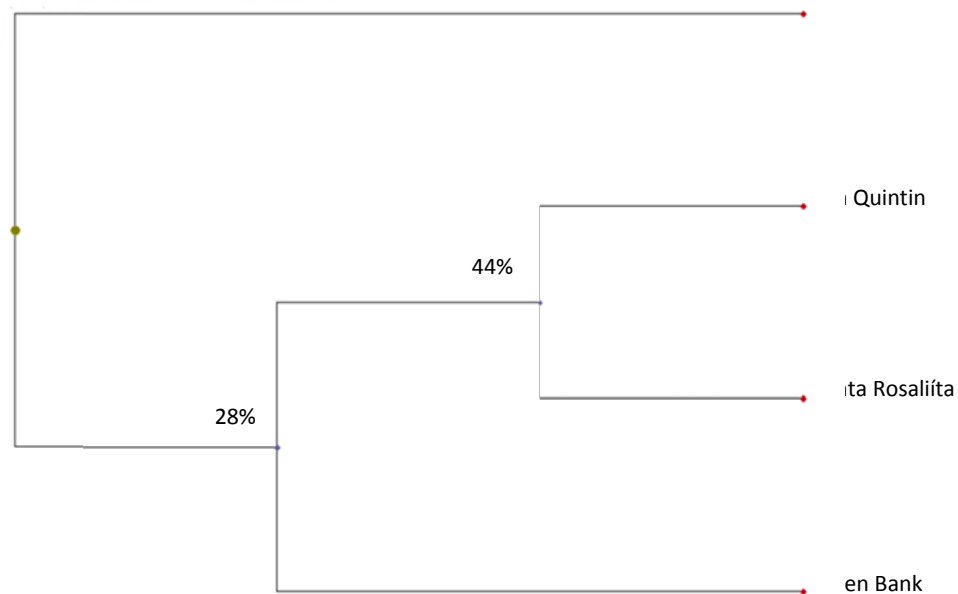


Figura 9 Árbol de Neighbor-joining basado en la distancia de Cavalli–Sforza y Edwards. Los números en los nodos indican el valor del bootstrap no paramétrico (3000 replicas)

3.7. Discusión

3.7.1. Diversidad genética

En los dos genes del ADN mitocondrial se encontró un valor de diversidad haplotípica moderada, siendo mayor la diversidad haplotípica en COI, comparada con la encontrada en COIII. Este último gen, registró un total de 16 haplotipos, relacionado a esto, Van koeveringe, (1998) reportó 15 haplotipos para este gen en *P. generosa* en poblaciones de la Columbia Británica, Canadá. En *P. generosa*, el valor de la diversidad haplotípica encontrada en COI ($h=0.66$) es mayor (t Hutcheson=5.25, $p<0.0001$), mientras que la diversidad nucleotídica ($\pi=0.0012$) no es significativamente diferente (t hutcheson=1.27, $p=0.21$), de la reportada para *P. globosa* ($h=0.62$, $\pi=0.0027$) en este estudio (capítulo cuatro), en poblaciones del Golfo de California y Bahía Magdalena (costa occidental de la península de Baja California). No existen otros estudios de diversidad y estructura genética en el género *Panopea* basados en el gen COI; sin embargo, este gen ha sido utilizado en muchos estudios de diversidad y estructura genética en bivalvos (An et al. 2000; Lee and Kim, 2003; Kochzius y Nuryanto, 2008; Riginio y Henzler, 2008; Gwak y Nakayama, 2011). El número de haplotipos de COI ha sido similar en algunas especies como *Pinctada fucata martensii*, aunque menor a lo reportado en *Scapharca broughtonii* y *Tridacna crocea*, cabe aclarar que el número de individuos y de poblaciones analizados son superiores en dichos estudios (Tabla 13).

En cuanto a los microsatélites, encontramos una alta diversidad genética ($He=0.94-0.95$) para *P. generosa*. Estos valores son muy similares a los reportados para la especie por Vadopalas et al. (2004) y Miller et al. (2006) ($He=0.93-0.94$ y $He=0.96-0.97$ respectivamente) para poblaciones del estado de Alaska, Washington, EUA y la Columbia Británica, Canadá. Las poblaciones de *P. generosa* de nuestra área de estudio, reflejan una diversidad mayor que la encontrada en poblaciones de *P. globosa* ($He= 0.84-0.90$) con el análisis de otros loci microsatelitales (Pérez Valencia 2011). Esto contradice lo encontrado por Rocha Olivares et al. (2010) quienes reportan una mayor diversidad en *P. globosa* ($h=0.94$ $\pi=0.0059$) que en *P. generosa* ($h=0.68$ $\pi=0.0008$) mediante secuenciación directa de regiones (ITS1, ITS2 y 5.8S) del ADN ribosomal. Sin embargo, hay que considerar que

además de aplicar otros marcadores moleculares (secuencias ADN_r), en el trabajo de Rocha Olivares (2010) se analizó un menor número de individuos y poblaciones que en este trabajo y en el de Pérez Valencia, (2011). Valores altos de diversidad genética han sido reportados para poblaciones naturales de otros bivalvos tales como *Ostrea Edulis L.* (He=0.86-0.94, Launey et al. 2002); *Crassostrea gigas* (He=0.890–0.960 y en otro estudio He=0.95-0.96, Arnoud Huvet et al. 2000; Yu y Li, 2007); *Crassostrea angulata* (He=0.91-0.95, Arnoud Huvet et al. 2000) y *Perna perna* (He=0.94-0.96, Holland, 2001), (Tabla 13).

Los altos niveles de diversidad genética encontrados en algunas especies de bivalvos, incluyendo *Panopea*, podrían estar relacionados con las características de las historias de vida, que incluye una alta fecundidad, fertilización externa y amplia dispersión larval. Para *Panopea generosa* se ha reportado una alta fecundidad, con un promedio de 40 millones de huevos por año por hembra (Beattie 1992) y con una reproducción estacional. Otra característica de la historia de vida importante para la diversidad genética, podría ser la longevidad, la cual, ha sido reportada en más de 100 años para *P. generosa* sin presencia de senescencia reproductiva, habiendo machos y hembras de 107 y 89 años respectivamente, sin reducción en su fecundidad (Sloan y Robinson, 1984). Esta longevidad pudiera estar jugando un papel importante en la prevención de erosión de la diversidad genética tanto de procesos históricos (cambios climáticos del pleisto y holoceno), como de recientes, tales como la explotación comercial (que inició en 1970 en Washington, EUA). Altos niveles de diversidad genética han sido reportados para distintas especies de invertebrados longevos, tales como el erizo de mar, *Strongylocentrotus franciscanus* (~100 años), la langosta americana, *Homarus americanus* (>30 años), y en el abulón negro, *Haliotis cracherodii* (>30 años) (Tabla 13).

Otro aspecto a considerar es el tamaño efectivo poblacional, generalmente se espera que a mayor tamaño efectivo poblacional exista una mayor diversidad genética. Por el contrario, la heterocigosidad y la diversidad alélica pueden disminuir debido al efecto de la deriva genética al azar en poblaciones con tamaños efectivos poblacionales bajos o que presenten desequilibrios demográficos puntuales como los cuellos de botella (Vadopalas y Naish, 2004). Para las poblaciones de *P. generosa* en Washington, EUA se ha reportado altas densidades poblacionales 1.7 ind/m² con un rango de 0-22.5 ind/m² (Goodwin y

Pease, 1991). Mientras que en las poblaciones mexicanas se han reportado densidades menores de 0.6 ind/m² con un rango de 0.2 y 1.06 ind/m² para la costa de Baja California (Calderón Aguilera, 2009). Hay que tener en cuenta que la densidad poblacional podría servir para estimar el tamaño efectivo poblacional. En nuestro estudio, los datos moleculares no arrojaron suficiente poder estadístico para determinar valores consistentes de tamaño efectivo poblacional en el programa Migrate v3.2.19.

Por otra parte, de las cuatro poblaciones que se analizaron, en ninguna se observó ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg, debido a una deficiencia de heterocigotos. El déficit de heterocigotos también ha sido observado para poblaciones de *P. generosa* en estudios previos (Vadopalas, 2004; Miller et al. 2006) con la utilización de los mismos loci (Pab3; Pab9; Pab106e), así como en otros loci de microsatélites en poblaciones naturales de varias especies de bivalvos (*Crasostrea gigas* y *C. angulata*, Arnaud Huvet et al. 2000; *Ostrea edulis*, Launey et al. 2002; *Pinctada máxima*, Benzie et al. 2006; *Crassostrea virginica*, Rose et al. 2006). Este fenómeno ha sido atribuido a procesos poblacionales como efecto Wahlund, endogamia, y selección, al igual que a artefactos experimentales tales como alelos nulos, homoplasia, deserción del alelo más grande, y bandas fantasmas (Benzie y Smith Keune, 2006; Rose et al. 2006).

En nuestro estudio, la presencia de alelos nulos en el locus Pab3 podría explicar la deficiencia de heterocigotos, mientras que para Pab9 y Pab106e no se encontró evidencia de la presencia de alelos nulos, por lo que la deficiencia de heterocigotos podría ser explicada por procesos de endogamia, dado los valores positivos de F_{IS} en las poblaciones más que a problemas técnicos como homoplasia, ya que alelos muy cercanos no fueron muy frecuentes en nuestros análisis. Aunado a lo anterior, el programa Microchecker v2.2.3 no encontró evidencia de error al aplicar tamaños de los microsatélites por tartamudeo de las bandas, ni evidencia de deserción del alelo más grande. Es importante mencionar que a pesar de encontrar deficiencia de heterocigotos en los tres loci, encontramos valores altos de heterocigosidad para los loci Pab9 y Pab106e ($H_o=0.85$ y 0.90 respectivamente).

Tabla 13. Diversidad y estructura genética poblacional en bivalvos y otros invertebrados marinos. #P, número de poblaciones; h , diversidad haplotípica; π , diversidad nucleotídica; H_e , heterocigosidad esperada; H_o , Heterocigosidad observada, PLD, Duración larval en medio pelágico; F_{ST} , índice de fijación; COI, Citocromo Oxidasa I; COIII, Citocromo Oxidasa III; M, Microsatélites; sncDNA, Marcadores nucleares de una sola copia.

Especie	Clase	#P	locus	h	π	He (rango)	He	Ho	PLD	Longevidad	F_{ST} global (rango)	Citas
<i>Panopea generosa</i>	bivalvia	4	COI/COIII/3M	0.66/0.56	0.001/0.002	0.94-0.95	0.95	0.75	47	>100 años	Sin estructura genética	1
<i>Panopea globosa</i>	bivalvia	3	COI	0.62	0.0027					>60 años	Sin estructura genética	1;2
<i>Panopea generosa</i>	bivalvia	10	7 M			0.93-0.94	0.94	0.60	47	>100 años	$F_{ST}=0.001$ $p=0.004$ (0.0007-0.0033 $p=0.00028$)	3
<i>Panopea generosa</i>	bivalvia	16	8 M			0.96-0.97	0.97	0.80	47	>100 años	$F_{ST}=0.004$ $p<0.01$ (0.002-0.005 $p<0.05$)	3
<i>Panopea globosa</i>	bivalvia	4	2 M			0.84-0.90	0.87	0.71			$F_{ST}=0$ (0-0.036 $p<0.005$)	5
<i>Mytilus californianus</i>	bivalvia	6	sncDNA						45		Sin estructura genética	6
<i>Pinctada maxima</i>	bivalvia	8	6 M			0.67-0.74	0.71	0.68	24		$F_{ST} = 0.027$ $p<0.001$ (0.007-0.046 $p<0.05$)	7
<i>Pinctada fucata martensii</i>	bivalvia	1	COI	0.507	0.0012							8
<i>Perna perna</i>	bivalvia	6	2 M			0.94-0.96	0.95	0.90	20		$F_{ST}=0.022$ (0.010-0.038)	9
<i>Scapharca broughtonii</i>	bivalvia	7	COI	0.79	0.009				20			10
<i>Crassostrea virginica</i>	bivalvia	6	5 M			0.80-0.845	0.82	0.60	21		$F_{ST}0.019$ $p < 0.05$ (0.012-0.03 $p<0.0153$)	11
<i>Crassostrea virginica</i>	bivalvia	15	8 M			0.62-0.95	0.86		21		Sin estructura genética	12
<i>Crassostrea gigas</i>	bivalvia	4	3 M			0.94-0.96	0.95	0.74	21		$F_{ST}=0.006$ $p<0.05$ (0.0061-0.01 $p<0.05$)	13
<i>Crassostrea gigas</i>	bivalvia	2	7 M			0.95-0.96	0.96	0.69	21		$F_{ST}=0.01$ $p<0.05$	14
<i>Crassostrea angulata</i>	bivalvia	5	3 M			0.91-0.95	0.94	0.79	21		$F_{ST}=0.018$ $p<0.05$ (0.008-0.026 $p<0.05$)	13
<i>Ostrea Edulis L.</i>	bivalvia	15	5 M			0.86-0.94	0.91	0.84	21		$F_{ST} = 0.019$ $p<0.05$ (0.0001-0.058 $p<0.05$)	15
<i>Chlamys farreri</i>	bivalvia	6	9 M			0.66-0.82	0.73	0.59	15		$F_{ST}=0.0184-0.0602$ $P<0.01$	16
<i>Tridacna crocea</i>	bivalvia	15	COI	0.93	0.015				9		$\Phi_{ST} = 0.28$; $P < 0.001$ (0.05-0.86 $p<0.001$)	17
<i>Strongylocentrotus franciscanus</i>	Echinoidea	13	7 M			0.92-0.95	0.94	0.76	61	>100 años	Sin estructura genética	4
<i>Paramuricea clavata</i>	Anthozoa	11	5 M						30	>60 años	$F_{ST}0.036$ $p<0.001$ (0.032-0.040 $p<0.001$)	18;19;20
<i>Haliotis cracherodii</i>	Gastropoda	11	COI/4 M	0.63	0.002		0.95	0.46	15	>30 años	Sin estructura genética	21;22
<i>Haliotis rufescens</i>	Gastropoda	10	COI/5 M				0.88	0.76	15	>20 años	Sin estructura genética	23
<i>Homarus americanus</i>	Malacostraca	7	9 M			0.77-0.86	0.86	0.70		>30 años	Sin estructura genética	24;25;26

Citas: 1, nuestro estudio; 2, Suárez Moo et al. en prensa; 3 Vadopalas et al 2004; 4 Miller et al. 2006; 5, Perez Valencia, 2011 ;6, Addison et al. 2008; 7, Lind et al. 2007; 8, Gwak y Nakayama 2011; 9, Holland, 2001;10, Cho et al. 2007;11, Galindo Sánchez et al 2008;12,Rose et al. 2006; 13, Arnaud Huvet, et al. 2000;14, Yu y Li, 2007;15, Launey et al. 2002;16, Zhan et al. 2009; 17, Kochzius y Nuryanto, 2008; 18, Linares et al. 2007; 19, Baums et al. 2005; 20, Baums et al. 2006; 21, Miner et al. 2006; 22, Gruenthal y Burton 2008; 23, Morris et al. 1980; 24, Lawton & Lavalli 1995; 25, harding et al. 1997; 26, Crivello et al. 2005

3.7.2. Estructura genética poblacional

Ninguno de los marcadores, mitocondriales o nucleares, permitió rechazar la hipótesis de panmixia en *P. generosa* entre las cuatro localidades situadas a lo largo del Pacífico nororiental. Este patrón genético de ausencia de estructura poblacional corresponde a la interacción entre fuerzas evolutivas, procesos ecológicos, así como características de la historia de vida de la almeja de sifón.

3.7.2.1 Historia de vida

En *P. generosa* detectamos homogeneidad genética a lo largo del Pacífico nororiental, lo que refleja que existe un elevado flujo genético entre las localidades. Dada la naturaleza sedentaria de los adultos, dicha homogeneidad genética apunta a que la dispersión larval es lo suficientemente grande para homogenizar genéticamente las localidades muestreadas. Para algunas especies, el potencial de la dispersión larval está fuertemente correlacionado con el tiempo de duración en el ambiente pelágico como plancton o PLD por sus siglas en inglés (Weersing y Toonen, 2009). En *P. generosa* se ha reportado que la PLD se prolonga 47 días (Goodwin y Bradbury, 2001) y dado que las localidades del presente estudio se encuentra influenciadas por el Sistema de la Corriente de California, de estar expuestas las larvas a la Corriente de California (velocidad promedio de 0.10 m/s, Lynn and Simpson, 1990) y a la contracorriente de Davison (velocidad de 0.2-0.3 m/s en enero Glickman, 1999) podríamos esperar un potencial de dispersión de 406 km hacia el sur, y 1200 km hacia el norte respectivamente, lo anterior favorecería un elevado flujo genético entre poblaciones. Relacionado a lo anterior, para organismos con un gran potencial de dispersión larval, alta fecundidad y amplia distribución, como es el caso de *P. generosa*, el haber encontrado panmixia no es inesperado (Bohonak 1999).

La panmixia en presencia de grandes PLD ha sido reportado para otras especies de invertebrados marinos tal es como: el mejillón, *Mytilus californianus* (PLD 45 días) mostrando homogeneidad genética desde Alaska hasta Baja California (Addison et al. 2008); el erizo de mar (*Strongylocentrotus franciscanus*) el cual con una duración larval de más de 61 días, mostró homogeneidad genética en poblaciones de la Columbia Británica y

Alaska (Miller et al. 2006). Otros ejemplos incluyen: al molusco *Aplysia californica* (PLD 30 días), al equinodermo *Pisaster giganteus* (PLD 60 días); y al decapodo *Pandalus platyceros* (PLD 150 días) (Kelly and Palumbi, 2010). En un análisis de la literatura, encontramos que algunas especies de bivalvos poseen una relación negativa entre los valores de estructuración y el PLD (Figura 10, tabla 13) observando una disminución de los valores de F_{ST} a mayores valores de PLD.

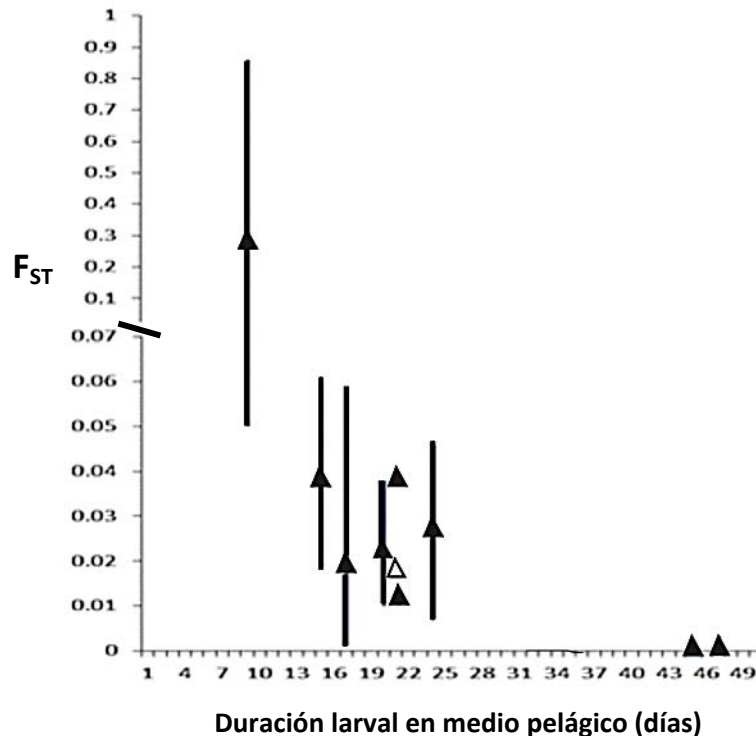


Figura 10. Relación entre el F_{ST} (o su análogo Φ_{ST}) y la duración larval en el medio pelágico (PLD en sus siglas en inglés). Cada triángulo negro representa a una especie de bivalvo, y el triángulo blanco representa 2 especies con el mismo valor de PLD. Las líneas solidas representan los valores mínimos y máximos de F_{ST} .

Esta relación negativa entre la duración larval y la estructura genética poblacional, no es una regla, ya que organismos como *Pagurus hirsutiussculus* y *Hemigrapsus nudus* con una alta capacidad de dispersión (67 y 30 día, respectivamente) han mostrado tener una estructura genética poblacional (Kelly y Palumbi, 2010). Por otra parte, no se sabe si lo anterior aplica para bivalvos, ya que la mayoría de los estudios en este grupo de invertebrados reportan desde nula hasta débil estructuración genética poblacional. Una

excepción es *Tridacta crocea* la cual es una de las pocas especies en la que se ha reportado un fuerte estructuración, pero un bajo PLD ($F_{ST}=0.28$ $p<0.001$, PLD=9 días) (Kochzius y Nuryanto, 2008). Esta relación incipiente entre el PLD y la estructura genética podría deberse a la retención larval ocasionada por comportamiento filopátrico o por procesos oceanográficos. Por otro lado, se ha reportado que organismos con poca o nula dispersión larval presentan niveles altos de estructura genética poblacional, como resultado de un flujo genético bajo (Gruenthal y Burton, 2008; Kelly y Palumbi 2010). Por otra parte, otros reportes han encontrado que el tiempo de duración larval quizás no sea un buen indicador de la conectividad entre poblaciones, teniendo una débil correlación con el nivel de estructuración genética (Taylor y Hellberg 2003; Weersing y Toonen, 2009; Kelly y Palumbi, 2010), por lo que se ha propuesto que hay que considerar factores como el desarrollo larval en el medio pelágico, el comportamiento de la larva y los patrones oceanográficos. Se ha observado en condiciones de laboratorio que las larvas pre-competentes de *P. generosa* forman agregaciones de cerca de 100 individuos usando filamentos de biso y moco, lo cual posiblemente incrementa su coeficiente de arrastre y capacidad de dispersión por advección (Vadopalas et al. 2004; Vadopalas et al. 2012).

Otra características de la historia de vida de *P. generosa* que hay que tener en cuenta es su alta fecundidad (40 millones de huevos fecundados por año) y su longevidad (>100 años). Feldman et al. (2004) sugieren que estas características de la almeja de sifón maximizan la homogeneidad genética en sus poblaciones, la alta fecundidad le permite superar las dificultades en tiempo y espacio para la unión de gametos, y/o sobrevivir y maximizar su dispersión (Johnson et al. 2001).

En *P. generosa*, la longevidad permite un flujo genético a una escala de tiempo mayor, la carencia de senescencia reproductiva, alta dispersión larval y alta fecundidad aumentan la probabilidad de supervivencia de las larvas y la colonización de nuevos sitios a una escala de tiempo grande. Otros organismos longevos como el erizo de mar, cuya edad puede exceder los 100 años (Debenham et al. 2000; Miller et al. 2006), así como el abulón y la langosta americana con edades mayores a los 30 años (Harding et al. 1997; Gruenthal et al. 2007; Gruenthal y Burton 2008) también carecen de estructuración

genética, mientras que otras como el coral *Paramuricea clavata* (>60 años), poseen una estructura genética, pero baja (Baums et al. 2005) (Tabla 13).

En *P. generosa* no se encontró estructuración genética significativa (COI $F_{ST}=0.03$; COIII $F_{ST}=0.004$; microsatelites $F_{ST}=0.007$ y $p > 0.05$ en los tres casos) esto es similar a lo encontrado en otras especies de bivalvos tales como *C. gigas* y *C. angulata* (Arnaud Huvet et al. 2000); *C. virginica* (Rose et al. 2006); *M. californianus* (Addison et al. 2008), *P. globosa* (Perez Valencia, 2011). Por otra parte, en los bivalvos se han detectado valores bajos pero significativos de estructuración (F_{ST} o su análogo Φ_{ST}) (Tabla 13). De las 9 especies de bivalvos revisadas en la literatura, en todas se reportan valores bajos y significativos (rango de $F_{ST}=0.001-0.027$), excepto en *Tridacta maxima* para la que se reportan altos valores de F_{ST} (rango 0.05-0.86 $p<0.001$). Este patrón de baja estructuración en bivalvos quizás pueda ser atribuido a las historias de vida (alta fecundidad, fecundidad externa y amplia dispersión larval) de este grupo de invertebrados más que al tipo de marcadores, ya que estudios de estructura genética en bivalvos con diferentes marcadores son consistentes en reflejar valores bajos diferenciación: para *Ostrea edulis*, $F_{ST} = 0.08$ $p<0.05$, con el empleo de aloenzimas (Launey et al. 2002), para *C. gigas* y *C. angulata*, $F_{ST}=0.02$ y $F_{ST} =0.03$ no significativas, respectivamente, con el uso de PCR-RFLP de ADNmt (COI) (Arnaud Huvet et al. 2000).

3.7.2.2. Pacífico Nororiental: barreras biogeográficas

El análisis de la diversidad genética del ADN mitocondrial y ADN nuclear, no mostró un patrón latitudinal, en relación con las barreras biogeográficas del Pacífico nororiental. En el caso del ADNmt, los haplotipos están distribuidos de forma aleatoria a lo largo del rango latitudinal, mientras que en los microsátélites no se observaron cambios en la diversidad genética, ni estructura genética poblacional a lo largo de la región estudiada. En el sistema de la Corriente de California se ha reportado para algunas especies de organismos marinos la presencia de ciertos patrones genéticos relacionados con la presencia de barreras biogeográficas, tales como Cabo Medocino; la Bahía de Monterey y Punta Concepción (Burton, 1998; Dawson, 2001; Kelly y Palumbi 2010). Sin embargo, estos patrones no han sido observados en especies del género *Mytilus* (Levinton y

Suchanek, 1978; Sarver y Foltz, 1993; Addison et al. 2008) así como en otros invertebrados marinos: en el erizos de mar, *Strongylocentrotus franciscanus*, (Debenham et al. 2000) en el decápodo, *Emerita análoga*, y en la estrellas de mar, *Pisaster giganteus* (Kelly y Palumbi 2010).

Es notable que encontramos homogeneidad genética en las poblaciones de *P. generosa* a una escala espacial de miles de kilómetros, >2000 km entre la localidad de Washington y las localidades de Baja California. Dicha homogeneidad a gran escala es consistente con la encontrada en otros trabajos realizados en el Pacífico nororiental, por ejemplo en el erizo de mar (~3000 km) (Debenham et al. 2000) y en el mejillón de california (~4000km) (Addison et al. 2008), donde reportan homogeneidad genética a través de este amplio rango geográfico, suponiendo que estos resultados son debidos a un alto flujo genético y a la carencia de algún gradiente ambiental a lo largo de la Corriente de California. Consideramos que a pesar de la importancia de las barreras biogeográficas, como sitios de cambios ambientales y faunísticos, estas barreras no representan un impedimento para el intercambio genético entre las poblaciones del norte y del sur de *P. generosa*, dadas las características de su historia de vida. Lo anterior, coincide con nuestros altos valores de flujo genético encontrados tanto de la información mitocondrial como nuclear.

Por otra parte, la presencia de “parches” de *P. generosa* en localidades intermedias entre Baja California y Washington, en Portland, Oregón, EUA, en Bahía Humboldt, California, EUA (Goodwin y Pease, 1989), en la Bahía de Monterey (Oliver et al. 1980), y en la Bahía sur de California “Southern California Bight” nos sugiere que quizás estas localidades intermedias estén sirviendo como conexión de flujo genético entre las localidades del norte y las localidades del sur, lo cual sería consistente con que *P. generosa* presente una gran población panmítica a lo largo del Pacífico nororiental. Otra razón que podría explicar la ausencia de estructura genética poblacional, sería la presencia de “parches” de *P. generosa* a mayores profundidades, sobre las cuales el esfuerzo pesquero no ejerce presión, y además se carece del conocimiento de su existencia. *P. generosa* habita desde la zona intermareal hasta profundidades de 100 m (Jamison et al. 1984) y se ha reportado que la densidad de los individuos aumentan con la profundidad (hasta 18 m): 1.4

almejas/m² para profundidades menores a 9.1 m; 2.0 almejas/m² para profundidades de 9.1 - 13.7m y finalmente a profundidades mayores a 13.7 m las densidades pueden alcanzar hasta 2.2 almejas/m² (Goodwin y Pease, 1991). Tomando en cuenta lo anterior, si esta tendencia continuara a mayores profundidades (>18m), los “parches” más profundos podrían tener mayores densidades de individuos, lo que favorecería una cantidad considerable de aporte de larvas a las poblaciones costeras, esto mediante procesos oceanográficos como surgencias, generando una carencia de estructura genética poblacional.

3.7.2.3 Análisis de la estructura genética poblacional en *P. generosa*

La falta de estructuración genética en *P. generosa* encontrada en este trabajo, coincide con lo reportado por Van koeveringe, (1998) en poblaciones naturales de la costa de la Columbia Británica con el empleo del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa III. Dicho trabajo posee un bajo poder estadístico para la detección de la estructuración, ya que sólo utiliza un locus y el tamaño de muestra es bajo (promedio 6.5 individuos por población). Sin embargo, nosotros encontramos un número similar de haplotipos con un mayor tamaño de muestra (20.5 individuos por población en promedio). Lo anterior nos hace hipotetizar que quizás el resultado de panmixia que obtuvimos con este gen no se encuentre necesariamente asociado a una falta de poder estadístico debida a tamaños de muestra pequeños.

Por otra parte, nuestros resultados no coinciden con los reportados por Vadopalas et al. (2004) y Miller et al. (2006) de una baja pero significativa estructura genética poblacional en el rango más al norte de la distribución de la especie. Vadopalas et al. (2004) encontraron una mayor diferenciación genética a una escala de 100 a 1000 km. Sin embargo, no detectan aislamiento por distancia. Por su parte, Miller et al. (2006) proponen que *P. generosa* exhibe panmixia en escalas pequeñas (50-300 km) y un aislamiento por distancia con un patrón de dispersión conforme al modelo de camino de piedras (“stepping stone” en inglés) a escalas intermedias (500-1000 km). Relacionado a esto, a una gran escala de miles de kilómetros (>2000 km entre Washington y Baja California), nosotros no pudimos detectar estructura genética poblacional, lo mismo ocurrió en la distancia

intermedia (>500 km) y a en las escalas pequeñas (<300 km) para el caso de las poblaciones de Baja California, por lo que nuestros resultados no apoyan la hipótesis de Miller et al. (2006) y sugieren una homogeneidad genética a distintas escalas. Es importante señalar que ambas áreas de estudio de Vadopalas et al. (2004) y Miller et al. (2006) Incluyen la cuenca de “Puget Sound”, la cual se caracteriza por una complejidad hidrológica y batimétrica que favorecen la retención de larvas, y por lo tanto podría estar funcionando como una barrera al flujo genético. Miller et al (2006) mencionan que las poblaciones del sur de la Isla Reyna Charlotte (Columbia Británica) quizás se encuentra influenciada por factores oceanográficos como la disyunción entre la Corriente de California y el giro de Alaska, lo que impide el flujo genético hacia las poblaciones sureñas de Canadá y favorece un aislamiento por distancia. Con lo anterior, nosotros suponemos que la estructuración genética detectada en los últimos dos trabajos, es el resultado de la influencia de procesos ecológicos locales de la región de “Puget Sound”, mientras que el ambiente que experimentan el resto de las larvas producidas en altas latitudes les permite alcanzar poblaciones sureñas de tal suerte que no encuentran barreras para el flujo genético entre Washington y Baja California.

4. Evaluación de la presencia y diversidad genética de la almeja de sifón de Cortés (*Panopea globosa*) en Bahía Magdalena, BCS, México, mediante el uso de marcadores moleculares.

4.1. Introducción

La distribución geográfica de la almeja de sifón de Cortés (*Panopea globosa*) en la costa noroeste de México ha sido incierta. Esta almeja se ha considerado hasta ahora endémica del Golfo de California, encontrándose de San Felipe, costa este de Baja California, a Mazatlán, Sinaloa (Keen 1971; Hendickx et al. 2005; Arambula-Pujol et al. 2008). Sin embargo, evidencias sin publicar (Perez Valencia, 2011; Leyva Valencia, 2012) e información por comunicación personal han sugerido la presencia de *P. globosa* en la costa oeste de la península de Baja California, específicamente en Bahía Magdalena, Baja California sur. Esta situación ha generado algo de confusión acerca del límite geográfico real de ambas especies del género *Panopea* en el Pacífico nororiental (Rocha Olivares et al. 2010). Por otra parte, la captura de *P. globosa* en las costas de México es reciente, al inicio de la explotación los registros de captura no diferenciaban entre esta especie y *P. generosa*, reportándose un ingreso anual de 30 millones de dólares para ambas (SAGARPA, 2007). Posteriormente, los registros se realizaron por separado, teniendo *P. globosa* una producción estimada para los años 2000, 2001 y 2002 de 8.5 ton, 51 ton y 35 ton, respectivamente (Aragón Noriega et al. 2007). A pesar de la importancia económica de *P. globosa*, en la actualidad el conocimiento de la biología de la especie en aguas mexicanas está en desarrollo. Entre los pocos estudios realizados se encuentran el de Aragón Noriega et al. (2007), quienes reportan la variación morfométrica y biología reproductiva en muestras colectadas durante 2004 y 2005 en dos localidades de la Bahía de Guaymas, Empalme, Sonora (porción central del Golfo de California), documentando picos de desove entre enero y febrero (invierno) en el periodo de menor temperatura superficial del océano (18°C). Arambula Pujol et al. (2008), por su parte, complementan el estudio anterior, analizando aspectos reproductivos en las mismas muestras, pero haciendo un análisis comparativo con los ciclos reproductivos de *P. generosa* de Canadá y *P. zelandica* de Nueva Zelanda. Calderón Aguilera et al. (2010b) analizan la aparente sincronía entre el desarrollo larval y los picos de producción primaria en la porción del Alto Golfo de

California, tal como pronostica la hipótesis “match-mismatch” de Cushing. En el análisis de series de tiempo los autores muestran que el desarrollo gamético de *P. globosa* es desencadenado por un rápido decremento en la temperatura. Rocha Olivares et al. (2010), detectaron diferencias morfométricas y genéticas significativas entre las especies *P. generosa* y *P. globosa*, de Baja California y del Alto Golfo de California respectivamente, este trabajo provee información básica acerca de la distinción entre estas dos especies en la pesquería de la almeja de sifón en México. Más recientemente, Cortez Lucero et al. (2011) y Cruz Vásquez et al. (2012) estiman una longitud asintótica menor de 130 mm de *P. globosa* para la región central del Golfo de California, el primer trabajo utiliza el modelo de Von Bertalanffy mientras que en el segundo se emplea un análisis multimodal (Von Bertalanffy, logistic, Gompertz). Por otra parte, Aragón Noriega et al. (2012) realizan un análisis del estado de la pesquería de las almejas de sifón en México en el que abordan la producción y sus interactuantes, las tendencias de la producción, el mercado y el precio actual de este importante recurso de México.

4.2 Justificación

Debido a la importancia económica de *P. globosa*, como objetivo de una pesquería con un alto valor creciente en México, además de su común confusión con *P. generosa* en las costas del Pacífico mexicano, es necesario aclarar su límite geográfico para una distinción estructural y funcional con dicha especie congénérica. Adicionalmente, la información que será generada en este trabajo contribuye a establecer las bases biológicas para la implementación de medidas de manejo sostenible que permitan la conservación del recurso en aguas mexicanas.

4.3. Hipótesis

H₁: La especie *Panopea globosa* habita desde el alto Golfo de California hasta Bahía Magdalena, estando presente en zonas exteriores al Golfo de California

H₂: Existe estructuración genética entre las almejas de Bahía Magdalena y las almejas del Golfo de California

4.4 Objetivo general

Evaluar la presencia y diversidad genética de *Panopea globosa* en la laguna costera de Bahía Magdalena, BCS, México

4.4.1. Objetivos específicos

- Esclarecer la distribución de *Panopea globosa* en el Pacífico nororiental, evaluando su presencia en Bahía Magdalena.
- Evaluar su estado de especie endémica del Golfo de California
- Cuantificar la diversidad genética mitocondrial de *P. globosa*
- Evaluar la divergencia genética poblacional entre una localidad del Pacífico (Bahía Magdalena) y localidades del Golfo de California (Puerto Peñasco, San Felipe)

4.5. Materiales y métodos

4.5.1. Área de estudio

Bahía Magdalena representa la zona central del complejo lagunar de Bahía Magdalena-Bahía Almejas (Figura 11), está comunicada con el mar abierto a través de una amplia boca de acceso de 5.6 km de ancho con 40 m de profundidad máxima, a partir de esa boca se extiende un canal de navegación con profundidades entre 15-30 m (Sanchez Montate et al. 2007). El promedio de la temperatura superficial del mar va desde 20.3 °C en marzo, el mes más frío, hasta 26.9 °C en septiembre, siendo el mes más cálido (Lluch Belda et al. 2000). El área oceánica adyacente a la bahía es una zona típica de surgencia durante casi todo el año, donde los nutrientes son introducidos al sistema por medio del transporte vertical de surgencia y el transporte horizontal por intensas corrientes de marea (Zaitsey et al 2003).

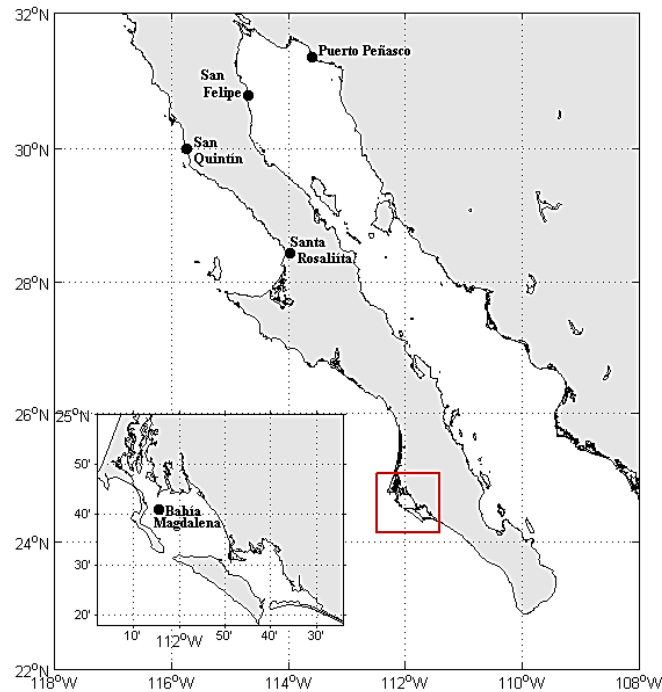


Figura 11. Área de estudio, mostrando Bahía Magdalena, Santa Rosalita, San Quintín, San Felipe y Puerto Peñasco.

4.5.2 Colección de muestras

Almejas de Sifón de Cortés ($n = 32$) fueron colectadas de la captura comercial que se realiza al interior de la laguna de Bahía Magdalena ($24^{\circ}37' N$) en Febrero del 2011. El tejido muscular (sifón) fue cortado, conservado en etanol al 96% y mantenido a temperatura ambiente hasta su posterior análisis de laboratorio. Con fines comparativos, en el análisis de PCR-RFLPs se analizaron organismos de referencia de *Panopea generosa* ($n = 8$) colectados en Santa Rosalita (costa Pacífico de Baja California), y de *Panopea globosa* ($n = 7$) colectados en San Felipe (Alto Golfo de California). Para el análisis del ADN mitocondrial (COI), se utilizaron 18 organismos *Panopea spp.* provenientes de Bahía Magdalena, y organismos de *P. globosa* colectados en San Felipe ($n=10$) y Puerto Peñasco ($n=9$), para fines comparativos, se colectaron organismos de *P. generosa* de Santa Rosalita ($n=20$) y de San Quintín ($n=20$).

4.5.3 Extracción de ADN

El ADN fue extraído usando el protocolo de Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, CA) (Walsh et al. 1991) el proceso consistió en una digestión de 0.1 g de tejido muscular con la enzima proteínasa K. Primeramente, el tejido se incubó a 55 °C por 1 hora en 400 µl de Chelex 100 al 10% y 7 µl de proteína K (25ml/g) posteriormente la enzima fue desactivada a 95 °C por 20 minutos

4.5.4 PCR-RFLP

Se amplificó ADN ribosomal nuclear (ITS) de las almejas de Bahía Magdalena y de los organismos de referencia. Se utilizaron los primers ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC- 3') e ITS5 (5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3) (White et al. 1990). Las reacciones de PCR con un volumen final de 25 µl contenían 0.2 mM dNTPs, 1X PCR buffer (10mM TrisHCl, 50mM KCl, y 1.5 mM MgCl₂), 0.4 µM cada primer, 1 U Taq DNAPol (New England Biolabs, Ipswich, MA), y 2 µL ADN extraído (aproximadamente 50–100 ng). Las condiciones de los ciclos del termociclador fueron 1 min en 94 °C, seguido de 36 ciclos de 1 min en 94°C, 1min en 55°C, y 2 min en 72°C, con una extensión final de 10 min at 72 °C. La calidad y cantidad del producto de PCR fue evaluada en un gel de agarosa (1.5%) posteriormente este gel fue teñido con Bromuro de etidio (0.5 mg/mL). Para los RFLPs se utilizó una sola enzima (*Rsa* I), con la cual se obtuvieron patrones de bandas fácilmente distinguibles para cada especie (*P. generosa* y *P. globosa*). Los patrones de bandeo del PCR-RFLP fueron analizados en un gel de agarosa (2%) teñido con bromuro de etidio (0.5 mg/mL).

4.5.5. ADN mitocondrial

Se amplificó la región Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) en 18 individuos de Bahía Magdalena, 19 individuos referencia de *P. globosa* y 40 individuos referencia de *P. generosa*, con los primers LCOI (5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') and HCOI (5'- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3) (Folmer et al. 1994). Las reacciones de PCR (volumen final 25µl) contenían 0.18mM dNTPs, 1X PCR

(Tris 10mM, KCl 50mM, 1.5mM MgCl₂), 0.4μM de cada cebador y 1U *Taq* (New England Biolabs, Ipswich, MA) y 2 μl de ADN genómico (25-100 ng). Las condiciones de termociclado fueron 2 min a 94°C, 35 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 35°C, y 1.5 min a 72°C, seguido de una extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR fueron purificados utilizando columnas QIAquick PCR Purification Kit, de acuerdo al protocolo del fabricante (QUIAGEN Inc., Valencia CA). Para verificar la calidad y cantidad de producto de PCR, se realizó un gel de agarosa al 1.5 % a 95 V durante 45 min. Posteriormente, los productos fueron secuenciados en el laboratorio de Langebio (Cinvestav, Irapuato.) en un secuenciador ABI 3730 usando protocolos del fabricante.

4.5.5.1. Análisis de datos

Las secuencias de ADN mitocondrial fueron verificadas usando el programa Codon Code Aligner v3.7.1 (Codon Code Corporation, Dedham, MA, USA) antes de ser alineados con el programa MEGA v 5.05 (Tamura et al. 2011). El mismo programa fue usado para reconstruir un árbol filogenético de Neighbor-Joining usando el modelo de dos parámetros de Kimura (K2P, Kimura 1981) cuya topología se evaluó mediante bootstrap no paramétrico con 1000 pseudo réplicas. El cálculo de la diversidad haplotípica y nucleotídica fue realizado con la ayuda de los programas de DNAsp (Librado y Rozas, 2009) y Arlequin v3.5.1.2 (Excoffier et al., 2005). Este último programa fue utilizado para realizar un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para determinar la varianza genética dentro y entre Bahía Magdalena y el Golfo de California. La significancia para todas las pruebas múltiples se fijó en 0.05, con la corrección de Bonferroni (Rice 1989).

4.6. Resultados

4.6.1. PCR-RFLP

Todas las almejas colectadas en Bahía Magdalena produjeron el mismo patrón de bandeo de PCR-RFLP. Al comparar estos individuos con los organismos de referencia de *P. generosa* y *P. globosa*, se detectó que el patrón de RFLP de las almejas de Bahía Magdalena fue igual al encontrado en *P. globosa* de San Felipe y claramente distinto al encontrado en *P. generosa* de Santa Rosalía (Figura 12).

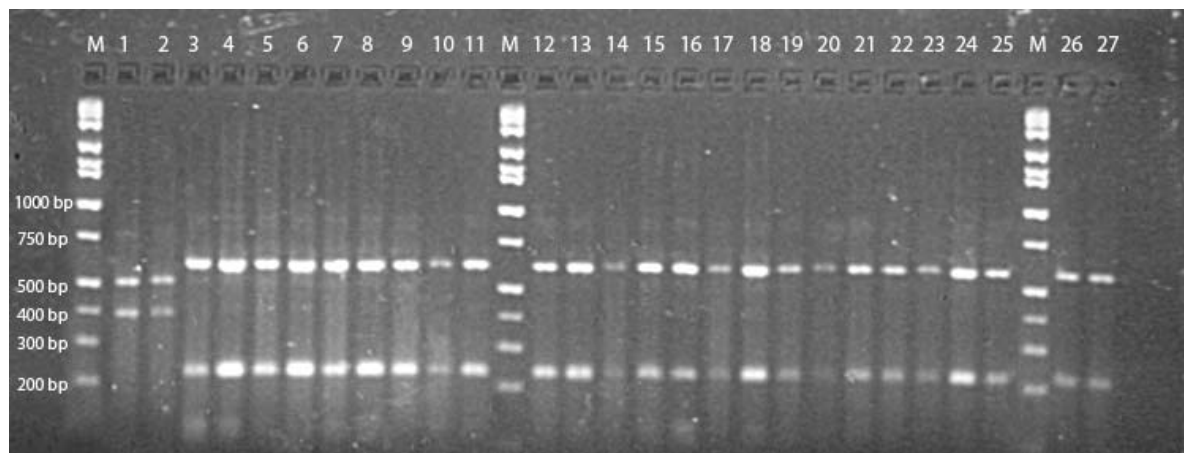


Figura 12. Patrón de bandeo PCR-RFLP con la digestión enzimática *RsaI* del ADNr para individuos de *Panopea* sp. de Bahía Magdalena (carriles 3-19 y 22-27); *P. generosa* (carril 1 y 2) y *P. globosa* (carril 20 y 21) en un gel de agarosa al 2%. El carril M se refiere a un marcador estándar (50-10000 pb ladder)

4.6.2. Citocromo Oxidasa I

En el análisis del ADN mitocondrial se obtuvieron 5 haplotipos de los 18 individuos de Bahía Magdalena, los cuales se agruparon en el árbol filogenético con ocho haplotipos ortólogos de *P. globosa* del Alto Golfo de California (n=19). Un haplotipo predominante se encontró en el 66% (n=37) de las almejas y fue compartido por las tres localidades. Los 13 haplotipos de *P. globosa* fueron muy divergentes (distancia p=0.18) de los 11 haplotipos de *P. generosa* de la costa Pacífico de Baja California (n=40) (Figura 13).

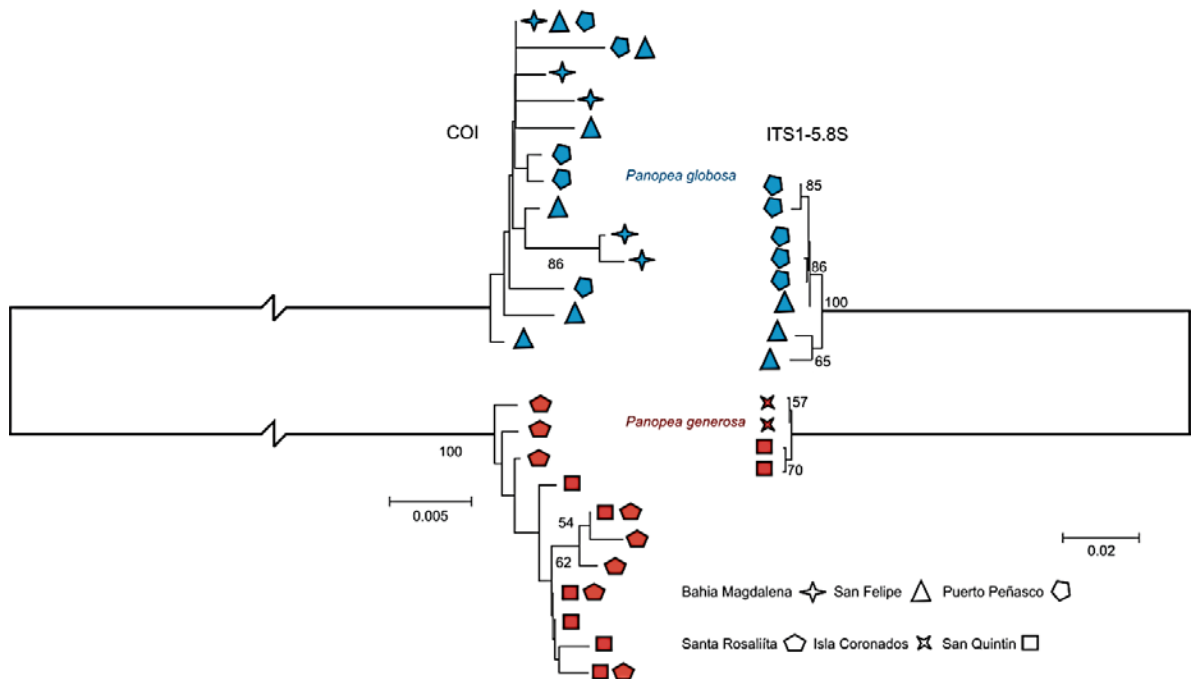


Figura 13. Árbol filogenético Neighbor-joining basado en distancia Kimura 2-parametros de ADNmt COI y secuencias de ADNr de almejas de sifón mexicanas. El árbol nuclear es modificado de Rocha Olivares et al. (2010), p.333.

4.6.3. Diversidad genética

En el cálculo de la diversidad genética, para *P. globosa* obtuvimos una diversidad haplotípica con un valor de 0.62 ± 0.094 , y una diversidad nucleotídica con valor de 0.0027 ± 0.002 para todas las poblaciones.

Tabla 14. Índices de diversidad genética encontrados en COI para *P. globosa*. n, número de individuos; A, número de haplotipos; h, diversidad haplotípica; π , diversidad nucleotídica.

Citocromo Oxidasa I				
Localidad	n	A	h	π
Bahía Magdalena	18	5	0.48 ± 0.14	0.0024 ± 0.002
Puerto Peñasco	9	5	0.72 ± 0.16	0.0027 ± 0.003
San Felipe	10	6	0.78 ± 0.14	0.0032 ± 0.002
Promedio/total	37	13	0.62 ± 0.094	0.0027 ± 0.002

4.6.4 Estructura genética poblacional

El ADN mitocondrial no mostró evidencia de estructura genética significativa entre Bahía Magdalena y el Golfo de California, teniendo valores de Φ_{ST} de 0.047 ($p=0.06$). Con el fin de determinar el grado de diferenciación entre localidades, se calcularon los índices de fijación pareados para COI (Tabla 15). Dicho análisis corroboró que ninguna localidad se encuentra diferenciada genéticamente de forma significativa, a excepción de la comparación entre Bahía Magdalena vs Puerto Peñasco que fue significativa individualmente ($\Phi_{ST}=0.053$, $p=0.041$), pero no después de hacer la corrección de Bonferroni.

Tabla 15. Valores de Φ_{st} pareados para la región de COI (bajo la diagonal) y sus niveles de significancia (sobre la diagonal).

	Bahía Magdalena	Puerto Peñasco	San Felipe
Bahía Magdalena	-	0.0411	0.07891
Puerto Peñasco	0.053	-	0.62973
San Felipe	0.038	-0.034	-

4.7. Discusión

Los resultados obtenidos en los PCR-RFLP y en el análisis de COI muestran claramente que los especímenes de *Panopea* sp. colectados en Bahía Magdalena son *Panopea globosa*. Esta evidencia permite extender el rango de distribución geográfica a las zonas exteriores del Golfo de California, a esta nueva latitud (24°37' N). La presencia de *P. generosa* en esta localidad aun no ha sido examinada, por lo cual se requiere de un mayor esfuerzo de muestreo en un área más amplia para establecer si ambas especies, la almeja de sifón del Pacífico y la almeja de sifón de Cortés, podrían ocupar simultáneamente Bahía Magdalena. De ser así, esto podría explicar la confusión que se ha generado sobre la identidad taxonómica de la o las especies del género *Panopea* que habitan en esta localidad. Los resultados del análisis filogenético corroboran la alta divergencia genética entre la especie *P. globosa* y *P. generosa*, previamente reportada en Rocha Olivares et al. 2010 con el uso de ADNr (ITS1-5.8S) (Figura 13) y con lo reportado por Leyva Valencia, (2012) con el uso de un gen mitocondrial (COI) y dos genes nucleares: 28S y 18S.

Por otra parte, una de las razones por las cuales se creía que *P. globosa* no podía habitar Bahía Magdalena es que este sitio posee un hábitat distinto al del Golfo de California. Esta Bahía es considerada una zona de transición biogeográfica entre aguas tropicales y templadas (García Rodríguez and Pérez Enriquez, 2006), mostrando una gran variabilidad espacio-temporal en sus condiciones oceanográficas. Esta región es influenciada por las aguas de dos corrientes: la Corriente de California que fluye de norte a sur trayendo aguas con bajas temperaturas y salinidad, y aguas ricas en oxígeno y nutrientes, y por la Corriente Costera Mexicana, que fluye de sur a norte y aporta aguas con altas temperaturas y salinidad y con aguas pobres en nutrientes (Lavin et al. 1997; Badan 1997). Las aguas poco profundas y protegidas del complejo Bahía Magdalena-Almejas, suelen ser también más cálidas, más estables, y más productivas que las aguas de alta mar adyacentes (Bizarro 2008). Por otro lado, las condiciones del hábitat en el Golfo de California están dominadas por las corrientes de marea, surgencias, elevado calentamiento solar, y la presencia fenómenos de mesoescala, como remolinos ciclónicos (Álvarez Borrego 2010). Con base en lo anterior, Suárez Moo et al. (en prensa) modelaron

el nicho de *P. globosa* utilizando el programa MAXENT (Philips et al 2006) determinando la distribución geográfica del hábitat más adecuado para *P. globosa* con base en variables medio ambientales. Los resultados de dicho análisis indican que el hábitat de la almeja de sifón de Cortés está restringido al Golfo de California, en las aguas poco profundas y áreas productivas de esta región, encontrándose la mayor probabilidad de ocurrencia en la zona del Alto Golfo y la costa sur del estado de Sonora. En contraste, determinan que la probabilidad de ocurrencia de la especie en Bahía Magdalena es muy baja, quizás debido a la baja concentración de nutrientes. Los resultados anteriores, no concuerdan con la presencia de *P. globosa* en Bahía Magdalena, ya que el modelo sugiere que las condiciones actuales no son apropiadas para la supervivencia de *P. globosa* en la costa oeste de Baja California. Sin embargo, los autores mencionan que quizás haya que tomar en cuenta la biogeografía histórica de la región, sugiriendo que los cambios oceanográficos del Mioceno y Pleistoceno, así como los cambios climáticos del Pleisto y Holoceno quizás hayan favorecido la presencia de *P. globosa* en ambas costas de la península de Baja California. En consecuencia, la presencia de una población de *P. globosa* en Bahía Magdalena, que presenta características del hábitat muy distintas a la de otras poblaciones en el Golfo de California, puede parecer paradójico. Aunado a esto, es necesario mencionar que las diferencias del hábitat pueden promover diferencias fenotípicas. En efecto, Suárez Moo et al. (en prensa) muestran que la relación longitud-altura de la concha de individuos de *P. globosa* de Bahía Magdalena es mayor que la de las almejas del Golfo de California, por lo que surge la duda si esta distinción ha sido el origen de la confusión acerca de la identidad de las almejas de sifón de esta localidad. Estas diferencias morfológicas en *P. globosa* de Bahía Magdalena, también fueron reportadas por Leyva Valencia, (2012), encontrando que las almejas de sifón de Cortés de esta región, poseen conchas más elongadas y un seno palial más corto que sus co-específicas del Golfo de California.

Se ha sugerido que la población de Bahía Magdalena de *P. globosa* se encuentra diferenciada genéticamente respecto a las del Golfo de California (Pérez Valencia, 2011). Sin embargo, las secuencias de COI revelaron un marginal y no significativo 4.7% ($\Phi_{ST}=0.047$, $p=0.06$) de la varianza, el cual fue repartido entre regiones (Pacífico vs Golfo

de California), mientras que 95.3% de la varianza genética fue encontrado dentro de ellas. Estos resultados coinciden con los reportados en Pérez Valencia (2011) el cual no encontró diferenciación genética entre almejas del Pacífico (Bahía Magdalena) y del Golfo de California (San Felipe, Puerto Peñasco, Guaymas) con el uso de 2 loci microsaturales. Sin embargo, la varianza en estos loci nucleares revelan pequeña (<4%) pero significativa diferenciación pareada entre Bahía Magdalena y San Felipe, y entre Bahía Magdalena y Puerto Peñasco. Nuestros datos de COI revelan niveles comparables pero no significativos de esta diferenciación pareada. La diferenciación genética de las almejas de Bahía Magdalena de sus conspecíficos en el Golfo de California necesita ser mejor evaluada. Los datos genéticos disponibles de la especie, incluyendo a los de Pérez Valencia, (2011), apuntan a una diferenciación superficial entre las almejas de estas regiones. Sin embargo, argumentamos que los datos disponibles no tienen el suficiente poder estadístico para resolver la pregunta de forma fiable en cuanto a términos del número de loci analizados y en términos de los niveles de polimorfismo. Por otra parte, es posible que la madurez tardía y el ciclo de vida prolongado de *P. globosa* (Aragón Noriega et al. 2007, Calderón Aguilera et al., 2010) favorezcan un “efecto de almacenamiento genético” (Ellner & Hairston, 1994). Por lo tanto, las almejas de Bahía Magdalena posiblemente no han divergido lo suficiente como para ser genéticamente distinguibles de las que viven en el interior del Golfo de California. Sin embargo, suponemos que la coincidencia de nuestros resultados genéticos, con otros reportes genéticos (Pérez Valencia, 2011), ecológicos y morfométricos (Leyva Valencia, 2012, Leyva Valencia et al. 2012; Suárez Moo et al., en prensa), relacionados con la diferenciación de las almejas del Pacífico y las del golfo sugieren altos niveles de adaptación local, lo que implica que quizás no existe un frecuente (o continuo) y exitoso intercambio larval entre Bahía Magdalena y las poblaciones del Golfo de California, dejando a las primeras aisladas del resto. Relacionado a lo anterior, la expansión hacia los polos de las aguas subtropicales durante el calentamiento interglaciar durante el holoceno quizás actuó como una barrera ecológica que permitió aislar las poblaciones de la costa este y oeste de Baja California, produciendo distribuciones disjuntas también presentes en otros taxa (Terry et al. 2000; Stepien et al. 2001; Bernardi et al. 2003; Rocha Olivares et al. 2003).

5. Discusión general

El presente estudio es el primero que analiza la estructura genética de *P. generosa* en la mayor parte de su distribución natural, analizando poblaciones desde Alden Bank, Washington, EUA, hasta Baja California, México. Además, representa uno de los pocos reportes de diversidad y estructura genética en bivalvos que emplean el uso de información tanto mitocondrial como nuclear. Consideramos que la utilización de diferentes tipos de marcadores con distintas tasas de mutación permite distinguir fenómenos recientes de los históricos. Con los microsatélites se puede cuantificar un flujo genético reciente y con el ADN mitocondrial se tiene un mayor rango de inferencia genética del orden de miles a millones de años (Crandall et al. 2000). De igual forma, nuestro trabajo es uno de los primeros reportes que evalúa la diversidad, y el primero que evalúa la estructura genética en poblaciones mexicanas de *P. generosa*, lo cual contribuye a la generación del conocimiento de la biología y genética de este importante recurso.

En el presente estudio, encontramos para *Panopea generosa* valores moderados y altos de diversidad genética en los marcadores mitocondriales y nucleares, respectivamente. Encontrado que la diversidad genética de *P. generosa* es similar a lo reportado en otras especies de bivalvos, y para el caso de los microsatélites los valores son similares a los reportados en trabajos previos en *P. generosa*. Los altos valores de diversidad genética en la almeja de sifón, la atribuimos a las características de la historia de vida de la especie, principalmente alta fecundidad, tiempo de duración de la larva en el ambiente pelágico, longevidad, así como tamaños efectivos poblacionales grandes. En cuanto a la carencia de estructura genética poblacional a lo largo del Pacífico nororiental, consideramos que esto es el resultado de la suma de distintos procesos: las características de la historia de vida, procesos ecológicos, así como un flujo genético histórico y reciente, considerando que a lo largo de la zona de estudio no existe barreras ante el flujo genético.

Por otra parte, mediante el uso de secuencias del ADNmt (gen COI) y RFLPs (región ITS del ADNr) determinamos que la especie del género *Panopea* que se encuentra presente en Bahía Magdalena es *P. globosa*, con lo cual nosotros sugerimos extender el rango de distribución de *P. globosa* a zonas exteriores del Golfo de California,

contradiendo el estado de especie endémica al Golfo de California (Keen 1971; Hendickx et al. 2005; Arambula Pujol et al. 2008; Rocha Olivares et al. 2010). Además, analizamos las consecuencias ecológicas y evolutivas de la población de almejas de Bahía Magdalena que habita en el límite de su distribución de forma presuntamente disjunta y aislada de las poblaciones del Golfo de California.

6. Perspectivas para el manejo

Para un mejor entendimiento de la diversidad y estructura genética poblacional de *P. generosa* a lo largo del Pacífico nororiental, estamos en proceso de utilizar un mayor número de loci así como incrementar el tamaño de muestra, y sugerimos la posibilidad de obtener datos de las poblaciones intermedias, las cuales hasta ahora el nivel de la diversidad genética y de la estructura genética poblacional permanece desconocido. Para el caso de *P. globosa* estamos en proceso del análisis de un mayor número de secuencias de COI, tanto de Bahía Magdalena como de poblaciones del Golfo de California, con el objetivo de una mejor caracterización de la diversidad genética de estas poblaciones mexicanas.

La caracterización de la diversidad genética de *P. generosa* en poblaciones naturales de México y la distinción de *P. globosa* en Bahía Magdalena ayuda a sentar las bases para posibles manejos adecuados del recurso, con el fin de salvaguardar su diversidad. Para *P. generosa* reportamos una alta diversidad genética en la población de Washington y en las tres poblaciones de México, no habiendo diferencias significativas entre ellas. Aunado a esto, los resultados de Calderón Aguilera et al. (2010), apuntan a respuestas fenotípicas poblacionales similares entre las poblaciones de Baja California y las de Washington y Columbia Británica en cuanto tasas de crecimiento y de mortalidad. Esto es consistente con los resultados genéticos de este trabajo que indican la presencia de una sola unidad de manejo a lo largo del Pacífico nororiental. La existencia de una sola unidad de manejo de *P. generosa* a lo largo del Pacífico nororiental hace más relevante la existencia de esfuerzos coordinados de manejo a lo largo de su ámbito de distribución ya que es un recurso compartido entre Canadá, Estados Unidos y México, con el fin de

conservar los altos niveles de diversidad genética que se reportan en el presente estudio para poblaciones de *P. generosa* a lo largo del Pacífico nororiental.

Ante el manejo del recurso de la almeja de sifón, sugerimos considerar tanto información genética como aspectos biológicos. El control de las cuotas de pesca anuales deben estar acordes a las tasas de reposición natural, así como al tamaño efectivo poblacional, mismo que puede ser estimado con la información genética, además hay que tomar en cuenta que el reclutamiento es esporádico y lento (Goodwin y Bradbury, 2001). En el manejo de este recurso se debe considerar información a diferentes escalas de tiempo, con el fin de saber si la percepción que se tiene sobre los stocks como estables y la pesquería como sustentable, es efecto de un desajuste entre una dinámica lenta (debida a su longevidad) y una percepción a corto tiempo (Orensanz et al. 2004). Para planes futuros de cultivo en la región intermareal de *P. generosa* y de *P. globosa* en México, debe tenerse cuidado con la elección de los organismos parentales con el fin de evitar posibles entrecruzamientos entre consanguíneos que lleve a efectos de la depresión endogámica. La información aquí generada podría servir de bases para futuros estudios del estado de la diversidad genética en las poblaciones mexicanas, ya una vez establecidos estos cultivos en la intermareal, ya que estos cultivos estarían aportando larvas a las poblaciones naturales.

Por otra parte, la identificación de *P. globosa* en zonas exteriores del Golfo de California, permite dar certidumbre a la identidad de las almejas que se explotan ahí y establecer el límite de la distribución de la especie. Esta distinción con *P. generosa* debe incorporarse en los planes de manejo del recurso así como estudios de la biología, biología pesquera y genética.

7. Referencias bibliograficas

- Addison, J., Ort, B., Mesa, K. and Pogson, G. (2008). Range-wide genetic homogeneity in the California sea mussel (*Mytilus californianus*): a comparison of allozymes, nuclear DNA markers, and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology*, 17, 4222–4232.
- Alvarez Borrego, S. (2010). Physical, chemical, and biological oceanography of the Gulf of California. In Brusca R.C. (ed) *The Gulf of California: biodiversity and conservation*. Tucson. AZ: University of Arizona Press.
- An, H.S., Jee, Y., Park, D.W., Ryu H.Y., Min, K.S. (2000). Genetic variation in populations of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*), based on the mitochondrial COI gene sequence. *Korean Journal Genetics*, 22, 249–255.
- Apte, S. and Gardner, J. (2001). Absence of population genetic differentiation in the New Zealand greenshell mussel *Perna canaliculus* (Gmelin 1791) as assessed by allozyme variation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 258, 173-194.
- Aragón Noriega, E.A., Chávez Villalba, J., Gribben, P.E., Alcántara Razo E., Maeda Martínez A.N., Arambula Pujol E.M., García Juárez A.R., and Maldonado Amparo, R. (2007) Morphometric relationships, gametogenic development and spawning of the geoduck clam *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) in the Central Gulf of California. *Journal of Shellfish Research*, 26, 423–431.
- Aragón Noriega, A., Alcántara Razo E., Calderón Aguilera, L.E. and Sanchez Fourcade, R. (2012). Status of Geoduck Clam Fisheries in Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 31(3), 733-738.
- Arambula Pujol, E.M., García Juárez, A.R., Alcántara Razo, E. and Aragón Noriega, E.A. (2008). Aspects of reproductive biology of the geoduck clam *Panopea globosa* (Dall 1898) in the Gulf of California. *Hidrobiológica*, 18, 89-98.
- Arias, A., Fernández Moreno, M., Fernández Tajés, J., Gaspar, M., Méndez J. (2011). Strong genetic differentiation among east Atlantic populations of the sword razor shell (*Ensis siliqua*) assessed with mtDNA and RAPD markers. *Helgoland Marine Research*, 65, 81–89.
- Arnaud Huvet, S., Lapeque, A., Magoulas, P., Boudry. (2000). Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Conservation Genetics*, 1, 251-262.
- Arnaud Haond, S., Monteforte, M., Galtier, N., Bonhomme1, F., & Blanc, F. (2000). Population structure and genetic variability of pearl oyster *Pinctada mazatlanica* along Pacific coasts from Mexico to Panama. *Conservation Genetics*, 1, 299–307.

- Arnaud Haond, S., Bonhomme, F., and Blanc, F. (2003a). Large discrepancies in differentiation of allozymes, nuclear and mitochondrial DNA loci in recently founded Pacific populations of the pearl oyster *Pinctada margaritifera*. *Journal Evolutionary Biology*, 16, 388–398.
- Arnaud Haond, S., Monteforte, M., Blanc, F., and Bonhomme, F. (2003b). Evidence for male-biased effective sex ratio and recent step-by-step colonization in the bivalve *Pinctada mazatlanica*. *Journal Evolutionary Biology*, 16 (5), 790–796.
- Avise, J. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman y Hall. Londres.
- Azofeifa, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 17(2), 221-242.
- Badán, A. (1997). La corriente costera de Costa Rica en el Pacífico mexicano. In: M.F. Lavin (ed.) *Contribuciones a la oceanografía física en México*. Monografía 3. Unión Geofísica Mexicana, México, D.F.
- Baums, I.B. and Paris, C.B. (2006). A bio-oceanographic filter to larval dispersal in a reef-building coral. *Limnology and Oceanography*, 51(5), 1969–1981.
- Baums, I.B., Miller, M.W., Hellberg, M.E. (2005). Regionally isolated populations of an imperiled Caribbean coral, *Acropora palmate*. *Molecular Ecology*, 14, 1377–1390.
- Beattie, J.H. (1992). Geoduck enhancement in Washington State. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*, 92, 18-24.
- Beaumont, A., Truebano Garcia, M., Höng, S., & Low, P. (2006). Genetics of Scottish populations of the native oyster, *Ostrea edulis*: gene flow, human intervention and conservation. *Aquatic Living Resources*, 19, 389-402.
- Beerli, P. and Felsenstein, J. (1999) Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, 152, 763-773.
- Benzie, J., Smith Keune, C. (2006). Microsatellite variation in Australian and Indonesian pearl oyster *Pinctada maxima* populations. *Marine Ecology Progress Series*, 314, 197–211.
- Bernard, F.R., Cai, Y.Y., and Morton, B. (1993). *Catalogue of the living marine bivalve molluscs of China*, Hong Kong. Hong Kong University Press.
- Bernardi, G., Findley, L., Rocha Olivares, A. (2003). Vicariance and dispersal across Baja California in disjunct marine fish populations. *Evolution*, 57, 1599-1609.

- Bizarro, J.J. (2008) A review of the physical and biological characteristics of the Bahía Magdalena Lagoon Complex (Baja California Sur, Mexico). *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*, 107(1), 1-24.
- Bohonak, A. (1999). Dispersal, Gene Flow, and Population Structure. *The Quarterly Review of Biology*, 74(1), 21-45.
- Bradbury, A., Sizemore, B., Rothaus, D., Ulrich M. (2000) Stock Assessment of Subtidal Geoduck Clams (*Panopea abrupta*) in Washington. Marine Resources, Unit Fish Management Division, Fish Program. EUA.
- Bureau, D., Hajas, W., Surry, N.W., Hand, C.M., Dovey, G., and Campbell, A. (2002). Age, size structure, and growth parameters of Geoducks (*Panopea abrupta* Conrad, 1849) from 34 locations in British Columbia sampled between 1993 and 2000. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* 2413. Nanaimo, BC. Fisheries and Oceans Canada.
- Burton, R.S. (1998). Intraspecific phylogeography across the Point Conception biogeographic boundary. *Evolution*, 52, 734–745.
- Calderón Aguilera, L.E. (2009). Programa de investigación para el seguimiento de la pesquería de almeja generosa (*Panopea spp*) Prospección y evaluación de nuevas áreas de aprovechamiento. Inf. Final. SAGARPA – CONAPESCA.
- Calderón Aguilera, L.E., Aragón Noriega, E.A., Hand, C.M., and Moreno Rivera, V.M. (2010). Morphometric Relationships, Age, Growth, and Mortality of the Geoduck Clam, *Panopea generosa*, Along the Pacific Coast of Baja California, Mexico. *Journal of Shellfish Research*, 29(2), 319-326.
- Calderón Aguilera, L.E., Aragón Noriega, E.A., Reyes Bonilla, H., Paniagua Chávez, C.G., Romo Curiel, A.E., and Moreno Rivera, V.M. (2010b) Reproduction of the Cortes geoduck *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) and its relationship with temperature and ocean productivity. *Journal of Shellfish Research*, 29, 135-141.
- Campbell, A., and Ming, M. (2003). Maturity and growth of the pacific Geoduck clam, *Panopea abrupta*, in southern British Columbia, Canada. *Journal of Shellfish Research*, 22(1), 85-90.
- Campbell, A., Yeung, G., Zhang, Z. (2004). Population biology of the pacific Geoduck clam, *Panopea abrupta*, In experimental plots, Southern British Columbia, Canada, *Journal of Shellfish Research*, 23(3), 661-673.
- Castro, J., Picornell, A., Ramon, M. (1998). Mitochondrial DNA: a tool for population genetic studies. *International Microbiology*, 1, 327-332.

- Casu, M., Maltagliati, F., Cossu, P., Lai, T., Galletti, M., Castelli, A. (2005). Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from Maine and Virginia (USA), as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 325, 46–54.
- Chase, M., Etter, R., Rex, M., Quattro, J. (1998). Bathymetric patterns of genetic variation in a deep-sea protobranch bivalve, *Deminucula atacellana*. *Marine Biology*, 131, 301-308.
- Cho, E.S., Jung C.G., Sohn, S.G., Kim, C.W., Han, S.J. (2007). Population Genetic Structure of the Ark Shell *Scapharca broughtonii* Schrenck from Korea, China, and Russia Based on COI Gene Sequences. *Marine Biotechnology*, 9, 203–216.
- Coan, E.V., Scott, P.H., and Bernard, F.R. (2000). Bivalve seashells of western North America. Santa Barbara Museum of Natural History Publication, Santa Barbara.
- Cortez Lucero, G., Arreola Lizarraga, J. A., Chavez Villalba, J. & Aragon Noriega, E. A. (2011). Edad, crecimiento y mortalidad de la almeja de sifón, *Panopea globosa* (Bivalvia: Hiatellidae) en la regio´ n central del Golfo de California, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 46, 453–462.
- Crandall, K., Bininda Emonds, O., Mace, G., Wayne R. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15 (7), 290-295.
- Crivello, J.F., Landers D.F., keser M. (2005). The genetic stock structure of the American lobster (*Homarus americanus*) in long island sound and the Hudson canyon. *Journal of Shellfish Research*, 24(3), 841-848.
- Crowe, F.J., Schwartzlose, R.A., (1972). Release and Recovery Records of Drift Bottles in the California Region, 1955 Through 1971. California Cooperative Oceanic Fisheries Atlas, Vol. 16. Marine Research Committee, State of California.
- Cruz Vásquez, R., Rodríguez Domínguez, G., Alcantara Razo, E., and Aragon Noriega, A. (2012). Estimation of individual growth parameters of the Cortes geoduck *Panopea globosa* from the central Gulf of California using a multimodel approach. *Journal of Shellfish Research*, 31(3), 725-732.
- Dawson, M.N. (2001). Phylogeography in coastal marine animals: a solution from California?. *Journal of Biogeography*, 28, 723-736.
- Debenham P., Brzezinski M., Foltz K., Gaines S. (2000) Genetic structure of populations of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 253, 49–62.
- Diario Oficial de la Federación, 2012. Plan de Manejo para la Pesquería de Almeja Generosa (*Panopea spp.*) en las costas de Baja California, México. INAPESCA.

Diaz Almela, E., Boudry, P., Launey, F., Bonhomme, F., and Lapegue, S. (2004). Reduced Female Gene Flow in the European Flat Oyster *Ostrea edulis*. *Journal of Heredity*, 95(6), 510-516.

Ellner S. and Hairston N.G. (1994) Role of overlapping generations in maintaining genetic-variation in a fluctuating environment. *American Naturalist*, 143(3), 403- 417.

Excoffier, L., Laval, G., and Schneider S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.

Feldman, K., Vadopalas, B., Amstrong, D., Friedman, C., Hilborn, R., Naish, K., Orensanz, J., y Valero, J. (2004). Comprehensive literature review and synopsis of issues relating to geoduck (*Panopea abrupta*) ecology and aquaculture production. Washington State Department of Natural Resources. EUA.

Felsenstein, J.(2009). PHYLIP, Phylogeny inference Package, version 3.69. Department of Genome Sciences and Department of Biology. University of Washington.

Ferreira, M., y Grattapaglia, E. (1998). *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*, editorial EMBRAPA-CENARGEN. Brasil.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R.C. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.

Funes Rodriguez, R., González Armas, R., Avendaño Ibarra, R.(1998). Distribución y abundancia de las larvas de peces en el sistema lagunar de Bahía Magdalena-Almejas, Baja California Sur, México. *Hidrobiológica*, 8(1), 55-66.

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

Garcia Rodriguez, F.J., and Perez Enriquez, R. (2006). Genetic differentiation of the California spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) along the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Marine Biology*, 148(3), 621-629.

Glickman, T.S. (1999). Glossary of meteorology, 2nd edn. American Meteorological Society, Cambridge.

Goodwin, C.L. (1976). Observations of spawnings and growth of subtidal Geoducks (*Panopea generosa*). *Proceedings of the National Shellfisheries Association*, 65, 49-58.

Goodwin, C.L., and Pease, B.C. (1991). Geoduck, *Panopea abrupta* (Conrad, 1849), size, density, and quality as related to various environmental parameters in Puget Sound, Washington. *Journal of Shellfish Research*, 10, 65-77.

Goodwin, C.L., Shaul, W., and Budd, C. (1979). Larval development of the Geoduck clam (*P. generosa*). *Proceedings of the National Shellfisheries Association*, 6, 73-76.

Goodwin, L. and Bradbury, A. (2001). Supplementary environment impact statement, State of Washington Commercial Geoduck Fishery, appendix 2: The time between successive crops (recovery time) of subtidal geoducks (*Panopea abrupta*) in Puget Sound, Washington. Washington Department of Natural Resources, Olympia.

Goodwin, L. y Bradbury, A. (2001). Supplementary environment impact statement, State of Washington Commercial Geoduck Fishery, appendix 2: The time between successive crops (recovery time) of subtidal geoducks (*Panopea abrupta*) in Puget Sound, Washington. Washington Department of Natural Resources, Olympia.

Goodwin, L.C. and Pease, B. (1989). Species Profiles: Life Histories and Environmental Requirements of Coastal Fishes and Invertebrates (Pacific Northwest) Pacific Geoduck Clam. Biological Report 82 (11.120), U. S. Fish and Wildlife Service. Olympia, Washington.

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

Gruenthal, K.M., Achenson, L.K., Burton, R.S. (2007). Genetic structure of natural populations of California red abalone (*Haliotis rufescens*) using multiple genetic markers. *Marine Biology*, 152, 1237-1248. doi: 10.1007/s00227-007-0771-4.

Gruenthal, K.M., and Burton, R.S. (2008). Genetic structure of natural populations of the California black abalone (*Haliotis cracherodii* Leach, 1814), a candidate for endangered species status. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 355(1), 47-58.

Gwak, W.S., Nakayama, K. (2011). Genetic variation of hatchery and wild stocks of the pearl oyster *Pinctada fucata martensii* (Dunker, 1872), assessed by mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture International*, 19, 585–591.

Harding, G.C., Kenchington, E.L., Bird, C. J., Pezzack, D.S., Landry, D.C. 1997. Genetic relationships among subpopulations of the American lobster (*Homarus americanus*) as revealed by random amplified polymorphic DNA. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(8), 1762-1771.

Hedrick, P.W. (2000). *Genetics of Populations*. Editors. Jones and Bartlett Publishers. Boston.

- Hendickx M.E., Brusca R.C. and Findley L.T. (2005) *A Distributional Checklist of the Macrofauna of the Gulf of California, Mexico. Part I. Invertebrates*. Tucson, AZ: Arizona-Sonora Desert Museum.
- Hernández Trujillo, S., Palomares García, R., López Ibarra, G., Esqueda Escárcega, G., Pacheco Chávez, R. (2004) Riqueza específica de copépodos en Bahía Magdalena, Baja California Sur, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, serie Zoología*, 75(2), 253-270.
- Holland, B.S. (2001) Invasion Without a Bottleneck: Microsatellite Variation in Natural and Invasive Populations of the Brown Mussel *Perna perna* (L). *Marine Biotechnology*, 3, 407–415.
- Holms, S., Witbaard, R., Van der Meers, J. (2003). Phenotypic and genotypic population differentiation in the bivalve mollusk *Arctica islandica*: result from RAPD analysis. *Marine Ecology Progress Series*, 254, 163-176.
- Hui, D., Hou, K. (2007). Low genetic differentiation among widely separated populations of the pearl oyster *Pinctada fucata* as revealed by AFLP. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 333, 140-146.
- Jamison, D., Heggen, R., and Lukes, J. (1984). Underwater video in a regional benthos survey. In *Proceedings of the Pacific Congress on Marine Technology*. Marine Technology Society, Honolulu, Hawaii.
- Joaquim, S., Pereira, J., Leitao, A., Matias, D., Chaves, R., Guedes Pinto, H. (2010). Genetic diversity of two Portuguese populations of the pullet carpet shell *Venerupis senegalensis*, based on RAPD markers: contribution to a sustainable restocking program. *Helgoland Marine Research*, 64, 289-295.
- Johnson, M.P., Allcock, A.L., Pye, S.E., Chambers, S.J. and Fitton, D.M. (2001). The effects of dispersal mode on the spatial distribution patterns of intertidal mollusks. *Journal of Animal Ecology*, 70, 641-649.
- Karp, A., and Edwards, K. (1998). DNA markers: a global overview. In: G. Caetano, P.M. Anollés, eds. *DNA markers: protocols, applications and overviews*. Gresshoff. New York.
- Kaukinen, K.H., Supernault, K.J. & Miller, K.M. (2004). Enrichment of tetranucleotide microsatellite loci from invertebrate species. *Journal Shellfish Research*, 23, 621–626.
- Keen A.M. (1971). *Sea shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California to Peru*. 2nd. Edition ed. Stanford, California: Stanford University Press.
- Kelly, R.P. and Palumbi, S.R. (2010). Genetic Structure Among 50 Species of the Northeastern Pacific Rocky Intertidal Community. *PLoS ONE*, 5(1): e8594.doi:10.1371/journal.pone.0008594

- Khan, A. (2006). Sustainability challenges in the Geoduck clam fishery of British Columbia: Policy perspectives. University of British Columbia Fisheries Centre working paper series no. 2006-19.
- Kimura, M. (1981). Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 454-458.
- Klinbunga, S., Khamnamtong, B., Puanglarp, N., Jarayabhand, P., Yoosukh, W., Menasveta P. (2005). Molecular Taxonomy of Cupped Oysters (*Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand Based on COI, 16S, and 18S rDNA Polymorphism, *Marine Biotechnology*, 7, 306–317. doi: 10.1007/s10126-004-0036-x.
- Kochzius, M. and Nuryanto, A. (2008). Strong genetic population structure in the boring giant clam, *Tridacna crocea*, across the Indo-Malay Archipelago: implications related to evolutionary processes and connectivity. *Molecular Ecology*, 17, 3775–3787. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03803.x.
- Launey, S., Ledu, C., Boudry, P., Bonhomme, F., Naciri-Graven, Y. (2002). Geographic Structure in the European Flat Oyster (*Ostrea edulis* L.) as Revealed by Microsatellite Polymorphism. *Journal of Heredity*, 93, 331-338.
- Lavín, M.F., Beier, F.E., and Badán, A. (1997) Estructura hidrográfica y circulación del Golfo de California: escalas estacional e interanual. In: M. F. Lavín (ed.) *Contribuciones a la oceanografía física en México*, Monografía, Unión Geofísica Mexicana, 141-171.
- Lawton, P. & Lavalli, K.L. (1995). Postlarval, juvenile adolescent, and adult ecology. In: *Biology of the Lobster Homarus americanus* (ed. J.R. Factor) Academic Press, San Diego.
- Lee, S.Y., and Kim, S.H. (2003) Genetic variation and discrimination of Korean *arkshell Scapharca* species (Bivalvia, Arcoida) based on mitochondrial COI gene sequences and RFLP. *Korean Journal Genetics*, 25, 309–315.
- Levinton, J.S., & Suchanek, T.H. (1978) Geographic variation, niche breadth and genetic differentiation at different geographic scales in the mussels *Mytilus californianus* and *M. edulis*. *Marine Biology*, 49, 363-375.
- Lewis, P., Zaykin, D. (2001) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Available from: <http://www.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>
- Leyva Valencia I. (2012). Diferencias morfométricas en dos especies de la almeja generosa: *Panopea generosa* (Gould 1850) y *P. globosa* (Dall 1898) y filogenia molecular de cinco especies del genero *Panopea*. Tesis. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur, México.

- Leyva Valencia, I., Álvarez Castañeda, S.T., Lluch Cota, D.B., González Peláez, S., Pérez Valencia, S., Vadopalas, B., Ramírez Pérez, S. & Cruz Hernández P. (2012) Shell shape differences between two *Panopea* species and phenotypic variation among *P. globosa* at different sites using two geometric morphometrics approaches. *Malacologia*, 55(1), 1-13.
- Librado, P. and Rozas, J. (2009). DNAsp v.5 A software for compressive analysis. *Bioinformatics*, 25, 1451-452.
- Linares, C., Doak, D.F., Coma, R., Diaz, D., and Zabala M. (2007) Life history and viability of a long-lived marine invertebrate: the octocoral *Paramuricea clavata*. *Ecology*, 88(4), 918–928.
- Lind, C.E., Evans, B.S., Taylor, J.J.U., Jerry, D.R. (2007). Population genetics of a marine bivalve, *Pinctada maxima*, throughout the Indo-Australian Archipelago shows differentiation and decreased diversity at range limits. *Molecular Ecology*, 16, 5193–5203.
- Liu, Z. (2007). *Acuaculture Genome technologies*. Blackwell publishing. Iowa.
- Lluch Belda, D., Hernández Rivas, M.E., Saldierna Martínez, R., Guerrero Caballero, R. (2000). Variabilidad de la temperatura superficial del mar en Bahía Magdalena, B.C.S. *Oceanides*, 15(1), 1-23.
- Lynn, R.J., Simpson, J.J. (1987). The California Current system: the seasonal variability of its physical characteristics. *Journal Geophysical Research*, 92, 12947–12966.
- Lynn, R.J., Simpson, J.J. (1990). The flow of the undercurrent over the continental borderland off southern California. *Journal Geophysical Research*, 95, 12995–13008.
- Mariani, S., Ketmaier, V., and Matthaëis, E. (2002). Genetic structuring and gene flow in *Cerastoderma glaucum* (Bivalvia: Cardiidae): evidence from allozyme variation at different geographic scales. *Marine Biology*, 140, 687-697.
- Michinina, S., & Rebordinos, L. (1997). Genetic differentiation in marine and estuarine natural populations of *Crassostrea angulata*. *Marine Ecology Progress Series*, 15, 167–174.
- Miller, K.M., Supernault, K.J., Li, S.R., and Withler, R.E. (2006). Population structure in two marine invertebrate species (*Panopea abrupta* and *Strongylocentrotus franciscanus*) targeted for aquaculture and enhancement in British Columbia. *Journal Shellfish Research*, 25, 33–42.
- Miner, C.M., Altstatt, J.M., Raimondi, P.T., Michonton, T.E. (2006). Recruitment failure and shifts in community structure following mass mortality limit recovery prospects of black abalone. *Marine Ecology Progress Series*, 327, 107-117

- Montaño Perez, K., Villalpando Canchola, E., Vargas Albores, F. (2006). AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) y su aplicación en acuicultura. *Interciencia*, 31, 563-569.
- Morris, R., Abbott, D., and Haderlie, E. (1980). *Intertidal Invertebrates of California*. Stanford University Press, Stanford, California.
- Oliver, J.S., Slattery P.N., Hulberg L.W. and James W. Nybakken. (1980) Relationships between wave disturbance and zonation of benthic invertebrate communities along a subtidal high-energy beach in Monterey Bay, California. *Fishery Bulletin*, 78(2), 437-454.
- Oosterhout, C.V., Hutchinson, W.F., Wills, D.P., Shipley, P. (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- Orensanz, J.M., Hand, C.M., Parma, A.M., Valero J., & Hilborn, R. (2004). Precaution in the harvest of Mathuselah's clams: the difficulty of getting timely feedback from slow-paced dynamics. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61, 1355–1372.
- Ort, B., and Pogson, G. (2007). Molecular population genetics of the male and female mtDNA molecules of the California sea mussel, *Mytilus californianus*. *Genetics*, 177, 1087–1099.
- Palumbi, S.R. (1994). Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25, 547-72.
- Parker, M., Jumars, P., Leclair, L. (2003). Population genetics of two bivalve species (*Prototheca staminea* and *Macoma balthica*) in Puget sound, Washington. *Journal of Shellfish Research*, 22 (3), 681-688.
- Pérez Valencia L.I. (2011) Variabilidad genética de la almeja de sifón *Panopea globosa* (Dall, 1898) en el noroeste de México. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur, México.
- Phillips, S.J., Anderson, R.P. and Schapire, R.E. (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190, 231-259.
- Raymond, M., Rousset, F. (1995). GENEPOP (v1.2): Population genetics software for exact test and ecumenecism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249.
- Rice, W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43, 223-225.
- Riginos, C., and Henzler, C.M. (2008). Patterns of mtDNA diversity in North Atlantic populations of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 155, 399–412. Doi: 10.1007/s00227-008-1038-4.

- Ríos, C., Sanz, S., Saavedra, S., Peña, J.B. (2002). Allozyme variation in populations of scallops, *Pecten jacobaeus* (L.) and *P. maximus* (L.) (Bivalvia: Pectinidae), across the Almería–Oran front. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 267(2), 223-244.
- Rocha Olivares, A., Leal Navarro, RA., Kimbrell, C., Lynn, E.A., Vetter, R.D. (2003) Microsatellite variation in the Mexican rockfish *Sebastes macdonaldi*. *Scientia Marina*, 67, 451-460.
- Rocha Olivares, A., Calderón Aguilera, L.E., Aragon Noriega E.A., Saavedra Sotelo N.C., Moreno Rivera, V.M. (2010). Genetic and Morphological variation of northeast Pacific *Panopea* clams: Evolutionary implications. *Journal of Shellfish Research*, 29 (2), 327-335.
- Rose, C.G., Paynter, K.T., and Hare, M.P. (2006). Isolation by Distance in the Eastern Oyster, *Crassostrea virginica*, in Chesapeake Bay. *Journal of Heredity*, 97(2), 158-170.
- Rousset, F. (2008). GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 281-283.
- Saavedra, C., Zapata, C., and Alvarez, G. (1995). Geographical patterns of variability at allozyme loci in the European oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 122, 95-104.
- Saavedra, C., Zapata, C., Guerra, A., and Alvarez, G. (1993). Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 115, 85-95.
- SAGARPA. (2007). Programa de investigación para el seguimiento de la pesquería de almeja generosa (*Panopea spp*) en las Costas de Baja California, México. Prospección y evaluación de nuevas áreas de aprovechamiento. Mazatlán, Sinaloa: CONAPESCA.
- Sánchez Montante, O., Zaitsev, O., Saldivar Reyes, M. (2007). Condiciones hidrofísicas en el sistema lagunar Bahía Magdalena-Almejas. En: R. Funes Rodríguez, J. Gómez Gutiérrez, R. Palomares García (Eds.). *Estudios ecológicos de Bahía Magdalena*. México, Instituto Politecnico Nacional.
- Sarver, S.K., & Foltz, D.W. (1993) Genetic population structure of a species complex of blue mussels (*Mytilus spp.*). *Marine Biology*, 117, 105-112.
- Shanks, A.L., and Brink, L. (2005). Upwelling, downwelling, and cross-shelf transport of bivalve larvae: test of a hypothesis. *Marine Ecology Progress Series*, 302, 1-12.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47(1), 264-279.

- Sloan, N.A., & Robinson, S.M. (1984). Age and gonad development in the Geoduck clam *Panopea abrupta* (Conrad) from southern British Columbia, Canada. *Journal Shellfish Research*, 4, 131–137.
- Star, B., Apte S., & Gardner J. (2003). Genetic structuring among populations of the greenshell mussel *Perna canaliculus* revealed by analysis of randomly amplified polymorphic DNA. *Marine Ecology Progress Series*, 249, 171-182.
- Stepien, C.A., Rosenblatt, R.H., Bargmeyer, B.A. (2001) Phylogeography of the spotted sand bass, *Paralabrax maculatofasciatus*: Divergence of Gulf of California and Pacific Coast populations. *Evolution*, 55, 1852-1862.
- Straus, K.M., Crosson, L.M., Vadopalas, B. (2008). Effects of Geoduck Aquaculture on the Environment: A Synthesis of Current Knowledge. Technical Report WSG-TR 08-01. Washington Sea Grant.
- Suárez Moo, P.J., Calderón Aguilera, L.E., Reyes-Bonilla, H., Castañeda Fernandez de Lara, V., Aragón Noriega, E.A., Rocha Olivares, A. (en prensa). Integrating genetic, phenotypic and ecological analyses to assess the variation and clarify the distribution of the Cortes Geoduck (*Panopea globosa*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. doi: 10.1017/S0025315412001464.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28 (10), 2731-2739.
- Taylor, M.S., Hellberg, M.E. (2003). Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science*, 299, 107-109.
- Terry, A., Bucciarelli, G., Bernardi, G. (2000). Restricted gene flow and incipient speciation in disjunct Pacific Ocean and Sea of Cortez populations of a reef fish species, *Girella nigricans*. *Evolution*, 54, 652-659
- Toro, J., y González, C. (2009). La estructura genética de la ostra chilena (*Ostrea chilensis* Philippi, 1845) en poblaciones naturales del sur de Chile, basada en análisis con marcadores RAPDs. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44(2), 467-476.
- Toro, J., & Aguilar, P. (1996). Genetic differentiation of populations of the oyster *Ostrea chilensis* in southern Chile. *Aquatic Living Resources*, 9, 75-78.
- Toro, J., Ojeda, A., & Vergara, A. (2004). The genetic structure the *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) populations along the Chilean coast based on RAPDs analysis. *Aquaculture Research*, 35, 1466-1471.

U.S. Global Ocean Ecosystem Dynamics (GLOBEC).(1994). Eastern boundary current program. A science plan for the California current ecosystem. California. USA.

Vadopalas, B., & Bentzen, P. (2000). Isolation and characterization of di- and tetra-nucleotide microsatellite loci in Geoduck clams, *Panopea abrupta*. *Molecular Ecology*, 9, 1433–1449.

Vadopalas, B., Leclair, L.L., & Bentzen, P. (2004). Microsatellite and allozyme analyses reveal few genetic differences among spatially distinct aggregations of Geoduck clams (*Panopea abrupta*, Conrad 1849). *Journal Shellfish Research*, 23, 693–706.

Vadopalas, B. and Naish, K. (2004). Assessment of the current knowledge of geoduck and other shellfish population structure, with general recommendations for the genetic management of cultured and wild geoduck clams. Washington State Department of Natural Resources, Washington, USA.

Vadopalas, B., Pietsch, T.W., & Friedman, C.S. (2010). The proper name for the Geoduck: resurrection of *Panopea generosa* Gould, 1850, from the synonymy of *Panopea abrupta* (Conrad, 1849) (Bivalvia: Myoida: Hiatellidae). *Malacologia*, 52, 169–173.

Vadopalas, B., Leclair, L.L. and Bentzen P. (2012) Temporal Genetic Similarity Among Year-Classes of the Pacific Geoduck Clam (*Panopea generosa* Gould 1850): A Species Exhibiting Spatial Genetic Patchiness. *Journal of Shellfish Research*, 31 (3), 697-709.

Van Koeveringe, M.A.H. (1998). Molecular population genetics of British Columbia geoduckclams, *Panope abrupta*, based on mitochondrial DNA sequences. M.S. Thesis, Simon Fraser University, Vancouver.

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

Weersing, K., Toonen, R.J. (2009). Population genetics, larval dispersal, and connectivity in Marine Systems. *Marine Ecology Progress Series* 393, 1-12.

Weir, B.S. and Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370.

Vicente, M.C. y Fulton, T. (2003). Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas: Módulo de Aprendizaje. Roma, Italia, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI).

White, T.J., Bruns, T., Lee S., & Taylor, W.J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Snninsky & T. J.White (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press.

- Yu, H. and Li, Q. (2007). Genetic Variation of Wild and Hatchery Populations of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* Assessed by Microsatellite Markers. *Journal of Genetics and Genomics*, 34(12), 1114-1122.
- Zardil, G., McQuaid, C., Teskel, P., Barker, N. (2007). Unexpected genetic structure of mussel population South Africa: indigenous *Perna perna* and invasive *Mytilus galloprovincialis*, *Marine Ecology Progress Series*, 33, 135-144.
- Zaytsev, O., Cervantes Duarte, R., Montate, O., Gallegos Garcia, A. (2003) Coastal Upwelling Activity on the Pacific Shelf of the Baja California Peninsula, *Journal of Oceanography*, 59, 489-502.
- Zhan, A., Hu, J., Hu, X., Zhou, Z., Hui, M., Wang, S. (2009). Fine-Scale Population Genetic Structure of Zhikong Scallop (*Chlamys farreri*): Do Local Marine Currents Drive Geographical Differentiation?. *Marine Biotechnology*, 11, 223–235.
- Zhang, Q., Allen, S.K., and Reece K.S. (2005). Genetic Variation in Wild and Hatchery Stocks of Suminoe Oyster (*Crassostrea ariakensis*) assessed by PCR-RFLP and Microsatellite Markers. *Marine Biotechnology*, 7, 588–599.