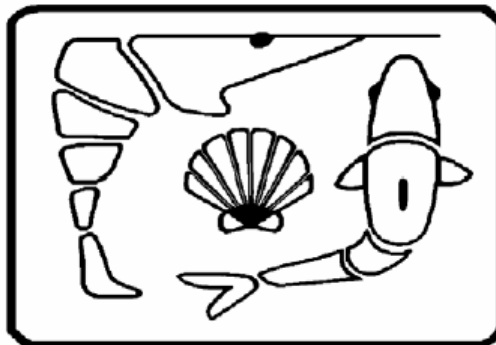




# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

## MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ACUACULTURA



**DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y DEL ÍNDICE DE ENDOGAMIA EN EL OSTIÓN JAPONÉS, *Crassostrea gigas*, Y EN EL OSTIÓN DE PLACER, *Crassostrea corteziensis*, CULTIVADOS EN SONORA**

### T E S I S

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

Presenta:

**TANIA LIZBETH ENRÍQUEZ ESPINOZA**

Hermosillo, Sonora

Agosto del 2008

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **APROBACIÓN.**

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis de Tania Lizbeth Enríquez Espinoza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.

---

Dr. José Manuel Grijalva Chon  
Presidente

---

M. en C. Ramón H. Barraza Guardado  
Sinodal Secretario

---

Dra. Reina Castro Longoria  
Sinodal

---

M. en C. Francisco J. Hoyos Chairez  
Sinodal

## **DEDICATORIA.**

A mis padres, Lourdes y Ernesto,  
A mis hermanos, Jorge Ernesto y Jonathan,  
A mi novio, Fernando.

A todos ellos les dedico este trabajo con mucho cariño,  
ya que sin ellos no lo hubiese logrado.  
Los quiero mucho.

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Universidad de Sonora, a su Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, a la Maestría en Ciencias en Acuicultura y a todo su personal académico porque gracias a ellos pude culminar mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su apoyo económico a través de su programa de becas de posgrado.

Mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, Dr. José Manuel Grijalva Chon por su asesoría, capacitación y todo el apoyo brindado a lo largo de este trabajo de tesis.

A mis sinodales Dra. Reina Castro Longoria, M.C. Ramón H. Barraza Guardado y M.C. Francisco J. Hoyos Chairez por sus valiosos comentarios y sugerencias a este trabajo.

Al Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) por proporcionar la semilla de los organismos utilizados en este estudio.

A mis compañeros de la maestría, generaciones siguientes y a Josefina Ramos Paredes, por su apoyo y amistad.

A todas las personas, que por no omitir nombres no menciono, y que de alguna u otra forma me apoyaron para que pudiera terminar este trabajo.

## CONTENIDO.

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
II.- OBJETIVOS	7
II.1.- Objetivo general	7
II.2.- Objetivos particulares	7
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	8
III.1.- Obtención de muestras	8
III.2.- Extracción de proteínas	8
III.3.- Análisis electroforético	8
III.3.1.- Preparación de los geles	10
III.3.2.- Aplicación de la muestra al gel	10
III.3.3.- Electroforesis	11
III.3.4.- Revelado de las proteínas	11
III.4.- Interpretación de los zimogramas	12
III.5.- Análisis de datos	12
IV.- RESULTADOS	13
V.- DISCUSIÓN	28
VI.- CONCLUSIONES	33
VII.- RECOMENDACIONES	34
VIII.- LITERATURA CITADA	35
IX.- APÉNDICES	42
X.1.- Apéndice 1.- Soluciones amortiguadoras para la electroforesis	42
X.2.- Apéndice 2.- Mezclas reveladoras de los sistemas proteicos y Soluciones stock empleadas.	43

## RESUMEN.

Con el fin de evaluar la variabilidad genética a nivel de alozimas de los ostiones cultivados en Sonora, se analizaron ostiones de *Crassostrea gigas* triploide (n=78) y *Crassostrea corteziensis* diploide (n=78). Para la muestra de *C. gigas* se analizaron 10 sistemas enzimáticos, los cuales revelaron 16 loci resultando polimórficos 12 de ellos. Para *C. corteziensis* de los 9 sistemas enzimáticos analizados, fueron revelados 13 loci, resultando polimórficos 8 de ellos. La heterocigosis promedio esperada y observada para *C. gigas* fue de 0.350 y 0.309 respectivamente, sin diferencia significativa entre ellas. Mientras que la heterocigosis promedio esperada y observada para *C. corteziensis* fue de 0.294 y 0.065 respectivamente, con diferencias altamente significativas ( $p=0.001$ ). El análisis de las frecuencias fenotípicas de los 12 loci polimórficos de *C. gigas* mostró que sólo tres (*AKP\**, *EST-2\** y *PEP-1\**) están en equilibrio de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg, con un valor promedio de endogamia de 0.133. En el caso de *C. corteziensis* los 8 loci polimórficos se encontraron fuera de dicho equilibrio. Esto se vio reflejado en el alto índice de endogamia que presentó un valor promedio de 0.777, por la gran deficiencia de heterocigotos encontrada en todos los loci. Los resultados obtenidos para *C. gigas* mostraron un valor de heterocigosis promedio similar a los reportados en organismos diploides silvestres para la especie, pero menor a los reportados para triploides, lo que indica una relativa baja variabilidad para la muestra analizada. También en *C. corteziensis* los resultados mostraron una baja variabilidad y un alto valor del índice de endogamia, que indica que la población de donde provinieron los reproductores se encuentra muy erosionada genéticamente o el lote de reproductores es de mala calidad. Se recomienda buscar linajes diploides de *C. gigas* con una buena estructura genética y un buen nivel de heterocigosis, así como realizar más estudios genéticos para las poblaciones de *C. corteziensis* naturales con el fin de obtener un pie de cría con mejor variabilidad genética.

## ABSTRACT.

In order to evaluate the genetic variability of the cultured oysters in Sonora, triploid *Crassostrea gigas* (n=78) and diploid native oyster *Crassostrea corteziensis* (n=78) were analyzed at allozyme coding loci. For the *C. gigas* sample, 10 enzymatic systems were analyzed, revealing 16 loci of which 12 were polymorphic. For *C. corteziensis*, nine enzymatic systems revealed 13 loci, of which eight were polymorphic. The expected average and observed heterozygosity for *C. gigas* were 0.350 and 0.309 respectively, with no significant differences between them. While the expected average and observed heterozygosity for *C. corteziensis* were 0.294 and 0.065 respectively, with significant differences ( $p=0.001$ ). The phenotypic frequency analysis of the 12 polymorphic loci of *C. gigas* demonstrated that only 3 loci (*AKP\**, *EST-2\** and *PEP-1\**) were in equilibrium to the Hardy-Weinberg Law, with an average inbreeding of 0.133. In the case of *C. corteziensis*, the eight polymorphic loci were found out of the Hardy-Weinberg Law, reflecting a high inbreeding value of 0.777, due to the large heterozygote deficiency in all loci. Results for *C. gigas* showed a heterozygosity similar to those reported in wild diploid organisms, but lower than those reported for triploids. Results for *C. corteziensis* showed a low variability and high inbreeding index, suggesting that the source broodstock is eroded genetically. It is recommended a program of selection of diploid lineages of *C. gigas* with a good genetic variability and a good level of heterozygosity, as well as carry out more genetic studies in wild populations of *C. corteziensis* to get broodstocks with better genetic variability.



## ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura		Página
1.	Fenotipos presentes en el locus <i>LAP*</i> de cuatro organismos triploides de <i>C. gigas</i> , de acuerdo con el patrón de bandeo observado.	14
2.	Esquema de representación de los fenotipos presentes y ausentes en el locus <i>LAP*</i> en organismos triploides de <i>C. gigas</i> .	14

## ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla	Página
I. Sistemas enzimáticos analizados, número asignado por la Comisión de Enzimas <sup>+</sup> (No. E.C.), loci revelados y soluciones amortiguadoras y de tinción utilizadas para el análisis de alozimas en el estudio de variabilidad genética en <i>Crassostrea gigas</i> triploide y <i>Crassostrea corteziensis</i> diploide cultivados en Sonora.	9
II. Variabilidad genética alozímica de <i>Crassostrea gigas</i> triploide y <i>Crassostrea corteziensis</i> diploide cultivados en Sonora.	15
III. Frecuencias alélicas, heterocigosis observada ( <i>Ho</i> ), heterocigosis esperada insesgada ( <i>He</i> ) según el equilibrio de Hardy-Weinberg, número de organismos analizados (N) por locus polimórfico en <i>Crassostrea gigas</i> triploide cultivado en Sonora.	17
IV. Frecuencias alélicas, heterocigosis observada ( <i>Ho</i> ), heterocigosis esperada insesgada ( <i>He</i> ) según el equilibrio de Hardy-Weinberg, número de organismos analizados (N) por locus polimórfico en <i>Crassostrea corteziensis</i> diploide cultivado en Sonora.	19
V. Prueba de bondad de ajuste de $\chi^2$ , para el equilibrio genético de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg en cada locus polimórfico de <i>Crassostrea gigas</i> triploide cultivado en Sonora. $P_0$ =significancia para cada fenotipo, $P_1$ =significancia para cada locus, ns=no significativo.	20
VI. Prueba de bondad de ajuste de $\chi^2$ , para el equilibrio genético de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg en cada locus polimórfico de <i>Crassostrea corteziensis</i> diploide cultivado en Sonora. $P_0$ =significancia para cada fenotipo, $P_1$ =significancia para cada locus.	22
VII. Frecuencia observada y frecuencia esperada de los fenotipos homocigotos, heterocigotos y otros diferentes del mas común para los loci polimórficos multialélicos, y resumen de la prueba de bondad de ajuste de $\chi^2$ de conformidad al equilibrio de Hardy-Weinberg en <i>Crassostrea gigas</i> triploide cultivado, ns=no significativo.	24
VIII. Frecuencia observada y frecuencia esperada de los fenotipos homocigotos, heterocigotos y otros diferentes del mas común para los loci polimórficos multialélicos, y resumen de la prueba de bondad de ajuste de $\chi^2$ de conformidad al equilibrio de Hardy-Weinberg en <i>Crassostrea corteziensis</i> diploide cultivado, ns=no significativo.	25

- IX. Coeficiente D, coeficiente de endogamia ( $Fis$ ) en cada locus polimórfico evaluado y valor estadístico de  $\chi^2$  para la prueba de hipótesis  $Fis=0$  de *Crassostrea gigas* triploide cultivado. 26
- X. Coeficiente D, coeficiente de endogamia ( $Fis$ ) en cada locus polimórfico evaluado y valor estadístico de  $\chi^2$  para la prueba de hipótesis  $Fis=0$  de *Crassostrea corteziensis* diploide cultivado. 27

## I.- INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.

La ostricultura en México, se realiza en lagunas litorales y esteros; las especies que más se cultivan son *Crassostrea gigas* en el Pacífico y *Crassostrea virginica* en el Golfo de México. A nivel nacional en el 2004 se tuvo una producción anual de ostión de 46,601 toneladas por acuicultura (CONAPESCA, 2004).

El ostión de placer, *Crassostrea corteziensis* ha sido reportado desde Baja California, México hasta Paita, Perú. Se han hecho esfuerzos por cultivar esta especie en las costas de algunos estados como Sonora, Sinaloa, Nayarit y Colima. Dichos esfuerzos datan desde 1965 en el área de Guaymas, Sonora (Baqueiro, 1991) y representan una alternativa para la producción de la industria ostrícola (Chávez-Villalba *et al.*, 2005). Por otra parte, el ostión del Pacífico *C. gigas*, es la especie más cultivada a nivel mundial con 4.2 millones de toneladas en el 2002. Tiene su origen en el noreste de Asia y ha sido introducido en Europa, América y Nueva Zelanda.

El cultivo del ostión del Pacífico se originó en Japón desde hace 300 años, por lo que se ha considerado una de las especies de mayor cultivo en ese país. *C. gigas* es un molusco bivalvo muy apreciado por sus dimensiones ya que logra alcanzar dimensiones máximas de 35 cm de longitud, 8 cm de altura, 10 cm de ancho y se considera de tamaño comercial cuando adquiere más de 8 cm (Tanaka, 1975). En México se estableció su cultivo con éxito en 1973 en la Bahía de San Quintín, B.C. con semilla proveniente del estado de Washington, EUA. *C. gigas* es considerada como una especie altamente adecuada para ser cultivada, ya que presenta un crecimiento rápido y resiste un amplio intervalo de temperatura y salinidad (De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991). Ozaki y Fujio (1985) atribuyen el éxito de la implantación de poblaciones de *C. gigas* en diversos ambientes a una capacidad ecológica superior, otorgada muy probablemente por los altos niveles de variabilidad genética que presenta esta especie.

Álvarez-Jurado (1987) y Benzie y Williams (1996) mencionan que la producción masiva de organismos de interés acuícola implica el conocimiento y seguimiento de la estructura genética de las poblaciones y que uno de los parámetros básicos de la estructura es la variabilidad, medida principalmente por el nivel de heterocigosis de la población y que por lo general es uno de los primeros rasgos que se erosionan debido a la selección artificial en el proceso de mejoramiento del cultivo. El conocimiento de la estructura y la

dinámica genéticas es la única forma de pretender el mejoramiento de la especie (De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991).

Las poblaciones son dinámicas, pueden crecer y expansionarse o disminuir y contraerse mediante cambios en las tasas de nacimientos o fallecimientos, o por migración o por fusión con otras poblaciones. Esto tiene consecuencias importantes y, con el tiempo, puede dar lugar a cambios en la estructura genética de poblaciones. Las frecuencias alélicas y las fuerzas que alteran estas frecuencias, como la mutación, la migración, la selección y la deriva genética al azar, se han examinado cuidadosamente (Klug y Cummings 1999). Estas fuerzas evolutivas influyen la composición del reservorio de la especie modificándola y permitiéndole adaptarse a las fluctuaciones ambientales a largo plazo (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989).

La variabilidad genética puede estimarse mediante: a) análisis de alozimas; b) del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del ADNmt; c) el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD); d) el polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) y e) los microsatélites. Sin embargo, debido a la cantidad de información generada en los últimos 40 años, la técnica de electroforesis o análisis de alozimas ofrece una amplia base de datos para realizar estudios comparativos en prácticamente todos los grupos de especies. Esta técnica se basa en la separación electroforética de proteínas junto con la especificidad de la detección bioquímica de los productos proteicos de los loci, ofrece un método relativamente barato, rápido y analiza la variación individual de loci en poblaciones de cualquier forma de vida desde bacterias hasta el hombre (May, 1992). Así pues, las metodologías adaptadas para la medición de variabilidad genética, tienen un uso potencial que puede ser aprovechado para los programas de regeneración y cultivo de los bancos ostrícolas (Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989).

Las proteínas naturales están conformadas por 20 aminoácidos comunes, cinco de éstos están cargados eléctricamente, así las proteínas tienden a tener diferentes cargas eléctricas netas dependiendo del balance de éstas en los aminoácidos que las componen. A su vez la carga neta de las proteínas esta influida por el pH del medio (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989). La electroforesis usa esta propiedad fisico-química de las proteínas para separarlas con base a su carga (Utter *et al.*, 1988), y en la aplicación de un

campo eléctrico a través de un soporte inerte donde se encuentran embebidas las moléculas que migrarán hacia alguno de los polos en función de su carga neta (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989). Las alozimas son formas moleculares de una enzima codificadas por diferentes alelos en un locus específico de un gen (Baker, 2000) y funcionan como marcadores en la cuantificación de heterocigosis, diversidad genética, diferenciación genética y otras medidas para cuantificar variaciones genéticas intra e interpoblacionales (Müller, 2001).

La pérdida de diversidad genética, la reducción del tamaño de población y los efectos deletéreos de la endogamia son aspectos preocupantes en los programas de selección (Appleyard y Ward, 2006). Cualquier programa de reproducción cerrado, necesariamente reduce el nivel de diversidad genética comparado con una población silvestre (Hedgecock y Sly, 1990). La mejora genética implica el aumento en frecuencia de algún carácter particular existente en la población, de interés para el valor comercial del producto, o en ocasiones, la inducción de variantes específicas no presentes en la población natural, por medio de hibridación (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1988).

Por otro lado, la manipulación del número de conjuntos cromosómicos ha permitido la obtención de diversos productos de interés en la acuicultura (Martínez, 2005). Los organismos triploides tienen varias ventajas potenciales sobre los diploides: son estériles, tienen un mayor crecimiento, una mayor resistencia a enfermedades y una mayor heterocigosis (Ward *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002).

Una población que presenta disminuida sensiblemente su variabilidad genética, en relación a las demás que componen la especie, puede considerarse con una capacidad reducida para la respuesta a los cambios ambientales (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989). Cuando una población se lleva al cultivo es de esperarse una reducción de los niveles de variación, por un “efecto del fundador” artificial. El tamaño de la población se reduce y aparecen los fenómenos genéticos aleatorios como la deriva genética (De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991).

Los estudios de variabilidad genética han demostrado ser muy importantes en la resolución de problemas de interés inmediato en el desarrollo de pesquerías y cultivos acuícolas (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1988). La investigación de los niveles de variabilidad genética de poblaciones en explotación da una evaluación del estado de

“salud genética poblacional”, lo cual permite emitir un juicio más exacto respecto al vigor de la especie y la explotabilidad de la población estudiada (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989). El reconocimiento y el seguimiento del recurso genético son actividades que pueden evitar, en un momento dado, que una inversión prometedora se convierta en un fracaso económico (De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991). La caracterización de la estructura genética de especies en cultivo, se ha realizado con el fin de compararla con las poblaciones naturales y así identificar las modificaciones genéticas sufridas en la población mediante la siembra en granja (De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991).

Por ejemplo, en la población cultivada de camarón de granja, Ramos-Paredes y Grijalva-Chon (2003), llevaron a cabo un análisis en *Pennaeus stylirostris* con el fin de describir la variabilidad genética de linajes cultivados y silvestres para determinar la diferencia con poblaciones silvestres, y de donde resultó que los linajes cultivados presentaron menor diversidad genética, ocasionada principalmente por la pérdida de alelos. Esta pérdida de alelos, incluso puede deberse a la explotación pesquera y puede llevar a modificar la estructura genética poblacional, debido a un mal manejo. Varela-Romero y Grijalva-Chon (2004) encontraron evidencias contundentes del deterioro de la variabilidad genética del pez chano, *Micropogonias megalops*, debido a la desmedida captura comercial. Por lo tanto el equilibrio genético de las poblaciones silvestres como cultivadas, depende en mayor medida de la intervención del ser humano.

La variación genética es comúnmente medida en términos de polimorfismo (P) y heterocigosis (H). P es simplemente la proporción de loci polimórficos y H es la proporción de individuos heterocigotos (Hoelzel y Bancroft, 1992). Un locus es el lugar del cromosoma en donde se sitúa un gen dado, y es considerado polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común es menor o igual a 0.95 ó 0.99 (Baker, 2000). Los alelos son formas alternativas de un mismo gen, presentan ligeras diferencias que determinan el mismo carácter. Tomando en cuenta lo anterior, un método utilizado para estudiar la estructura genética de las poblaciones es medir la frecuencia de un alelo dado (Klug y Cummings, 1999).

En organismos cultivados, uno de los puntos de gran interés para los acuacultores es la endogamia asociada a las especies, ésta se produce cuando hay una alta frecuencia de apareamientos entre organismos emparentados, y ocurre principalmente en poblaciones

pequeñas, ya que es más probable que los individuos que se aparean estén relacionados entre sí. El resultado es un aumento en la frecuencia de homocigotos y por lo tanto una disminución en la frecuencia de heterocigotos acompañado por una pérdida de vigor general y fertilidad conocida como depresión endogámica (Correa *et al.*, 2004; Gall, 1988), la cual es una medida de la pérdida de la eficacia biológica ocasionada por el parentesco (Klug y Cummings, 1999). Los efectos deletéreos de la endogamia se pueden eliminar por medio de la introducción de alelos nuevos efectuando cruza con organismos selectos de otras poblaciones en donde se han detectado diferencias genéticas (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1988).

Los ostiones son animales altamente fecundos y los productores algunas veces usan solamente unos pocos animales por generación como reproductores (Appleyard y Ward, 2006). Una reducción en la heterocigosis promedio es un indicador del efecto fundador, donde las poblaciones son establecidas con un número pequeño de reproductores fundadores. Los cuellos de botella de poblaciones pequeñas también pueden reducir dramáticamente la heterocigosis (Baker, 2000).

Pocos han sido los trabajos que describen la estructura genética del recurso ostión en México. De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero (1988) analizaron la aplicabilidad de las mediciones de variabilidad genética a la pesquería del ostión americano *Crassostrea virginica* de las costas del Golfo de México y propusieron el diseño de programas de hibridación para la regeneración del reservorio genético de las poblaciones estudiadas. También, De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero (1989) hicieron un análisis de poblaciones ostrícolas de *C. virginica* como recurso pesquero en la Laguna de Términos, Campeche, donde vieron una reducción de la variabilidad genética y donde proponen la conservación de tamaños de población adecuados.

En otro estudio realizado por De la Rosa-Vélez *et al.* (1991) se evaluó el estado del recurso genético del cultivo de ostión japonés *C. gigas* de la Bahía de San Quintín, B.C., México y se pudo apreciar que esta población conservaba una alta variabilidad genética. Correa *et al.* (2004) llevaron a cabo un estudio de variabilidad alozímica en *C. gigas* cultivado en Bahía San Quintín, B.C. y encontraron que el ostión cultivado mostró una diversidad genética reducida debido a una deficiencia de heterocigosis, la cual es explicada por el fenómeno de la endogamia y el efecto del cuello de botella. Por otra parte, Cruz *et al.*



(2007) caracterizaron marcadores microsatelitales para *C. corteziensis*, lo que dará nuevas herramientas para estudios genético-poblacionales para esta especie.

Actualmente la ostricultura en las costas de Sonora enfrenta una de las mayores crisis de producción debida a las altas mortalidades de sus cultivos. Desde 1997, *C. gigas* cultivado en Sonora ha venido experimentando pérdidas por mortalidad masiva en todos los sitios de cultivo, la cual alcanza niveles extremos hasta del 90%. Las causas de dichas mortalidades han sido atribuidas a una mezcla de factores bióticos y abióticos (GIIMB, 2008). Por otra parte *C. corteziensis* es una especie nativa que apenas comienzan a realizarse pruebas para su cultivo y se pretende evaluar la salud genética y compararse con *C. gigas*.

Tanaka (1975) cita que las mortalidades masivas pueden estar asociadas a los cambios estacionales de temperatura, a condiciones fisiológicas en la reproducción, altas concentraciones de materia orgánica y azufre, por infecciones bacterianas (*Vibrio* spp), protozoarios (*Haplosporidium nelsoni* y *Perkinsus marinus*), así como otros microorganismos tales como las *Rickettsias* y virus (herpesvirus). Sin embargo poco se sabe si existe algún efecto de la condición genética sobre la mortalidad en los ostiones cultivados en Sonora.

Debido a lo anterior y a la carencia de información sobre la estructura genética poblacional del ostión cultivado en Sonora, el presente trabajo pretende evaluar la calidad genética de dichos organismos. La hipótesis de trabajo es que los ostiones cultivados en el estado de Sonora presentan bajos niveles de variabilidad genética y para cumplir esta investigación se presentaron los siguientes objetivos a continuación.

## **II.- OBJETIVOS.**

### **II.1.- General.**

El objetivo principal de este estudio fue determinar la variabilidad genética y el índice de endogamia de dos especies económicamente importantes para la ostricultura en las costas de Sonora: el ostión del japonés, *Crassostrea gigas*, y el ostión de placer, *Crassostrea corteziensis*.

### **II.2.- Particulares.**

- a) En ambas especies determinar la variabilidad genética a través del grado de heterocigosis, el número promedio de alelos por locus y el porcentaje de polimorfismo.
- b) En ambas especies determinar el nivel de endogamia.
- c) Con los parámetros obtenidos, realizar una comparación de la “salud genética poblacional” entre ambas especies.

### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **III.1.- Obtención de muestras.**

Para realizar este estudio se cultivaron las dos especies *Crassostrea gigas* y *Crassostrea corteziensis* desde semilla hasta talla comercial, de los cuales aleatoriamente se seleccionaron para su análisis 78 organismos adultos de ostión japonés *C. gigas* triploides (producto de la cruce diploide  $\times$  tetraploide) provenientes de larva fijadora de Whiskey Creek Oyster Co. del estado de Oregon, EUA y también 78 organismos adultos de ostión de placer *C. corteziensis* diploides.

Ambos lotes de semilla fueron proporcionadas por el Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) y fueron cultivados en el estero La Cruz en Bahía de Kino, Sonora, de donde se transportaron al laboratorio de genética del DICTUS para ser disectados y tomar el músculo aductor y la glándula digestiva porque ambos tejidos ocupan la mayor proporción del organismo y cantidad de enzimas el segundo, para almacenarlos a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### **III.2.- Extracción de proteínas.**

El músculo aductor y la glándula digestiva de cada organismo, fueron macerados juntos en una solución de 100 ml de Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0, 0.1 g de NAD, 0.1 g de NADP y 1 g de Polivinilpirrolidona (Grijalva-Chon *et al.*, 1996). Se utilizó un homogenizador eléctrico de acero inoxidable y el proceso se realizó en baño de hielo para prevenir la degradación enzimática. Las muestras fueron centrifugadas a  $5,000 \times g$  durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los sobrenadantes, los cuales contenían las proteínas en solución, fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis electroforético.

#### **III.3.- Análisis electroforético.**

Se analizaron 10 sistemas enzimáticos para *C. gigas* y 9 para *C. corteziensis* (Tabla I, Apéndice I), los cuales han demostrado resultados satisfactorios en *C. gigas* y *C. virginica* diploides (Correa *et al.*, 2004; Rosa-Vélez *et al.*, 1991; Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989). A su vez, se asumió que también podrían funcionar para *C. gigas* triploide y *C. corteziensis* diploide.

Tabla I. Sistemas enzimáticos analizados, número asignado por la Comisión de Enzimas<sup>+</sup> (No. E.C.), loci revelados y soluciones amortiguadoras y de tinción utilizadas para el análisis de alozimas en el estudio de variabilidad genética en *Crassostrea gigas* triploide y *Crassostrea corteziensis* diploide cultivados en Sonora.

Sistema Enzimático	No. E.C.	<i>C. gigas</i>		<i>C. corteziensis</i>		Tinción
		Locus	Amortiguador	Locus	Amortiguador	
Alcohol deshidrogenasa	1.1.1.1	<i>ADH</i> *	F	---	-	1
Aspartatoamino transferasa	2.6.1.1	<i>AAT-1</i> *	C	<i>AAT-1</i> *	C	2
		<i>AAT-2</i> *	C	<i>AAT-2</i> *	C	
Citosol dipeptidasa	3.4.13.18	<i>PEP-1</i> *	J	<i>PEP-1</i> *	J	5
		<i>PEP-2</i> *	J	<i>PEP-2</i> *	J	
Enzima málica	1.1.1.40	---	-	<i>MEZ-1</i> *	K	2
Esterasa	3.1.1.1	<i>EST-2</i> *	D	<i>EST-2</i> *	K	1
		<i>EST-3</i> *	D	---	-	
		<i>EST-4</i> *	D	---	-	
Fosfatasa ácida	3.1.3.2	<i>ACP</i> *	C	<i>ACP</i> *	J	1
Fosfatasa alcalina	3.1.3.1	<i>AKP</i> *	C	<i>AKP</i> *	J	4
Fosfoglucomutasa	5.4.2.2	<i>PGM-1</i> *	K	<i>PGM-1</i> *	K	2
		<i>PGM-2</i> *	K	<i>PGM-2</i> *	K	
Glutamato deshidrogenasa	1.4.1.3	<i>GDH</i> *	F	---	-	2
Isocitrato deshidrogenasa	1.1.1.42	<i>IDH-1</i> *	K	<i>IDH-1</i> *	K	3
		<i>IDH-2</i> *	K	<i>IDH-2</i> *	K	
Leucinamino peptidasa	3.4.11.1	<i>LAP</i> *	D	<i>LAP</i> *	D	1

<sup>+</sup>Comisión de Enzimas (IUBNC, 1984).

Amortiguador:

C = Tris-borato (Ayala *et al.*, 1973).

D = Tris-citrato pH 7.0 (Ayala *et al.*, 1973).

F = Tris-citrato (Shaw y Prasad, 1970).

J = Litio-borato (Ridway *et al.*, 1970).

K = Tris-citrato pH 7.0 (Tracey *et al.*, 1975).

Tinciones:

1=Shaw y Prasad (1970).

2=Schaal y Anderson (1974).

3=Abreu-Grobois (1983)

4=Shaw y Koen (1968).

5=May (1992).

Los loci *MEZ-1\** para *C. gigas*, *ADH\**, *EST-3\**, *EST-4\** y *GDH\** para *C. corteziensis* no realizados fue debido a que no se encontró un amortiguador adecuado con el que se presentara la resolución necesaria para el análisis. La electroforesis se llevó a cabo siguiendo los procedimientos descritos por Aebersold *et al.* (1987) que a continuación se describen.

### **III.3.1.- Preparación de los geles.**

Se prepararon los geles de almidón hidrolizado de papa al 12% en moldes de madera de 18.0 × 16.0 × 0.9 cm. Se colocaron 300 ml de la solución amortiguadora correspondiente al sistema enzimático en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml y se calentaron hasta ebullición, mientras que en un matraz Kitazato de 2000 ml fueron suspendidos 52.8 g de almidón en 140 ml de la misma solución amortiguadora a temperatura ambiente. La solución en ebullición se incorporó a la suspensión de almidón en el matraz de 2000 ml y se agitó vigorosamente, para después calentar la mezcla hasta ebullición, agitando periódicamente para evitar que se hicieran grumos o se quemara el almidón. Cuando se obtuvo un gel opalescente, espeso y viscoso (Redfield y Salini, 1980), se retiró del calor y se extrajo el aire mediante una bomba de vacío durante 40 segundos. Posteriormente se vertió el gel en el molde de madera con base de vidrio, se retiraron las burbujas para eliminar interferencia con la corriente eléctrica, luego se cubrió con otro vidrio y se dejó enfriar.

### **III.3.2.- Aplicación de la muestra al gel.**

Se retiraron la tapa de vidrio y el marco de madera y se procedió a hacer un corte de lado a lado a 3 cm del lado mas largo del gel, nombrándose al corte el “origen”. La pieza angosta (anodal) y la porción restante (catodal) se separaron unos centímetros y se aplicó el extracto proteico de cada organismo por medio de tiras de papel Whatman # 3 de 1.2 × 0.3 cm que fueron tomadas con pinzas y sumergidas en el extracto. Las tiras humedecidas con el extracto fueron colocadas verticalmente en el “origen” de la porción anodal del gel, de izquierda a derecha. Se colocaron también, tiras humedecidas con azul de bromofenol al 0.0002% que sirvieron como marcador de corrimiento electroforético. Después, ambas porciones del gel se unieron y se eliminaron las bolsas de aire que pudieran impedir el paso

de la corriente eléctrica. Se volvió a poner el marco de madera y se colocó dentro de la cámara electroforética.

### **III.3.3.- Electroforesis.**

La electroforesis se realizó en unidades electroforéticas de acrílico que contenían en sus depósitos la solución amortiguadora correspondiente al sistema enzimático a evaluar. Se utilizaron tiras de fieltro de  $16.5 \times 8.0$  cm como “puentes” para el paso de la corriente eléctrica. Las tiras de fieltro fueron empapadas de amortiguador y colocadas de tal forma que cubrían aproximadamente 2.5 cm del gel y tocaban el depósito con la solución amortiguadora. Se colocaron tres de ellas por cada depósito. Posterior a esto se colocó la cubierta de vidrio para evitar una deshidratación del gel.

La electroforesis se llevó a cabo en el refrigerador para minimizar el calor generado durante el proceso y mantener el gel frío, para evitar la degradación enzimática. Al transcurrir 15 minutos del corrimiento electroforético, se detuvo la corriente eléctrica y se retiraron cuidadosamente las mechas de papel. Posteriormente se reanudó durante el tiempo necesario para la separación adecuada del sistema enzimático de interés.

### **III.3.4.- Revelado de las proteínas.**

El gel fue rebanado horizontalmente en cuatro capas de 0.2 cm de grosor, la capa superficial fue desechada y se utilizaron las restantes para el revelado de enzimas. Cada rebanada se colocó por separado en un recipiente de plástico y se le añadieron 50 ml de solución de revelado específico de acuerdo a cada sistema enzimático. Las mezclas de estas soluciones fueron preparadas inmediatamente antes de detener la electroforesis. Para el revelado se incubaron las rebanadas a  $37^{\circ}\text{C}$  en la oscuridad, a excepción de Esterasa donde la incubación es a temperatura ambiente (Apéndice I), durante el tiempo de revelado determinado por la actividad de la proteína. Una vez que se presentó la reacción, se procedió a fijar el gel con una solución de agua, metanol y ácido acético en una proporción de de 6:3:1 para su preservación y posterior análisis.

#### **III.4.- Interpretación de los zimogramas.**

Para la interpretación de los patrones de bandeo producidos por los sistemas proteicos se siguieron los criterios de Grant *et al.* (1984) y Utter *et al.* (1988). Los genes, referidos como loci, fueron nombrados mediante símbolos alfanuméricos de acuerdo a lo descrito por Shaklee *et al.* (1990). Se asignó a las enzimas nombre, abreviatura y número de la IUBNC (International Union of Biochemistry, Nomenclature Committee, 1984). Los loci en sistemas multilocus se designaron con el número 1 para el locus más cercano al cátodo. El alelo más común fue referido como 100, y con relación a éste, los demás fueron designados de acuerdo a su movilidad.

La variación entre alozimas de un mismo locus fue registrada al considerar individuos homocigotos a los que presentaron una sola banda y heterocigotos a aquellos que, debido a la estructura cuaternaria de la enzima, presentaron dos o más bandas.

#### **III.5.- Análisis de datos.**

Los datos fueron analizados con el programa Biosys-1 (Swofford y Selander, 1981). Un locus se consideró polimórfico si la frecuencia del alelo más común no excedió del 95%. La heterocigosis media observada y esperada sobre todos los loci se calculó de acuerdo a la fórmula insesgada de Nei (1978). El número promedio de alelos por locus se calculó como la media aritmética de los alelos en el total de loci revelados. Se realizaron pruebas t para evidenciar diferencias significativas entre las heterocigosis observadas y esperadas dentro de cada muestra. Se realizaron pruebas de bondad de ajuste de  $\chi^2$  en todos los loci variables para determinar si los loci polimórficos se encontraban en equilibrio genético con respecto a la Ley de Hardy-Weinberg. En los loci en donde se encontró desequilibrio se determinó qué fenotipos fueron los responsables de dicho desequilibrio mediante el programa HW-QuickCheck (Kalinowski, 2006).

De manera complementaria, se determinó la deficiencia o exceso de heterocigotos por medio del estimador  $D=H_o-H_e/H_e$ . Se midió el índice de endogamia ( $F_{is}$ ) en relación a las frecuencias alélicas (Wright, 1965). Se probó la hipótesis nula  $F_{is}=0$  por medio de  $\chi^2=F_{is}^2 N (k-1)$ , con  $k(k-1)/2$  grados de libertad, en donde k denota el número de alelos diferentes y N el número de organismos (Li y Horvitz, 1953).

#### IV.- RESULTADOS.

En los organismos analizados de *Crassostrea gigas*, los 10 sistemas enzimáticos probados revelaron 16 loci con resolución adecuada para ser interpretados. De los 16 loci, 12 resultaron polimórficos bajo el criterio de 0.95 (*AAT-2\**, *AKP\**, *EST-2\**, *EST-3\**, *EST-4\**, *IDH-1\**, *IDH-2\**, *LAP\**, *PEP-1\**, *PEP-2\**, *PGM-1\**, *PGM-2\**) y cuatro monomórficos (*AAT-1\**, *ACP\**, *ADH\**, *GDH\**). *EST-1\** no fue tomado en cuenta debido a la mala resolución que presentó en todos los organismos.

Los organismos triploides de *C. gigas* fueron corroborados en los zimogramas del locus *LAP\**, donde se pudo observar la presencia de heterocigotos de tres bandas en ocho de los 70 organismos analizados (Fig. 1), pero estuvieron ausentes otros fenotipos esperados (Fig. 2). Leucinamino peptidasa es una enzima monomérica en su estructura cuaternaria que se debe presentar en organismos diploides con una banda en homocigotos y dos en heterocigotos. Estos heterocigotos de tres alelos no fueron tomados en cuenta para el análisis y sólo en este locus se presentaron triples heterocigotos.

En el caso de *C. corteziensis*, en los 9 sistemas enzimáticos, se revelaron 13 loci, con un resultado polimórfico en ocho de ellos, estos son: *AAT-1\**, *AAT-2\**, *EST-2\**, *LAP\**, *PEP-1\**, *PEP-2\**, *PGM-1\** *PGM-2\**, y cinco fueron monomórficos (*ACP\**, *AKP\** *IDH-1\**, *IDH-2\**, *MEZ-1\**). Para esta especie, a los sistemas *EST-1\**, *EST-3\**, *EST-4\** y *MEZ-2\** no se les aplicó el análisis estadístico ya que no presentaron una adecuada resolución en el patrón de bandeo.

En la tabla II se resume la variabilidad genética de ambas especies. El tamaño promedio de muestra por locus para *C. gigas* fue de  $66.8 \pm 2.8$  y de  $69.2 \pm 2.6$  para *C. corteziensis*. El número promedio de alelos por locus para *C. gigas* fue de  $2.4 \pm 0.2$  y de  $2.5 \pm 0.4$  para *C. corteziensis*. El porcentaje de loci polimórficos fue de 75 para *C. gigas* y 61.5 para *C. corteziensis* utilizando el criterio de 0.95. La heterocigosis promedio esperada y observada para *C. gigas* fue de  $0.350 \pm 0.066$  y  $0.309 \pm 0.072$  respectivamente, sin diferencia significativa entre ellas. Mientras que la heterocigosis promedio esperada y observada para *C. corteziensis* fue de  $0.294 \pm 0.080$  y  $0.065 \pm 0.024$  respectivamente, siendo estadísticamente diferentes ( $p=0.001$ ).



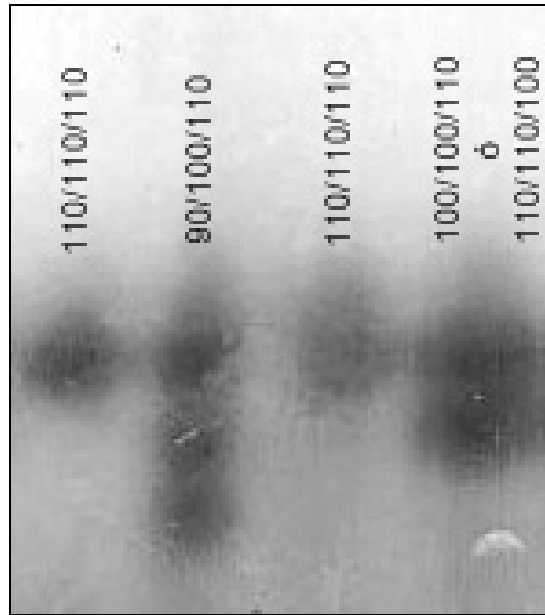


Figura 1. Fenotipos presentes en el locus *LAP\** de cuatro organismos triploides de *C. gigas*, de acuerdo con el patrón de bandeo observado.

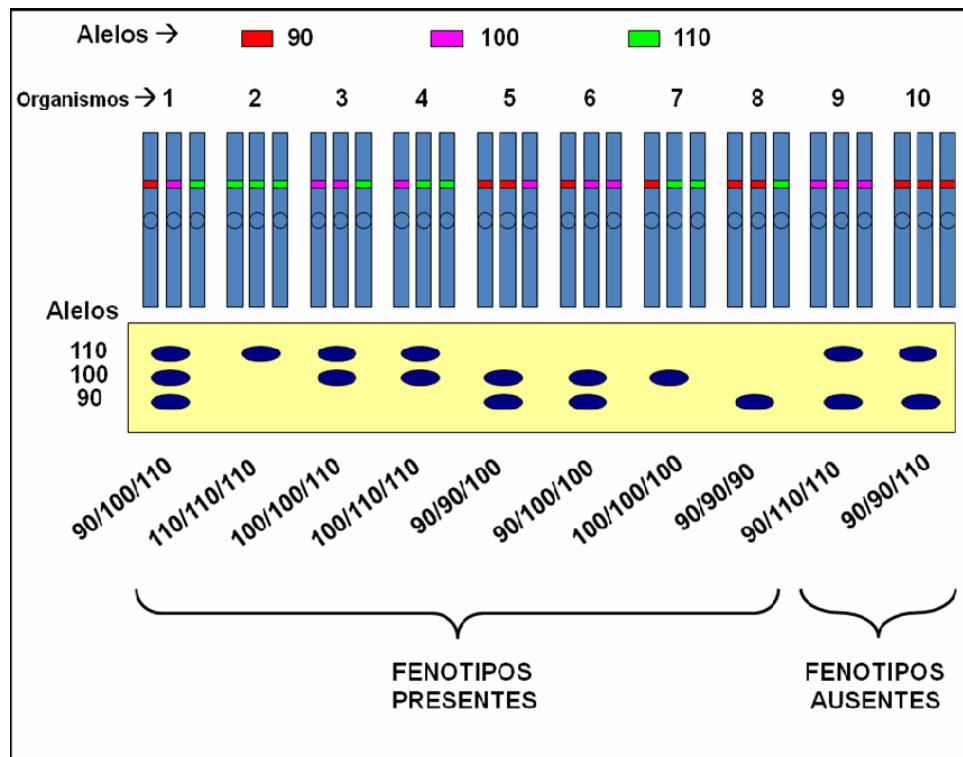


Figura 2. Esquema de representación de los fenotipos presentes y ausentes en el locus *LAP\** en organismos triploides de *C. gigas*.

Tabla II. Variabilidad genética alozímica de *Crassostrea gigas* triploide y *Crassostrea corteziensis* diploide cultivados en Sonora.

	<i>C. gigas</i>	<i>C. corteziensis</i>
Número de organismos analizados	78	78
Número de loci analizados	16	13
Tamaño promedio de muestra por locus	66.8 (2.8)	69.2 (2.6)
Número promedio de alelos por locus	2.4 (0.2)	2.5 (0.4)
Número de loci polimórficos (criterio del 0.95)	12	8
Porcentaje de loci polimórficos	75	61.5
Heterocigosis promedio ( <i>H</i> )		
<i>H</i> Observada	0.309 (0.072)	0.065 (0.024)
<i>H</i> Esperada	0.350 (0.066)	0.294 (0.080)

Error estándar entre paréntesis.

En la tabla III se muestran los loci polimórficos para *C. gigas*. La heterocigosis esperada por locus fluctuó entre 0.143-0.731 y la heterocigosis observada por locus estuvo entre 0.101-0.768. Para *C. corteziensis* la heterocigosis esperada por locus estuvo entre 0.141-0.695 y la heterocigosis observada por locus osciló entre 0.014-0.319 (Tabla IV).

El análisis de las frecuencias fenotípicas de los 12 loci polimórficos de *C. gigas* mostró que sólo 3 loci (*AKP\**, *EST-2\** y *PEP-1\**) están en equilibrio de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg. Los loci en desequilibrio mostraron que varios fenotipos están en desequilibrio dentro de estos (Tabla V). En el caso de *C. corteziensis* los 8 loci polimórficos se encontraron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg, y son responsables de este desequilibrio la gran mayoría de los fenotipos de estos loci, los cuales se pueden apreciar en los valores de significancia (Tabla VI).

Se realizó otra prueba para los loci polimórficos que presentaron más de dos alelos agrupándolos en a) Homocigotos para el alelo más común, b) Heterocigotos para el alelo más común y c) Otros, para homocigotos y heterocigotos de alelos diferentes del más común. En esta prueba de fenotipos agrupados para *C. gigas*, sólo *EST-2\** se mantuvo en equilibrio y ahora aparecen con equilibrio *AAT-2\**, *EST-4\** y *LAP\**, los cuales presentaron desequilibrio en la prueba de fenotipos sin agrupar (Tabla VII). Para *C. corteziensis*, al agrupar los fenotipos, todos se encontraron nuevamente fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg, igual que en la prueba de fenotipos sin agrupar, lo cual se puede apreciar con los valores de significancia (Tabla VIII).

Los valores del coeficiente *D* fueron negativos para la mayoría de los loci (9 de los 12) en *C. gigas*; se corrobora la deficiencia de heterocigotos y esto a su vez se ve reflejado en el valor promedio de endogamia de 0.133. Este valor de endogamia afectó a los loci *IDH-1\**, *IDH-2\**, *PEP-2\**, *PGM-1\** y *PGM-2\** por los valores altos y altamente significativos de *Fis*. Solo *AAT-2\**, *EST-3\** y *PEP-2\** tuvieron valores positivos del coeficiente *D* (Tabla IX). El desequilibrio del modelo de Hardy-Weinberg en *C. corteziensis* estuvo dado por una deficiencia de heterocigotos, corroborados por los valores negativos del coeficiente *D* y los valores altos de *Fis* con alta significancia estadística, esto como consecuencia de la endogamia que afecta a todos los loci analizados y que presentó un valor promedio de 0.777 (Tabla X).

Tabla III. Frecuencias alélicas, heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada insesgada ( $H_e$ ) según el equilibrio de Hardy-Weinberg, número de organismos analizados (N) por locus polimórfico en *Crassostrea gigas* triploide cultivado en Sonora.

Locus	Alelos	Frecuencias alélicas	$H_e$	$H_o$	N
<i>AAT-2*</i>	100	0.375	0.731	0.768	56
	85	0.321			
	63	0.179			
<i>AKP*</i>	100	0.923	0.143	0.128	78
	113	0.77			
<i>EST-2*</i>	100	0.455	0.683	0.657	67
	106	0.172			
	90	0.276			
	85	0.097			
<i>EST-3*</i>	100	0.493	0.612	0.667	69
	90	0.355			
	110	0.152			
<i>EST-4*</i>	100	0.801	0.330	0.315	73
	126	0.171			
	70	0.027			
<i>IDH-1*</i>	100	0.691	0.478	0.171	76
	105	0.138			
	95	0.171			
<i>IDH-2*</i>	100	0.862	0.243	0.101	69
	110	0.123			
	85	0.014			
<i>LAP*</i>	100	0.479	0.626	0.586	70
	110	0.343			
	90	0.179			
<i>PEP-1*</i>	100	0.689	0.433	0.356	45
	78	0.311			
<i>PEP-2*</i>	100	0.628	0.538	0.744	43
	82	0.233			
	117	0.140			

Tabla III. Continuación.

Locus	Alelos	Frecuencias alélicas	<i>He</i>	<i>Ho</i>	N
<i>PGM-1*</i>	100	0.640	0.506	0.293	75
	95	0.287			
	110	0.073			
<i>PGM-2*</i>	100	0.833	0.280	0.158	57
	85	0.167			

Tabla IV. Frecuencias alélicas, heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada insesgada ( $H_e$ ) según el equilibrio de Hardy-Weinberg, número de organismos analizados (N) por locus polimórfico en *Crassostrea corteziensis* diploide cultivado en Sonora.

Locus	Alelos	Frecuencias alélicas	$H_e$	$H_o$	N
<i>AAT-1*</i>	100	0.628	0.540	0.014	74
	105	0.196			
	97	0.176			
<i>AAT-2*</i>	100	0.494	0.613	0.039	77
	67	0.351			
	126	0.156			
<i>EST-2*</i>	100	0.409	0.654	0.091	55
	108	0.409			
	88	0.109			
	122	0.073			
<i>LAP</i>	100	0.901	0.182	0.099	71
	108	0.077			
	95	0.021			
<i>PEP-1*</i>	100	0.645	0.525	0.091	55
	97	0.182			
	107	0.173			
<i>PEP-2*</i>	100	0.696	0.474	0.098	51
	105	0.167			
	87	0.137			
<i>PGM-1*</i>	100	0.399	0.695	0.319	69
	95	0.304			
	108	0.239			
	112	0.022			
	87	0.036			
<i>PGM-2*</i>	100	0.926	0.141	0.095	74
	81	0.034			
	114	0.041			

Tabla V. Prueba de bondad de ajuste de  $\chi^2$ , para el equilibrio genético de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg en cada locus polimórfico de *Crassostrea gigas* triploide cultivado en Sonora. P<sub>0</sub>=significancia para cada fenotipo, P<sub>1</sub>=significancia para cada locus, ns=no significativo.

Locus	Fenotipo	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	P <sub>0</sub>	$\chi^2$	g.l.	P <sub>1</sub>
<i>AAT-2</i> *	100/100	9	8	ns	29.095	3	0.000
	100/85	24	14	ns			
	63/100	0	8	<0.001			
	85/85	0	6	0.03			
	63/85	12	6	ns			
	63/63	4	2	ns			
	<i>AKP</i> *	100/100	67	66			
100/113		10	11	ns			
113/113		1	<1	ns			
<i>EST-2</i> *	100/100	15	14	ns	6.703	6	ns
	100/106	7	11	ns			
	90/100	19	17	ns			
	85/100	5	6	ns			
	106/106	3	2	ns			
	90/106	5	6	ns			
	85/106	5	2	0.05			
	90/90	5	5	ns			
	85/90	3	4	ns			
	85/85	0	1	ns			
	<i>EST-3</i> *	100/100	11	17			
90/100		29	24	ns			
100/110		17	10	0.003			
90/90		10	9	ns			
90/110		0	8	<0.001			
110/110		2	2	ns			
<i>EST-4</i> *	100/100	48	47	ns	28.542	3	0.002
	100/126	21	20	ns			
	70/100	0	3	ns			
	126/126	1	2	ns			
	70/126	2	1	ns			
	70/70	1	<1	0.02			

Tabla V. Continuación.

Locus	Fenotipo	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	P <sub>0</sub>	$\chi^2$	g.l.	P <sub>1</sub>
<i>IDH-1*</i>	100/100	46	36	0.000	71.056	3	0.000
	100/105	9	15	0.02			
	95/100	4	18	0.000			
	105/105	6	1	<0.001			
	95/105	0	4	0.01			
	95/95	11	2	0.000			
<i>IDH-2*</i>	100/100	56	51	<0.001	157.695	3	0.000
	100/110	7	15	<0.001			
	85/100	0	2	0.02			
	110/110	5	1	<0.001			
	85/110	0	<1	ns			
	85/85	1	<1	0.007			
<i>LAP*</i>	100/100	13	16	ns	17.537	3	0.001
	100/110	28	23	ns			
	90/100	13	12	ns			
	110/110	10	8	ns			
	90/110	0	9	0.000			
	90/90	6	2	0.005			
<i>PEP-1*</i>	100/100	23	21	ns	1.498	1	ns
	78/100	16	20	ns			
	78/78	6	4	ns			
<i>PEP-2*</i>	100/100	11	17	<0.001	14.558	3	0.002
	82/100	20	13	<0.001			
	100/117	12	8	0.006			
	82/82	0	2	ns			
	82/117	0	3	0.03			
	117/117	0	1	ns			
<i>PGM-1*</i>	100/100	37	31	0.002	51.139	3	0.000
	95/100	19	28	0.01			
	100/110	3	7	0.02			
	95/95	12	6	0.001			
	95/110	0	3	0.02			
	110/110	4	<1	0.000			
<i>PGM-2*</i>	100/100	43	40	0.004	11.386	1	0.001
	85/100	9	16	0.004			
	85/85	5	2	0.004			



Tabla VI. Prueba de bondad de ajuste de  $\chi^2$ , para el equilibrio genético de acuerdo al modelo de Hardy-Weinberg en cada locus polimórfico de *Crassostrea corteziensis* diploide cultivado en Sonora. P<sub>0</sub>=significancia para cada fenotipo, P<sub>1</sub>=significancia para cada locus.

Locus	Fenotipo	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	P <sub>0</sub>	$\chi^2$	g.l.	P <sub>1</sub>
<i>AAT-1</i> *	100/100	46	29	0.000	146.170	3	0.000
	100/105	1	18	0.000			
	97/100	0	16	0.000			
	105/105	14	3	0.000			
	97/105	0	5	0.002			
	97/97	13	2	0.000			
<i>AAT-2</i> *	100/100	37	19	0.000	136.086	3	0.000
	67/100	1	27	0.000			
	100/126	1	12	0.000			
	67/67	26	9	0.000			
	67/126	1	8	<0.001			
	126/126	11	2	0.000			
<i>EST-2</i> *	100/100	21	9	0.000	120.505	6	0.000
	100/108	1	19	0.000			
	88/100	2	5	0.07			
	100/122	0	3	0.01			
	108/108	21	9	0.000			
	88/108	0	5	0.001			
	108/122	2	3	ns			
	88/88	5	1	0.000			
	88/122	0	1	ns			
	122/122	3	<1	0.0003			
<i>LAP</i> *	100/100	61	58	<0.001	58.682	3	0.000
	100/108	6	10	0.009			
	95/100	0	3	0.002			
	108/108	2	<1	ns			
	95/108	1	<1	ns			
	95/95	1	<1	0.02			
<i>PEP-1</i>	100/100	34	23	0.000	74.752	3	0.000
	97/100	2	13	0.000			
	100/107	1	12	0.000			
	97/97	8	2	0.000			
	97/107	2	3	ns			
	107/107	8	2	0.000			

Tabla VI. Continuación.

Locus	Fenotipo	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	P <sub>0</sub>	$\chi^2$	g.l.	P <sub>1</sub>
<i>PEP-2</i>	100/100	35	25	0.000	60.145	3	0.000
	100/105	1	12	0.000			
	87/100	0	10	0.000			
	105/105	6	1	<0.001			
	87/105	4	2	ns			
	87/87	5	1	<0.001			
<i>PGM-1*</i>	100/100	21	11	0.000	107.495	10	0.000
	95/100	8	17	0.002			
	100/108	5	13	0.001			
	100/112	0	1	ns			
	87/100	0	2	ns			
	95/95	13	6	<0.001			
	95/108	6	10	ns			
	95/112	2	1	ns			
	87/95	0	2	ns			
	108/108	11	4	0.000			
	108/112	0	1	ns			
	87/108	0	1	ns			
	112/112	0	<1	ns			
	87/112	1	<1	ns			
	87/87	2	<1	<0.001			
<i>PGM-2*</i>	100/100	65	63	0.04	21.960	3	0.000
	81/100	3	5	ns			
	100/114	4	6	ns			
	81/81	1	<1	ns			
	81/114	0	<1	ns			
	114/114	1	<1	ns			

Tabla VII. Frecuencia observada y frecuencia esperada de los fenotipos homocigotos, heterocigotos y otros diferentes del más común para los loci polimórficos multialélicos, y resumen de la prueba de bondad de ajuste de  $\chi^2$  de conformidad al equilibrio de Hardy-Weinberg en *Crassostrea gigas* triploide cultivado. ns=no significativo.

Locus	Fenotipo	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	$\chi^2$	g.l.	P
<i>AAT-2</i> *	Homocigotos	9	8	0.504	1	ns
	Heterocigotos	24	27			
	Otros	23	22			
<i>EST-2</i> *	Homocigotos	15	14	0.374	1	ns
	Heterocigotos	31	34			
	Otros	21	20			
<i>EST-3</i> *	Homocigotos	11	17	7.348	1	0.007
	Heterocigotos	46	35			
	Otros	12	17			
<i>EST-4</i> *	Homocigotos	48	47	0.791	1	ns
	Heterocigotos	21	23			
	Otros	4	3			
<i>IDH-1</i> *	Homocigotos	46	36	28.060	1	0.000
	Heterocigotos	13	33			
	Otros	17	7			
<i>IDH-2</i> *	Homocigotos	56	51	24.004	1	0.000
	Heterocigotos	7	17			
	Otros	6	1			
<i>LAP</i> *	Homocigotos	13	16	1.938	1	ns
	Heterocigotos	41	35			
	Otros	16	19			
<i>PEP-2</i> *	Homocigotos	11	17	14.558	1	0.000
	Heterocigotos	32	20			
	Otros	0	6			
<i>PGM-1</i> *	Homocigotos	37	31	10.299	1	0.001
	Heterocigotos	22	35			
	Otros	16	10			

Tabla VIII. Frecuencia observada y frecuencia esperada de los fenotipos homocigotos, heterocigotos y otros diferentes del más común para los loci polimórficos multialélicos, y resumen de la prueba de bondad de ajuste de  $\chi^2$  de conformidad al equilibrio de Hardy-Weinberg en *Crassostrea corteziensis* diploide cultivado.

Locus	Fenotipo	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	$\chi^2$	g.l.	P
<i>AAT-1</i> *	Homocigotos	46	29	70.902	1	0.000
	Heterocigotos	1	35			
	Otros	27	10			
<i>AAT-2</i> *	Homocigotos	37	19	70.167	1	0.000
	Heterocigotos	2	39			
	Otros	38	20			
<i>EST-2</i> *	Homocigotos	21	9	44.250	1	0.000
	Heterocigotos	3	27			
	Otros	31	19			
<i>LAP</i> *	Homocigotos	61	58	21.174	1	0.000
	Heterocigotos	6	13			
	Otros	4	1			
<i>PEP-1</i> *	Homocigotos	34	23	43.720	1	0.000
	Heterocigotos	3	25			
	Otros	18	7			
<i>PEP-2</i> *	Homocigotos	35	25	47.706	1	0.000
	Heterocigotos	1	22			
	Otros	15	5			
<i>PGM-1</i> *	Homocigotos	21	11	26.073	1	0.000
	Heterocigotos	13	33			
	Otros	35	25			
<i>PGM-2</i> *	Homocigotos	65	63	8.138	1	0.004
	Heterocigotos	7	10			
	Otros	2	<1			

Tabla IX. Coeficiente D, coeficiente de endogamia (*Fis*) en cada locus polimórfico evaluado y valor estadístico de  $\chi^2$  para la prueba de hipótesis *Fis*=0 de *Crassostrea gigas* triploide cultivado.

Locus	D	<i>Fis</i>	$\chi^2$
<i>AAT-2</i> *	0.301	-0.073	0.597
<i>AKP</i> *	-0.103	0.097	0.733
<i>EST-2</i> *	-0.038	0.031	0.193
<i>EST-3</i> *	0.089	-0.097	1.298
<i>EST-4</i> *	-0.045	0.039	0.222
<i>IDH-1</i> *	-0.642	0.639 <sup>+++</sup>	62.064
<i>IDH-2</i> *	-0.582	0.579 <sup>+++</sup>	46.263
<i>LAP</i> *	-0.064	0.058	0.470
<i>PEP-1</i> *	-0.180	0.171	1.315
<i>PEP-2</i> *	0.382	-0.398 <sup>++</sup>	13.622
<i>PGM-1</i> *	-0.421	0.417 <sup>+++</sup>	26.083
<i>PGM-2</i> *	-0.437	0.432 <sup>++</sup>	10.637
Total		0.133 <sup>+++</sup>	163.497

Significancia de la hipótesis nula *Fis*=0

<sup>+</sup>=0.01<p≤0.05

<sup>++</sup>=0.001<p≤0.01

<sup>+++</sup>=p≤0.001

Tabla X. Coeficiente D, coeficiente de endogamia (*Fis*) en cada locus polimórfico evaluado y valor estadístico de  $\chi^2$  para la prueba de hipótesis *Fis*=0 de *Crassostrea corteziensis* diploide cultivado.

Locus	D	<i>Fis</i>	$\chi^2$
<i>AAT-1</i> *	-0.975	0.975 <sup>+++</sup>	140.692
<i>AAT-2</i> *	-0.936	0.936 <sup>+++</sup>	134.918
<i>EST-2</i> *	-0.861	0.860 <sup>+++</sup>	122.034
<i>LAP</i> *	-0.459	0.455 <sup>+++</sup>	29.397
<i>PEP-1</i> *	-0.827	0.825 <sup>+++</sup>	74.868
<i>PEP-2</i> *	-0.793	0.791 <sup>+++</sup>	63.819
<i>PGM-1</i> *	-0.541	0.538 <sup>+++</sup>	79.886
<i>PGM-2</i> *	-0.331	0.326 <sup>++</sup>	15.728
Total		0.777 <sup>+++</sup>	661.342

Significancia de hipótesis nula *Fis*=0

<sup>+</sup>=0.01<p≤0.05

<sup>++</sup>=0.001<p≤0.01

<sup>+++</sup>=p≤0.001

## V.- DISCUSIÓN.

La evaluación de los recursos genéticos de una población puede ser estimada por los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones. Esta variabilidad puede ser expresada de varias formas como lo son: (1) la heterocigosis promedio; (2) el número de alelos por locus y (3) el porcentaje de loci polimórficos (De la Rosa-Vélez *et al.*, 1999; Baker, 2000). El ostión japonés posee una alta variabilidad genética ya que todos los reportes publicados para distintas poblaciones naturales de esta especie indican niveles de heterocigosis promedio superiores al 20%, lo cual supera a los valores reportados para 17 especies de la familia Ostreidae (De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991). La primera evaluación de *C. gigas* fue realizada por Buroker *et al.* (1975) con poblaciones de Mud Bay, Washington, EUA, donde los valores de heterocigosis observada fueron de 0.21. En otro trabajo, Buroker *et al.* (1979) encontraron valores de heterocigosis observada de 0.20 a 0.22 en tres poblaciones japonesas. Correa *et al.* (2004) señalan que esta especie es de las que presenta los mayores valores de heterocigosis entre los moluscos bivalvos.

Esta especie ha sido introducida exitosamente para su cultivo en Europa, América y Australia. Smith *et al.* (1986) realizaron un estudio sobre el ostión *C. gigas* introducido accidentalmente a Nueva Zelanda y encontraron que la proporción de loci polimórficos, el número promedio de alelos por locus y la heterocigosis esperada y observada fueron similares a las muestras de Japón con valores de heterocigosis observada de 0.169 a 0.195. English *et al.* (2000) analizaron la variabilidad genética de poblaciones de *C. gigas* naturalizadas en Tasmania, y luego cultivadas, también endémicas de Japón; donde las diferencias en los niveles de variación entre dichas poblaciones fueron mínimas e insignificantes. Estos autores reportaron una abundante variación con un promedio de 3.2 alelos por locus y una heterocigosis promedio de 0.30 por locus. Appleyard y Ward (2006) realizaron otro estudio de variación genética de *C. gigas* cultivado en Tasmania, comparándola con poblaciones ferales de Tasmania y poblaciones endémicas de Japón; ellos encontraron a todas las muestras muy similares en términos de alozimas.

En Sonora el ostión diploide fue introducido en los años 70's, después ya en los 80's se introdujeron ostiones triploides químicos, pero en la actualidad todos los provenientes de EUA son interploides. Sin embargo valores de heterocigosis en el ostión interploide no existen para los ostiones cultivados en México. La poca literatura disponible

se refiere en su mayoría a ostiones obtenidos químicamente. La importancia de la cruce de ostiones tetraploides con diploides en términos de variabilidad genética ofrece tema de estudio basado en las posibilidades de una mejor recombinación de genes.

La pérdida de diversidad genética en ostión japonés cultivado en granjas también ha sido documentada (Ward *et al.*, 2000). De la Rosa-Vélez *et al.* (1991) reportaron para el ostión japonés diploide cultivado en San Quintín, B.C., una heterocigosis de 0.281, no obstante, una década después, el nivel de la heterocigosis para los ostiones de la misma zona era de 0.010, 0.027 y 0.047 para los años 1999, 2000 y 2001, con polimorfismos entre 20 y 28% (Correa *et al.*, 2004). Es evidente que en poco más de 10 años, el cultivo de ostión en San Quintín, B.C. involucró organismos con una pobre variabilidad genética, si se consideran los valores de heterocigosis observada reportada por De la Rosa-Vélez *et al.* (1991) en esa misma localidad. Aunque estos trabajos no mencionan nada sobre la condición de ploidía de los organismos, se puede pensar que se trata de organismos diploides. Es de esperarse la reducción de la variabilidad genética cuando una pequeña muestra de una población natural se lleva al cultivo, en virtud de un efecto del fundador artificial. La tasa de disminución en la variabilidad depende exclusivamente del tamaño de la población de crianza cuando los factores ambientales están controlados (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1988; Appleyard y Ward, 2006). En este sentido todo apunta a que los pies de cría de *C. gigas* deben ser manejados más cuidadosamente para no presentar dichos niveles de decadencia.

En este estudio se encontró una heterocigosis observada de 0.309 en *C. gigas* triploides, similar a la variabilidad genética de poblaciones de ostiones diploides ferales australianas y las poblaciones naturales japonesas, incluso con linajes de hasta cuatro generaciones producidas en laboratorios australianos (Smith *et al.*, 1986; English *et al.*, 2000; Appleyard y Ward, 2006). Sin embargo, está por debajo de otros valores reportados para *C. gigas* triploides de EUA, donde se encontraron heterocigosis de 0.48 y 0.57 (Wang *et al.*, 2002). Esto implica que los ostiones triploides cultivados en Sonora provienen de linajes empobrecidos genéticamente, a pesar de provenir de tetraploides con cruce de diploides.

Las ventajas de los ostiones triploides son varias y desde el punto de vista acuacultural lo más relevante es el peso de las partes blandas en comparación con



organismos diploides de la misma edad. Además, al contar con tres juegos cromosómicos le confiere la capacidad de tener una mayor heterocigosis (Ward *et al.*, 2000) y por lo tanto la variedad de clases genotípicas será mayor. Sin embargo, un resultado evidente en los organismos analizados de *C. gigas* de este trabajo fue la menor heterocigosis en relación a los otros reportes ya citados antes sobre triploides, así como la carencia de triples heterocigotos, debido posiblemente a la estrategia para obtener estos organismos triploides, como se discute más adelante.

Uno de las ventajas del uso de triploides para fines acuaculturales es que evita los problemas de endogamia debido a la casi esterilidad total de los ostiones, ya que una generación de organismos no será el ancestro de la generación posterior. La producción de triploides puede darse por la cruce diploide  $\times$  tetraploide (triploides interploides) o por la supresión del cuerpo polar (particularmente del primer cuerpo polar más que del segundo). Los ostiones triploides analizados en este estudio fueron producidos por la cruce diploide  $\times$  tetraploide, por lo cual se esperaría una heterocigosis aún mas elevada. Dado el resultado obtenido, y ya señalado anteriormente, los progenitores de los organismos triploides analizados en este estudio se puede pensar que fueron poseedores de una pobre variabilidad genética. Wang *et al.* (2002) encontraron una heterocigosis 19% mayor en *C. gigas* triploides interploides, que en triploides obtenidos por la supresión del segundo cuerpo polar. En el presente estudio la heterocigosis encontrada fue incluso menor que los triploides con supresión de cuerpo polar.

El desequilibrio genético reportado en este estudio para *C. gigas*, se debe a una deficiencia de heterocigotos en seis loci y a un exceso de heterocigotos en tres de los nueve loci que están fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg. Al ser triploides se esperaría encontrar más organismos con genotipos que expresen tres alelos; y no solo los 8 triples heterocigotos encontrados en *LAP\**. Además, como son triploides, se esperarían más combinaciones en los dobles heterocigotos. Esto pudo influir en el índice de endogamia que fue de 0.133 y que se espera que sea prácticamente nulo en organismos triploides interploides.

Para atribuir las altas mortalidades presentes en los cultivos de *C. gigas* a una pérdida de variabilidad genética, se tendrían que haber encontrado heterocigosis severamente disminuidas. Aunque la heterocigosis que se encontró es menor a lo reportado

por Wang *et al.* (2002), lo reportado en el presente estudio no se puede considerar como una drástica reducción de variabilidad, toda vez que los valores encontrados están arriba de la variabilidad del ostión diploide.

Por su parte, en *C. corteziensis*, se encontraron valores de heterocigosis esperada y observada de  $0.294 \pm 0.080$  y  $0.065 \pm 0.024$  respectivamente. De los 8 loci polimórficos analizados, todos se encontraron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg. Esto se ve reflejado en el alto índice de endogamia, por la gran deficiencia de heterocigotos que existe en todos los loci. Este resultado tan alejado del equilibrio puede deberse a que en México los bancos naturales han sido extremadamente reducidos o están desapareciendo recientemente en los estados de Sonora y Sinaloa. La causa de este fenómeno no se conoce completamente, pero se le atribuye principalmente a la sobreexplotación y a la reducción del flujo de agua dulce a los estuarios (Chávez-Villalba *et al.*, 2005). Estos valores encontrados no pueden ser comparados con otros trabajos ya que no existen análisis de variabilidad genética que reporten datos de heterocigosis para esta especie a nivel de alozimas. Hasta hoy sólo hay dos estudios genéticos conducidos con alozimas en dos áreas de México para esta especie, los cuales reportaron solo un bajo polimorfismo (Hedgecock y Okasaki 1984; Rodríguez-Romero *et al.*, 1988). Cruz *et al.* (2007) reportaron un desequilibrio de la ley Hardy-Weinberg en tres de 10 loci polimórficos analizados con microsatélites para *C. corteziensis* silvestres de Sinaloa, lo cual es indicativo de que la salud genética de los bancos silvestres de esta especie no está bien.

Se refuerza entonces que los resultados del presente trabajo reflejan que los reproductores de *C. corteziensis* utilizados en este estudio poseen una baja variabilidad genética, por lo que es aconsejable realizar más estudios en diferentes poblaciones y utilizar como pie de cría organismos provenientes de poblaciones con una mejor “salud genética poblacional”.

El desequilibrio genético ha sido reportado reiteradamente en moluscos bivalvos cultivados en el noroeste del país y del el Golfo de México (Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero, 1989; Rosa-Vélez *et al.*, 1991; Correa *et al.*, 2004). Algunos estudios de genética de poblaciones han revelado ejemplos de deficiencia de heterocigotos, que podrían derivarse de (1) la fuerte selección en contra de genotipos heterocigóticos, (2) endogamia, o (3) un efecto Wahlund (deficiencia de heterocigotos debido a una muestra que esta

integrada por organismos de diferentes poblaciones). En muchos estudios, sólo la explicación de la endogamia parece ser válida (Murphy *et al.*, 1990) y en el presente estudio es posible pensar en que hubo una endogamia acumulada en los linajes diploide y tetraploide que dieron origen a los triploides analizados. Igualmente para *C. corteziensis* la endogamia puede ser responsable, junto con un pequeño número de progenitores, de la pobre variabilidad encontrada.

Con los resultados se apunta hacia fuertes recomendaciones de mejora de la semilla que es producida o importada para su cultivo, ya que la erosión genética encontrada mayormente en *C. corteziensis* podría ser un impedimento para su cultivo exitoso comercialmente, en tanto que *C. gigas* deberá presentar mejores características basadas en un buen programa de selección en linajes saludables, traídos a Sonora para su control estricto de producción comercial.

## VI.- CONCLUSIONES.

Se estimó la variabilidad genética en organismos triploides de *C. gigas* y en organismos diploides de *C. corteziensis* cultivados en Sonora. En el caso de *C. gigas* se encontró una heterocigosis promedio menor a otros estudios realizados con triploides pero similar a valores de heterocigosis reportada para diploides silvestres, lo que sugiere que las estrategias de manejo pueden ser mejoradas en el laboratorio de producción de donde provinieron las larvas del estudio.

Las pruebas realizadas para *C. corteziensis* mostraron una baja variabilidad y un alto valor del índice de endogamia, lo cual indica que la población de *C. corteziensis* de donde provinieron los reproductores se encuentra muy erosionada genéticamente y/o el número de reproductores utilizado fue muy reducido y de baja calidad.

Con los resultados obtenidos se rechaza la hipótesis de trabajo donde se plantea que los ostiones cultivados en el estado de Sonora presentan bajos niveles de variabilidad genética para el caso de *C. gigas*, y se acepta dicha hipótesis para *C. corteziensis*.

## **VII. RECOMENDACIONES.**

Mediante los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda para el caso de *C. gigas* buscar linajes diploides con una buena estructura genética y un buen nivel de heterocigosis o implementar la producción de triploides interploides o triploides de meiosis I para tener un control preciso de la variabilidad y no depender de proveedores externos que ofertan un producto con variabilidad desconocida.

Se recomienda también realizar más estudios genéticos para las poblaciones de *C. corteziensis* naturales de Sonora y Sinaloa, para la evaluación de este recurso y la obtención como pie de cría, organismos provenientes de poblaciones con mejor variabilidad genética, ya que esta especie representa una producción alternativa para la industria ostrícola.

## VIII.- LITERATURA CITADA.

- Abreu-Grobois, A. 1983. Population Genetics of Artemia. Tesis doctoral, University College of Swansea, England.
- Aebersold, P.B., G.A. Winans, D.J. Teel, G.B. Miner y F.M. Utter. 1987. Manual for starch gel electrophoresis: A method for the detection of genetic variation. NOAA Technical Report. NMFS 61, 19 pp.
- Álvarez-Jurado, A. 1987. Genética y acuicultura. pp: 1-31. En: Espinosa de los Monteros, J. y U. Labarta (Eds.), Genética en Acuicultura. Industrias Gráficas España, S. L., Madrid.
- Appleyard, S.A. y R.D. Ward. 2006. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 254: 148-159.
- Ayala, F.J., D. Hedgecock, G.S. Zummalt y J.W. Valentine. 1973. Genetic variation in *Tridacna maxima*, an ecological analog of some unsuccessful evolutionary lineages. *Evolution*, 37: 177-191.
- Baker, A.J. 2000. Protein Electrophoresis. pp: 65-88. En: Baker, A. J. (Ed.), *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell-Science. Oxford.
- Baqueiro, E. 1991. Culture of *Crassostrea corteziensis* in Mexico. pp: 113-116. En: Mendel, W. (Ed.), *Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture*. CRC Press. Florida.
- Benzie, J.A.H. y S.T. Williams. 1996. Limitations in the genetic variation of hatchery produced batches of the giant clam, *Tridacna gigas*. *Aquaculture*, 139: 225-241.

- Buroker, N., H.W. Hershberg y K. Chew. 1975. Genetic variation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 32: 2471-2477.
- Buroker, N., H.W. Hershberg y K. Chew. 1979. Populations genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. Marine Biology, 54: 157-179.
- Chávez-Villalba, J., M. López-Tapia, J. Mazón-Suástegui y M. Robles-Mungaray. 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, Mexico. Aquaculture Research, 36: 1337-1344.
- CONAPESCA 2004. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA/SAGARPA 2004).
- Correa, F., E. Collins, A. Ocegüera, B. Cordero y D. Domínguez. 2004. Variación alozímica del ostión japonés *Crassostrea gigas* en Bahía San Quintín, Baja California, México. Ciencias Marinas, 30(1A): 89-97.
- Cruz, P., B. Yáñez-Jacome, A.M. Ibarra y J. Rangel-Becerril. 2007. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific pleasure oyster, *Crassostrea corteziensis*, and their cross-species amplification in four other oyster species. Molecular Ecology Notes, 7: 448-450.
- De la Rosa-Vélez, J., M.T. Gutiérrez-Wing y R. Radilla-Camacho. 1991. El ostricultivo de Bahía de San Quintín, BC, México; Aspectos genéticos. Ciencias Marinas, 17(3): 133-145.

- De la Rosa-Vélez, J., R. Escobar, F. Correa y E. Félix. 1999. High Allozyme variation and genetic similarity of two populations of commercial penaeids, *Penaeus brevisrostris* (Kingsley) and *P. vannamei* (Boone), from the Gulf of California. *Aquaculture Research*, 30: 459-463.
- De la Rosa-Vélez, J. y F. Rodríguez-Romero. 1988. Aplicabilidad de las mediciones de variabilidad genética a la pesquería del ostión americano *Crassostrea virginica* (Gmelin) del Golfo de México. *Ciencias Marinas*, 14(4): 43-56.
- De la Rosa-Vélez, J. y F. Rodríguez-Romero. 1989. Enfoque genético para el análisis de las poblaciones de recursos pesqueros: el caso de la población ostrícola de la laguna de Términos, Campeche. pp: 255-284. En: Rosa-Vélez J. de la y F. González-Farías (Eds.), *Temas de Oceanografía Biológica en México*. U.A.B.C.
- English L.J., G.B. Maguire y R.D. Ward. 2000. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia, *Aquaculture*, 187: 283-298.
- Gall, G.A.E. 1988. Inbreeding. pp: 47-87. En: Ryman, N. y F. Utter, (Eds.), *Population Genetics and Fishery Management*. University of Washington Press. Seattle.
- GIIMB, 2008. Determinación de Agentes Causales de Alta Mortalidad en los Cultivos de Ostión Japonés, *Crassostrea gigas*, de las Costas de Sonora. Instituto de Acuacultura del Estado de Sonora. 147 pp.
- Grant, W.S., D.J. Teel y T. Kobayashi. 1984. Biochemical population genetics of the Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) and comparison with Atlantic halibut (*H. hippoglossus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41: 1083-1088.



- Grijalva-Chon, J.M., J. De la Rosa-Vélez y O. Sosa-Nishizaki. 1996. Allozyme variability in two samples of swordfish, *Xiphias gladius* in the North Pacific Ocean. Fishery Bulletin, 94: 589-594.
- Hedgecock, D. y F. Sly. 1990. Genetic drift and effective population sizes of hatchery-propagated stocks of Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Aquaculture, 88: 21-38.
- Hedgecock, D. y N.B. Okasaki. 1984. Genetic diversity within and between populations of American oysters (*Crassostrea*). Malacologia, 25: 535-544.
- Hoelzel, A.R. y D.R. Bancroft. 1992. Statistical analysis of variation. pp: 297-305. En: Hoelzel, A.R. (Ed.), Molecular Genetic Analysis of Populations. A practical Approach. IRL Press. Oxford, U.K.
- IUBNC (International Union of Biochemistry, Nomenclature Committee). 1984. Enzyme nomenclature. Academic Press, Orlando, Florida, 646 pp.
- Kalinowski, S.T. 2006. HW-QUICKCHECK: an easy-to-use computer program for checking genotypes for agreement with Hardy-Weinberg expectations. Molecular Ecology Notes, 6: 974-979.
- Klug, W.S. y M.R. Cummings. 1999. Conceptos de Genética. Quinta edición. Prentice Hall, España.
- Li, C.C. y D.G. Horvitz. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. American Journal of Human Genetics, 5: 107-117.
- Martínez, P. 2005. Aplicaciones de la genética para la mejora de la acuicultura. Boletín del Instituto Español de Oceanografía, 21(1-4): 225-238.

- May, B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. pp: 1-27. En: Hoelzel, A.R. (Ed.), Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach. IRL Press. Oxford, U.K.
- Müller-Starck, G. 2001. Isozymes. pp: 75-81. En: Kary, A., P.G. Issac y D.S. Ingram (Eds.), Molecular Tools for Screening Biodiversity. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Murphy, R.W., J.W. Sites, D.G. Buth, y C.H. Haufler. 1990. Proteins I: Isosyme electrophoresis. Pp: 45-126. En: Hillis D.M. y C. Moritz, (Eds.), Molecular Systematics. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Nei, M. 1978. Estimation of average Heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Ozaki, H. y Y. Fujio. 1985. Genetic differentiation in geographical populations of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) around Japan. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 36(1): 49-61.
- Ramos-Paredes, J. y J.M. Grijalva-Chon. 2003. Allozyme genetic analysis in hatchery strains and wild blue shrimp, *Pennaeus (Litopenaeus) stylirostris* (Stimpson), from the Gulf of California. *Aquaculture Research*, 34: 221-234.
- Redfield, B.J. y J.P. Salini. 1980. Techniques of starch-gel electrophoresis of penaeid prawn enzymes (*Penaeus spp.* and *Metapenaeus spp.*) CSIRO. División of Fisheries and Oceanography. Cronulla, SSW, 116: 1-20.
- Ridway, V.M., S.W. Sherbune y R.D. Lewis. 1970. Polimorphisms in the esterases of Atlantic Herring. *Transaction of the American Fisheries Society*, 99: 147-151.

- Rodríguez-Romero, F., C. García-Saez y A. Laguarda-Figueras. 1988. Electrophoretic patterns variation in two oyster populations of *Crassostrea corteziensis* from the Mexican coast. *Anales del Centro de Ciencias del Mar y Limnología*, Universidad Nacional Autónoma de México, 15: 177-184.
- Schaal, B.A. y W.W. Anderson. 1974. An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the American Oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Technical Report Series. Georgia Marine Sciences Center 74.
- Shaklee, J.B., F.W. Allendorf, B.C. Morizot y G.S. Whitt. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Transaction of the American Fisheries Society*, 119: 2-15.
- Shaw, C.R. y A.L. Koen. 1968. Starch gel zone electrophoresis of enzymes pp: 325-364. En: Smith, I. (Ed.), *Chromatography and Electrophoresis*. Interscience Publishers. New York.
- Shaw, C.R. y R. Prasad. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochemical Genetic*, 4: 297-320.
- Smith, P.J., H. Ozaki y Y. Fujio. 1986. No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 20: 562-574.
- Swofford, D. y R. Selander. 1981. BIOSYS-1: A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetic and systematics. *Journal of Heredity*, 72: 281-283.
- Tanaka, Y. 1975. Oyster Culture Techniques. En: *Outline of Aquaculture*. Japan International Cooperation Agency Government of Japan. 164 pp.

- Tracey, M.L., K. Nelson, D. Hedgecock, R.A. Shleser y M.L. Pressick. 1975. Biochemical genetics of lobster: Genetic variation and the structure of American lobster (*Homarus americanus*) populations. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 32: 2091-2101.
- Utter, F., P. Abersold y G. Winans. 1988. Interpreting genetic variation detected by electrophoresis. pp: 21-45. En: Ryman, N. y F. Utter, (Eds.), Population Genetics and Fishery Management. University of Washington Press. Seattle.
- Varela-Romero A. y J.M. Grijalva-Chon. 2004. Allozyme evidence of the bigeye croaker (*Micropogonias megalops*) fishery collapse in the upper Gulf of California. Bulletin of the Southern California Academy of Science, 103(2): 66-78.
- Wang, Z., X. Guo, S.K. Allen y R. Wang. 2002. Heterozygosity and body size in triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg, produced from meiosis II inhibition and tetraploids. Aquaculture, 204: 337-348.
- Ward, R.D., L.J. English, D.J. McGoldrick, G.B. Maguire, J.A. Nell y P.A. Thompson. 2000. Genetic improvement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Australia. Aquaculture Research, 31: 35-44.
- Wright, S. 1965. The interpretation of populations structure by F-statistics with special regard to system of mating. Evolution, 19: 395-420.

## IX.- APÉNDICES.

### IX.1.-Apéndice 1.- Soluciones amortiguadoras para la electroforesis.

#### Amortiguador C

Electrodo:  
Tris 0.087 M  
Ácido bórico 0.0087 M  
EDTA 0.001 M  
pH 9.0  
Gel:  
El mismo del electrodo

#### Amortiguador D

Electrodo:  
Tris 0.135 M  
Ácido cítrico 0.045 M  
EDTA 0.0012 M  
pH 7.0  
Gel:  
Tris 0.009 M  
Ácido cítrico 0.003 M  
EDTA 0.0012 M  
pH 7.0

#### Amortiguador F

Electrodo:  
Tris 0.155 M  
Ácido cítrico 0.043 M  
pH 7.0  
Gel:  
Diluir 66.7 ml del buffer  
del electrodo a 1 litro pH  
7.0

#### Amortiguador J

Electrodo:  
LiOH 0.06 M  
Ácido bórico 0.3 M  
pH 8.1  
Gel:  
1 ml del buffer del  
electrodo en 1000 ml de  
una solución de  
Tris 0.03 M  
Ácido cítrico 0.005 M  
pH 8.5

#### Amortiguador K

Electrodo:  
Tris 0.135 M  
Ácido cítrico 0.045 M  
pH 7.0  
Gel:  
Tris 0.009 M  
Ácido cítrico 0.003 M  
pH 7.0

**IX.2.- Apéndice 2.-** Mezclas reveladoras de los sistemas proteicos y soluciones stock empleadas.

Nota.- Es recomendable hacer la mezcla de los reactivos secos con las soluciones o el agua 20 minutos antes de finalizar la electroforesis, a menos que se indique algo diferente.

**1.- Alcohol deshidrogenasa ADH (1.1.1.1)**

- Etanol 95% 2.5 ml
- NAD 0.025 g
- MTT 1% 1.5 ml
- PMS 0.1% 1 ml
- Amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 5 ml
- Agua 40 ml

Incubar a 37°C hasta que se visualicen las bandas. Fijar y registrar.

**2.- Asparto amino transferasa AAT (2.6.1.1)**

- Solución sustrato AAT pH 7.4 25 ml
- Agua 25 ml

Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (con 45 ml de la solución sustrato diluida), realizar la post-uni6n.

POST-UNI6N: tomar 5 ml de la mezcla de la soluci6n de sustrato + agua y agregarle:

- Azul r1pido BB 0.125 g

Incorporar la mezcla con el pigmento. Incubar a temperatura ambiente hasta que se definan las bandas teniendo cuidado de fijar antes de que se oscurezca el gel (aproximadamente 30 min.) y registrar.

Soluci6n sustrato AAT pH 7.4

- 1cido  $\alpha$  cetoglut1rico 0.01825 g
- 1cido L-aspartico 0.0665 g
- Polivinil pirrolidona 0.25 g
- EDTA-Na<sub>2</sub> 0.025 g

- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.71 g
- Agua 25 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por un mes.

### 3.- Citosol dipeptidasa PEP (3.4.13.18)

- Glycyl-leucin 0.025 g
- Peroxidasa 0.01 g
- O-dianisidina 0.0075 g
- Aminoácido oxidasa 0.01 g

Incubar a 37°C hasta que se definan las bandas. Fijar y registrar.

### 4.- Enzima málica MEZ (1.1.1.40)

- NADP 0.01 g
- NBT 0.01 g
- Solución sustrato MDH 2.5 ml
- PMS 0.1% 10 ml
- MgCl<sub>2</sub> 10% 0.1 ml
- Tris-HCl 0.1 M pH 8.4 1.0 ml
- Agua 27.5 ml

Incubar en oscuridad a 37°C hasta que se definan las bandas, fijar y registrar.

Solución sustrato MDH

- DL-ácido málico 1.34 g
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M 4.9 ml
- Agua 5.1 ml

### 5.- Esterasa EST (3.1.1.1)

- Solución sustrato EST 1.5 ml
- Tris-HCl 0.5 M pH 7.1 5 ml
- Agua 43.5 ml

Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, realizar una post-uniión.

POST-UNIÓN: a 5 ml de agua agregarle:

- Azul rápido BB 0.05 g

Incorporar la mezcla con el pigmento. Incubar a temperatura ambiente hasta que se definan las bandas. Fijar y registrar.

Solución sustrato EST

- 1-Naftil acetato 0.05 g
- 2-Naftil acetato 0.05 g
- Acetona 2.5 ml
- Agua 2.5 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por 15 días.

#### **6.- Fosfatasa ácida ACP (3.1.3.2)**

- 1-naftil fosfato ácido 0.05 g
- Amortiguador de acetatos 0.05 M pH 5.0 50 ml

Después de 15 minutos de incubación a 37°C realizar una post-uniión.

POST-UNIÓN: a 5 ml de amortiguador de acetatos agregarle:

- Azul rápido BB 0.05 g

Incorporar la mezcla con el pigmento. Incubar a 37°C hasta que se definan las bandas. Fijar y registrar.

#### **7.- Fosfatasa alcalina AKP (3.1.3.1)**

- 1-naftil fosfato ácido 0.025 g
- Sulfato de magnesio anhidro 0.030 g
- Amortiguador de boratos pH 9.7 50 ml

Después de 15 minutos de incubación a 37°C realizar una post-uniión.

POST-UNIÓN: a 5 ml del amortiguador de boratos agregarle:

- Azul rápido BB 0.025 g

Incorporar la mezcla con el pigmento. Incubar a 37°C hasta que se definan las bandas. Fijar y registrar.



### 8.- Fosfoglucomutasa PGM (5.4.2.2)

• $\alpha$ -D-glucosa 1 fosfato	0.25 g
• EDTA-Na <sub>2</sub>	0.025 g
• NBT	0.01 g
• NADP	0.005 g
• Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (100 u/ml)	0.4 ml
• MgCl <sub>2</sub> 10%	0.1 ml
• Tris-HCl 0.1 M pH 7.1	48.5 ml

Incubar a 37°C hasta que se visualicen las bandas. Fijar y registrar.

### 9.- Glutamato deshidrogenasa GDH (1.4.1.3)

• NAD	0.025 g
• Solución sustrato GDH	2.5 ml
• MTT 1%	1.5 ml
• PMS 0.1%	1 ml
• Amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7.0	12.5 ml
• Agua	32.5 ml

Incubar a 37°C hasta visualizar las bandas. Fijar y registrar.

Solución sustrato GDH

• Glutamato de sodio	0.425 g
• Amortiguador de fosfato 0.5 M pH 7.0	10 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por un mes.

### 10.- Isocitrato deshidrogenasa IDH (1.1.1.42)

• Isocitrato de sodio	0.07 g
• NBT	0.01 g
• NADP	0.015 g
• PMS 0.1%	1 ml
• MgCl <sub>2</sub> 10%	0.2 ml

- Tris-HCl 0.1M pH 8.0 48.8 ml

Incubar a 37°C, el revelado puede requerir varias horas. Fijar y registrar.

### 11.- Leucinamino peptidasa LAP (3.4.11.1)

- L-leucil  $\beta$ -naftilamida 0.01 g
- Tris-maleato pH 6.0 25 ml
- Agua 25 ml

Después de 15 minutos de incubación a 37°C realizar una post-unión.

POST-UNIÓN: a 5 ml de agua agregarle:

- Sal rápida negra K 0.025 g

Incorporar la mezcla con el pigmento. Incubar a 37°C hasta que se definan las bandas. Fijar y registrar.

SOLUCIONES STOCK EMPLEADAS.

#### Solución homogenizadora

- Solución Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 100 ml
- NAD 0.01 g
- NADP 0.01 g
- PVP 1.0 g

Utilizar la solución homogenizadora recién preparada cada vez que se requiera. Mantener en refrigeración o en una cama de hielo al realizar el homogenizado de los tejidos.

#### Solución fijadora y desteñidora

- Metanol 600 ml
- Ácido acético 200 ml
- Agua 1200 ml

Almacenamiento a temperatura ambiente. Puede ser recuperada y utilizada varias veces.

**MgCl<sub>2</sub> 10%**

- MgCl<sub>2</sub> 1.0 g
- Agua 10 ml

Almacenamiento a temperatura ambiente.

**PMS 0.1%**

- PMS 0.01 g
- Agua 10 ml

Almacenamiento en refrigeración, en un recipiente adecuado para no exponer la solución a la luz. Actividad por 15 días.

**MTT 1%**

- MTT 0.25 g
- Agua 25 ml

Almacenamiento en refrigeración, en un recipiente adecuado para no exponer la solución a la luz. Actividad por 15 días.

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2M**

- Carbonato de sodio 21.2 g
- Agua 100 ml

Almacenamiento a temperatura ambiente.

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M**

- Carbonato de sodio 10.6 g
- Agua 100 ml

Almacenamiento a temperatura ambiente.

**NaOH 1M**

- Hidróxido de sodio 2.0 g
- Agua 50 ml

Almacenamiento a temperatura ambiente.

### **Tris-HCl 0.1 M**

- Tris 1.211 g
- Agua 100 ml

Ajustar al pH deseado con HCl. Almacenamiento en refrigeración hasta por seis meses.

### **Tris-HCl 0.5 M**

- Tris 6.055 g
- Agua 100 ml

Ajustar al pH deseado con HCl. Almacenamiento en refrigeración hasta por seis meses.

### **Amortiguador de acetatos 0.05 M pH 5.0**

- Acetato de sodio trihidratado 0.6805 g
- Agua 100 ml

Ajustar el pH con ácido acético. Almacenamiento a temperatura ambiente.

### **Amortiguador de boratos pH 9.7**

- Ácido bórico 0.935 g
- NaOH 1 M 12.5 ml
- Agua 250 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por seis meses.

### **Tris maleato pH 6.0**

#### Solución A

- Tris 1.21 g
- Ácido maléico 1.16 g
- Agua 50 ml

Almacenamiento en refrigeración hasta por seis meses.

#### Solución B

- NaOH 0.4 g
- Agua 50 ml

Almacenamiento a temperatura ambiente.

Mezclar 50 ml de la solución A con 26 ml de la solución B y aforar a 200 ml. Ajustar el pH a 6.0. Almacenamiento de la mezcla hasta por un mes en refrigeración.

### **Amortiguador de fosfatos 0.5 M pH 7.0**

Solución A ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5 M)

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anhidro) 14.196 g
- Agua 200 ml

Solución B ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.5 M)

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (monohidratado) 3.45 g
- Agua 50 ml

Ajustar el pH a 7.0 titulando la solución B con la solución A.

Almacenamiento de la solución A, B y la mezcla a temperatura ambiente.