

VARIABILIDAD GENÉTICA EN ADN MICROSATÉLITE DE UN NUEVO LINAJE DE OSTIÓN (*Crassostrea gigas*) EN SONORA

GENETIC VARIABILITY IN MICROSATELLITE DNA OF A NEW STRAIN OF PACIFIC OYSTER (*Crassostrea gigas*) IN SONORA

José Manuel Grijalva-Chon^{1,*}, Ovidio Izaguirre-Castro^{1,2}, Reina Castro-Longoria¹, Marco Antonio López-Torres¹ y Francisco Hoyos-Chairez³.

¹Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad de Sonora. Ave. Colosio s/n, entre Reforma y Sahuaripa. Hermosillo, Sonora, México 83000 | ²Dirección actual: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria. Laboratorio Especializado de Biología Molecular. Calle Esteban Sarmiento No.35, Col. Matanza, Hermosillo, Sonora, México 83080 | ³Centro Reproductor de Especies Marinas. Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora. Centro de Gobierno, Edificio Sonora. Hermosillo, Sonora, México 83000

RESUMEN

Se evaluó la variabilidad genética en seis loci microsatelitales de dos generaciones consecutivas de un nuevo linaje de *Crassostrea gigas* que se pretende establecer en los cultivos del Golfo de California. Se detectaron un total de 66 alelos y 146 genotipos en la muestra del conjunto parental y 68 alelos y 168 genotipos en la muestra de la generación F1. El promedio de la heterocigosis observada fue de 0,65 para la generación parental y de 0,67 para la F1, sin diferencias significativas entre ellas. Todos los loci mostraron una deficiencia de heterocigotos con excepción de *ucdCg10* en la F1, pero no se encontró evidencia de una endogamia acumulada. Se encontraron diferencias en la distribuciones de las frecuencias alélicas y genotípicas de cinco loci. El monitoreo de la variabilidad genética de organismos provenientes de laboratorios de producción no es un análisis de rutina en el proceso del control de calidad en la mayoría de los laboratorios. El análisis de microsatélites es una buena herramienta para vigilar las fluctuaciones de la heterocigosis a lo largo de la vida productiva de los linajes de cultivo.

Palabras clave: *Crassostrea gigas*, *Crassostrea corteziensis*, acuicultura, microsatélites, genética de poblaciones.

ABSTRACT

The genetic variability of two consecutive generations of a new strain of *Crassostrea gigas*, intended to be established in the Gulf of California, was evaluated at six microsatellite loci. A total of 66 alleles and 146 genotypes in the broodstock sample and 68 alleles and 168 genotypes in the F1 sample were detected. The mean observed heterozygosity was 0,65 for the broodstock and 0,67 for F1, with no significant differences between them. All loci showed a deficit of heterozygotes with the exception of *ucdCg10* in the F1, but no evidence of cumulate inbreeding was found. Five loci demonstrated differences in allelic and genotypic frequencies. The monitoring of the genetic variability in hatchery-produced organisms is not a current routine task in the quality control process of most hatcheries. Microsatellite analysis is a good tool for monitoring the heterozygosity fluctuations along the productive life of cultured strains.

Keywords: *Crassostrea gigas*, *Crassostrea corteziensis*, aquaculture, microsatellites, population genetics.

INTRODUCCIÓN

Los ostiones constituyen uno de los grupos de especies más importantes de la acuicultura marina debido a su productividad. En México, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) fue introducido en Baja California en 1973 con semilla proveniente de un laboratorio de Washington, USA (Islas, 1975; De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991) y actualmente se cultiva en los estados ribereños del Pacífico mexicano. En Sonora, el Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) es un laboratorio regional de semilla de ostión ubicado al norte de Bahía de Kino, Sonora, y produce 50 millones de semilla por año, principalmente de *C. gigas* y en menor extensión del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951). En años recientes, la industria ostrícola del Pacífico mexicano ha padecido de mortalidades masivas causadas por una mezcla de factores biológicos y ambientales como patógenos (bacterias, protozoarios y virus), altas temperaturas y salinidades, lo que ha sido una de las limitantes para el desarrollo de la actividad. Como una posible solución, el CREMES busca establecer nuevos linajes con mejores tasas de sobrevivencia.

La forma más común de crear un nuevo linaje es mediante la selección de individuos con características favorables, pero en la mayoría de los casos la selección implica un cuello de botella poblacional para poder ofrecer un producto uniforme, cuidando siempre la integridad del linaje (Rivera-García y Grijalva-Chon, 2006). Debido a esta selección, el nivel de endogamia se puede incrementar con una correspondiente pérdida de variabilidad genética, situación que puede agravarse en generaciones sucesivas, como se ha demostrado en algunos linajes de camarón (Sbordoni *et al.*, 1987; Freitas y Galetti, 2005; Rivera-García y Grijalva-Chon, 2006). Es por esto que la vida productiva o longevidad de un linaje dependerá de un correcto balance entre una alta variabilidad y una baja endogamia, lo cual es difícil de mantener, y la literatura científica no muestra evidencias de que se haya alcanzado tal logro.

*Autor para correspondencia: José Manuel Grijalva-Chon.
Correo electrónico: mgrijal@guayacan.uson.mx

Recibido: 8 de octubre de 2012
Aceptado: 10 de diciembre de 2012

La acuicultura ha ido incorporando, aunque lentamente, las nuevas herramientas de la genómica en los últimos años, siguiendo las líneas aplicadas en agricultura y ganadería. Los estudios de variabilidad genética en acuicultura son importantes ya que identifican las modificaciones genéticas sufridas al llevar a cabo la reducción del tamaño de la población mediante la siembra en granja; determinan el impacto de la selección artificial en términos de variabilidad; ayudan a mejorar los programas de selección de reproductores y pueden evitar, en un momento dado, el fracaso de una inversión económica (De la Rosa-Vélez *et al.*, 1991). Además, la información generada puede ser vital para el diseño e implementación de un manejo apropiado de las especies de interés acuícola (Rivera-García y Grijalva-Chon, 2006).

Los microsatélites son marcadores moleculares que rápidamente se han convertido en una de las herramientas más confiables y fáciles de automatizar para efectuar estudios de diversidad y estructura genética de poblaciones. Consisten en secuencias cortas de ADN, de uno a seis nucleótidos, repetidas cierto número de veces y se encuentran esparcidos por todo el genoma de los organismos eucariontes (Tautz, 1989) y procariontes (Zane *et al.*, 2002). Sintetizando oligos complementarios a las regiones flanqueantes del microsatélite, las diferencias en el número de repeticiones del microsatélite se amplificarán y visualizarán como fragmentos de ADN de diferente longitud. Cada una de las regiones microsatélites constituye un locus genético y los diferentes tamaños de bandas que se pueden amplificar constituyen los diversos alelos de ese locus (Cenic, 2000). Una de las principales utilidades de este tipo de marcador, es la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas, además la información que éstos marcadores suministran es esencial para elucidar patrones de flujo génico, variables y parámetros demográficos y estructura familiar (Milligan *et al.*, 1994).

Aun cuando el ostión japonés (y otras especies de la familia Ostreidae) es un recurso acuacultural importante, no hay estudios de seguimiento de la estructura genética en generaciones sucesivas de manera equivalente a lo que se ha realizado con el camarón cultivado, sin embargo, hay varios estudios puntuales con alozimas, microsatélites y AFLPs que se han centrado en poblaciones naturales (Ozaki y Fujio, 1985; Yang *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2008), ferales (Li *et al.*, 2003) y de cultivo (De la Rosa-Vélez, *et al.*, 1991; Launey y Hedgecock, 2001; Li *et al.*, 2006; Enríquez-Espinoza y Grijalva-Chon, 2010). Debido a que el nivel de la variabilidad genética no es una información que se proporcione por el laboratorio de origen de la semilla de ostión, el objetivo de este estudio fue evaluar la variabilidad genética a nivel de microsatélites de un nuevo linaje de *C. gigas* adquirido por el CREMES y el seguimiento de la estructura genética en la generación sucesiva con el fin de garantizar la viabilidad y la explotación comercial del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) de La Paz, Baja California Sur, México, adquirió en el 2006 un lote de semilla diploide de *C. gigas* de Francia, con un perfil genético desconocido, así como del tamaño de la generación parental. La semilla fue engordada, llevada a la madurez y reproducida en La Paz en el 2007. El CREMES adquirió un lote de esta nueva semilla y se llevó a la madurez y reproducción en el laboratorio bajo los estándares de producción del CREMES en el 2008. En el 2009 se tomó una muestra al azar de 73 organismos (peso total promedio de 166.1 ± 2.3 g) de este lote de reproductores ya que los organismos que desovaron fueron reintegrados al lote y fue imposible identificarlos de una manera confiable. De la progenie F1 obtenida en el CREMES se tomó al azar una muestra de 80 organismos, con un peso promedio de 40.2 ± 3.4 g.

A partir de 25 mg de músculo abductor se extrajo ADN por medio del juego de reactivos QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración del ADN fueron estimadas por medio de un espectrofotómetro UV Ultrospec 3300*pro*. Se analizaron los loci microsatelitales *L10*, *L48*, *Cg49*, *Cg108*, *ucdCg10* y *ucdCg14* debido a que han demostrado resultados polimórficos (Huvet *et al.* 2000; Magoulas *et al.* 1998; McGoldbrick *et al.* 2000; Launey y Hedgecock, 2001). Los oligos que los delimitan se encuentran descritos en Launey y Hedgecock (2001). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron con Ready-to-Go PCR beads (Amersham Biosciences Ltd.) en volúmenes de 12,5 µl con 0,15 ng de ADN y 10 pM de cada oligo. Las condiciones de PCR iniciaron con una desnaturalización a 94 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de un minuto a 94 °C, un minuto a la temperatura óptima de cada par de oligos (Launey y Hedgecock, 2001) y un minuto a 72 °C. Se realizó una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa de alta resolución (Sigma A4718) al 3% con solución amortiguadora TAE x1 y teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml). Los geles fueron visualizados en un digitalizador de geles MiniBIS Pro (DNR Bio-Imaging Systems).

El número de alelos por locus (*N_a*), la heterocigosis observada (*H_o*) y la esperada (*H_e*) se calcularon con el programa HW-Quickcheck (Kalinowski, 2006). Los alelos nulos, las frecuencias genotípicas y alélicas, la prueba *G*, el exceso y deficiencia de heterocigosis, el coeficiente de endogamia (*F_{is}*) y el porcentaje de loci polimórficos se evaluaron con el programa GENEPOP 4.0 (Raymond y Rousset 1995). La hipótesis nula $F_{is} = 0$ se probó por medio de $\chi^2 = F_{is}^2 N (k-1)$ con $k(k-1)/2$ grados de libertad, donde *k* denota el número de alelos diferentes y *N* el número de individuos (Li y Horvitz, 1953). Con el programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander, 1981) se obtuvo el coeficiente $D = (H_o - H_e) / H_e$ y la identidad y distancia genética insesgada de Nei (1978).

Se obtuvieron dos coeficientes de diferenciación genética. A partir de las frecuencias alélicas se calculó *F_{st}* con BIOSYS-1 y a partir del tamaño de los alelos se calculó *R_{st}* a

través de un análisis de varianza molecular con el programa GenAlEx6 (Peakall y Smouse, 2006). La hipótesis nula $F_{st} = 0$ se probó por medio de $\chi^2 = 2NF_{st}(k-1)$ con $(k-1)(s-1)$ grados de libertad, donde k denota el número de alelos diferentes y s el número de muestras (Workman y Niswander, 1970).

Para detectar el efecto de un cuello de botella poblacional se utilizó el programa Bottleneck (Cornuet y Luikart, 1996; Piry *et al.*, 1999). En una población con una severa reducción en el número de individuos, la diversidad alélica se reduce más rápido que la heterocigosis y la heterocigosis esperada (H_e) de esa población será mayor que la heterocigosis esperada en el equilibrio mutación-deriva genética (H_{eq}). En contraste, un locus genético de una población en equilibrio tendrá la misma probabilidad de tener un exceso o un déficit de H_e . El programa Bottleneck calcula para cada locus la distribución de H_e a partir de los alelos observados, asumiendo un equilibrio mutación-deriva. Se utilizó el modelo de Dos Fases (TPM) para obtener un promedio de H_{eq} , el cual se compara con H_e para determinar si hay un exceso o un déficit en la diversidad de cada locus. Las significancias estadísticas se obtuvieron por medio de una prueba de Wilcoxon.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los loci microsatelitales fueron polimórficos con una media de 11 alelos por locus en cada muestra (Tabla 1). La heterocigosis mostró diferencias ($P < 0.01$) entre los valores observados y esperados de ambas muestras, pero no se encontraron diferencias al comparar las heterocigosis entre las muestras. Otros autores han reportado que algunos linajes de ostión japonés y otras especies del género han demostrado poseer una heterocigosis similar a las poblaciones silvestres (Sekino *et al.*, 2003; Huvet *et al.*, 2000; Yu y Guo, 2005; Carlsson y Reece, 2007; Cruz *et al.*, 2007). Los valores negativos del coeficiente D para todos los loci confirmó la deficiencia de heterocigotos.

Tabla 1. Variación genética en dos generaciones de ostión japonés *Crassostrea gigas*

Table 1. Genetic variation in two generations of Pacific oyster *Crassostrea gigas*

	Lote parental	F1
No. de individuos	73	80
No. de loci analizados	6	6
Promedio de individuos por locus	64,0 (2.4)	78,3 (1,3)
Promedio de alelos por locus	11,0 (1.24)	11,33 (1,7)
Porcentaje de loci polimórficos	100	100
Heterocigosis promedio (H)		
H Observada	0,65 (0,04)	0,67 (0,05)
H Esperada	0,81 (0,02)	0,84 (0,03)

Error estándar entre paréntesis

La deficiencia de heterocigosis encontrada parece ser algo común en las poblaciones de *C. gigas* (Ozaki y Fujio, 1985) y ha sido reportada en poblaciones silvestres (Sekino *et al.*, 2003) y en otros bivalvos (Geist *et al.*, 2003; Carlsson y Reece, 2007), aun cuando se analizan por alozimas (Gaffney, 1990). Sin embargo, el origen de esta deficiencia puede ser diferente dependiendo de la presencia de alelos nulos, por un efecto Wahlund al tomar muestras silvestres o por la endogamia involucrada en linajes seleccionados en el laboratorio.

En la muestra del lote parental se detectaron 66 alelos y 146 genotipos, con un mínimo de siete alelos en el locus *Cg108* y un máximo de 15 en *ucdCg14*. En esta muestra, la heterocigosis observada por locus fue entre 0,51 y 0,74, mientras que la heterocigosis esperada fue entre 0,73 y 0,89 (Tabla 2). En la muestra F1 se encontraron 68 alelos y 168 genotipos, presentando el locus *Cg49* solo seis alelos y 17 el *ucdCg14*. La heterocigosis observada presentó valores entre 0,48 y 0,81, mientras que la esperada presentó valores entre 0,73 y 0,91. Esta cantidad de alelos y genotipos es un indicativo de que el número de loci microsatelitales analizados fue suficiente.

Tabla 2. Número de alelos por locus (N), heterocigosis observada (H_o), heterocigosis esperada (H_e) y número de individuos analizados por locus (n) en el lote parental y en F1 de *Crassostrea gigas*

Table 2. Number of alleles per locus (N), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), and number of individuals analyzed per locus (n) in the broodstock and F1 samples of *Crassostrea gigas*

Locus	Lote parental				F1			
	N	H_e	H_o	n	N	H_e	H_o	n
<i>L10</i>	13	0,85	0,69	54	15	0,90	0,79	72
<i>L48</i>	12	0,83	0,74	69	12	0,82	0,72	79
<i>Cg49</i>	11	0,76	0,51	69	6	0,73	0,48	80
<i>Cg108</i>	7	0,81	0,56	66	9	0,84	0,66	80
<i>ucdCg10</i>	8	0,73	0,69	62	9	0,86	0,81	80
<i>ucdCg14</i>	15	0,89	0,70	63	17	0,91	0,54	79

El número de alelos por locus y la heterocigosis como indicadores de variabilidad son mayores cuando se estiman por microsatélites que por alozimas (Ozaki y Fujio, 1985; Yang *et al.*, 2000; Enríquez-Espinoza y Grijalva-Chon, 2010) ya que las mutaciones silenciosas, principalmente en la tercera posición de un codón, no generan una variabilidad observable debido a la redundancia del código genético.

El número promedio de alelos por locus fue similar en ambas muestras y cercanas al valor de 10.6 reportado por Sekino *et al.*, (2003). Sin embargo, Li *et al.* (2006) y Sauvage *et al.* (2009) reportaron valores tan altos como 23,2 y 28,9 alelos por locus y Li *et al.* (2003) reportaron valores tan bajos como 5,7 alelos por locus en poblaciones ferales. El bajo número de alelos se podría explicar si el linaje se deriva, como en la mayoría de los casos, de un bajo número de organismos lo cual

disminuye la variabilidad genética. Esto es lo que se conoce como efecto fundador, con una inmediata reducción de los niveles de diversidad genética (Frankham, 1996).

Estudios sobre otras especies del género *Crassostrea* han reportado una mayor diversidad alélica: 37 alelos por locus en el ostión Americano *Crassostrea virginica* (Carlsson y Reece, 2007), 16.7 en el ostión Suminoe, *Crassostrea ariakensis* (Xiao *et al.*, 2008) y 25 en el ostión Zhe *Crassostrea plicatula* (Yu *et al.*, 2008). Sin embargo, también se han reportado valores bajos para otros moluscos: 6,8 para el mejillón *Margaritifera margaritifera* (Geist *et al.*, 2003) y 3.9 para el caracol *Taylorconcha serpenticola* (Liu y Hershler, 2009).

El intervalo de la frecuencia de los alelos nulos fue mayor en F1 (0,012 – 0,218) que en el lote de reproductores (0,052 – 0,145). El análisis estadístico (prueba G) para la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas mostró fuertes diferencias en cinco loci cuando se compararon ambas muestras. Sólo L10 no mostró diferencias en ambas frecuencias. La distancia genética y la identidad entre las muestras fueron de 0,123 y 0,884. La diferenciación genética calculada por medio de *Fst* fue pequeña (0,023) pero diferente de cero ($P < 0,001$) (Tabla 3). Lo mismo se obtuvo con *Rst* con un valor significativo de 0,049 ($P = 0,001$).

La muestra F1 mostró más alelos en cuatro loci (L10, Cg108, ucdCg10 y ucdCg14) y más genotipos que la muestra parental. La diferencia en la estructura genética entre ambas muestras, evidenciada por *Fst*, *Rst* y la distribución de frecuencias alélicas y genotípicas es un indicativo del muestreo aleatorio en el lote parental. Debido a la naturaleza aleatoria de la muestra parental, la cual se compone de una proporción desconocida de progenitores verdaderos y no progenitores, los alelos privados y los genotipos de la muestra F1 deben de existir entre los cientos de individuos que constituyen el

banco de reproductores. Cuando se utilizan un gran número de reproductores en los eventos de inducción al desove, siempre permanece la duda de la identidad de los individuos que participan exitosamente en la reproducción. Si el lote de reproductores es grande, los reproductores efectivos representan una pequeña fracción del acervo genético potencialmente disponible. Esta es la razón del por qué la estructura genética basado en frecuencias alélicas y genotípicas puede ser diferente de una generación a la siguiente aunque la heterocigosis (el rasgo más importante) puede ser o no la misma. En el presente caso, es posible obtener una generación F2 sin esperar un deterioro de la variabilidad genética mientras el número de reproductores se mantenga elevado.

Todos los loci, con excepción de ucdCg10, estuvieron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg (Tablas 4 y 5) con deficiencia de heterocigosis en todos los loci con excepción de ucdCg10 en la muestra de F1 ($P = 0,230$). El promedio del coeficiente de endogamia *Fis* fue de 0,206 para la muestra del lote parental y de 0,212 para la muestra de F1, ambos no diferentes de cero ($P > 0,05$). Estos valores de endogamia son mucho menores que el que reportan con alozimas Enríquez-Espinoza y Grijalva-Chon (2010) para un linaje triploide adquirido por el CREMES en los Estados Unidos y que fue distribuido entre los ostricultores de Sonora.

Los valores de significancia para la reducción poblacional de acuerdo al programa Bottleneck indican que la muestra del lote parental estuvo en equilibrio mutación-deriva ($P = 0,078$) pero no la muestra de F1 ($P = 0,016$). Estos resultados indican que no hay evidencia de una endogamia acumulada aunque hay evidencia de un incipiente cuello de botella que debe de ser monitoreado en generaciones sucesivas.

Tabla 3. Coeficiente D, coeficiente de endogamia (*Fis*) y coeficiente de diferenciación genética (*Fst*) en dos generaciones de *Crassostrea gigas*

Table 3. D coefficient, inbreeding coefficient (*Fis*), and genetic differentiation coefficient (*Fst*) in two generations of *Crassostrea gigas*

Locus	Lote parental			F1			<i>Fst</i>	χ^2
	<i>D</i>	<i>Fis</i>	χ^2	<i>D</i>	<i>Fis</i>	χ^2		
L10	-0,197	0,198	25,51	-0,116	0,117	13,70	0,013	21,95
L48	-0,107	0,108	8,85	-0,119	0,120	12,45	0,022	35,33***
Cg49	-0,327	0,329	74,55*	-0,364	0,366	53,52*	0,026	28,83***
Cg108	-0,312	0,314	38,92*	-0,225	0,226	32,72	0,009	8,79
UcdCg10	-0,055	0,055	1,31	-0,050	0,050	1,6	0,051	54,42***
UcdCg14	-0,212	0,214	40,28	-0,400	0,401	203,45*	0,016	34,93**
Promedio		0,203	189,42		0,213	317,44	0,022	184,25***

*** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$

Tabla 4. Número de individuos observados y esperados, número de genotipos totales y en desequilibrio para homocigotos y heterocigotos de un lote de reproductores de ostión japonés, *Crassostrea gigas*

Table 4. Observed and expected number of individuals, number of total genotypes, and genotypes in disequilibrium in a broodstock sample of *Crassostrea gigas*

Locus	Genotipos	Núm. de individuos		P	Núm. de genotipos	
		Observados	Esperados		Totales	En desequilibrio
L10	Homocigotos	17	8	0,0005	13	4
	Heterocigotos	37	46		78	4
L48	Homocigotos	18	12	0,0365	12	4
	Heterocigotos	51	57		66	5
Cg49	Homocigotos	34	16	0,0000	11	4
	Heterocigotos	35	53		55	5
Cg108	Homocigotos	29	12	0,0000	7	5
	Heterocigotos	37	54		21	5
ucdCg10	Homocigotos	19	17	0,24	8	1
	Heterocigotos	43	45		28	1
ucdCg14	Homocigotos	19	7	0,0001	15	3
	Heterocigotos	44	56		115	6

P = significancia para el equilibrio de Hardy-Weinberg

Tabla 5. Número de individuos observados y esperados, número de genotipos totales y en desequilibrio para homocigotos y heterocigotos de una muestra de la generación F1 de ostión japonés, *C. gigas*

Table 5. Observed and expected number of individuals, number of total genotypes, and genotypes in disequilibrium in an F1 sample of *C. gigas*

Locus	Genotipos	Núm. de individuos		P	Núm. de genotipos	
		Observados	Esperados		Totales	En desequilibrio
L10	Homocigotos	15	8	0,0049	15	5
	Heterocigotos	57	64		105	8
L48	Homocigotos	22	14	0,0138	12	2
	Heterocigotos	57	65		66	10
Cg49	Homocigotos	42	22	0,0000	6	5
	Heterocigotos	38	58		15	4
Cg108	Homocigotos	27	13	0,0001	9	4
	Heterocigotos	53	67		36	8
ucdCg10	Homocigotos	15	12	0,17	9	2
	Heterocigotos	65	68		36	4
ucdCg14	Homocigotos	36	7	0,0000	17	9
	Heterocigotos	43	72		136	8

P = significancia para el equilibrio de Hardy-Weinberg

CONCLUSIONES

Con la utilización de seis microsatélites se determinó la variabilidad genética en una muestra del lote de reproductores y la generación F1 del ostión japonés *C. gigas* mantenidos y producidos en el Centro Reprodutor de Especies Marinas del Estado de Sonora. Se encontró que ambas muestras mostraron una variabilidad genética similar en términos del número de alelos y heterocigosis. Además, el 21% de endogamia asociada a la generación F1 no es un indicativo de una acumulación que pudiera poner en peligro el desempeño del lote.

No se encontró evidencia de una endogamia crítica acumulada, aunque hay indicio de un incipiente cuello de botella que debe de ser vigilado en generaciones sucesivas. Esto implica que la generación F1 se puede utilizar con toda confianza para generar una F2 siempre y cuando se involucren el mayor número posible de reproductores.

Cuando se maneja un gran número de reproductores en los eventos de inducción al desove, siempre existirá la incertidumbre de la identificación de los individuos que participaron efectivamente en la fecundación, suponiendo que no se sacrifiquen a los organismos. Si el lote de reproductores es grande, los reproductores efectivos representan sólo una fracción del acervo genético disponible potencialmente. Es por eso que la estructura genética poblacional, sobre todo la que se refiere a las frecuencias alélicas y genotípicas, puede variar de generación en generación. Tomando esto en cuenta, los laboratorios de producción pueden confiar plenamente en los microsatélites como una herramienta efectiva para vigilar los niveles de variabilidad en sus linajes de cultivo.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada al segundo autor. Se agradecen los comentarios al manuscrito por parte del Dr. Faustino Rodríguez Romero y de dos revisores anónimos.

LITERATURA CITADA.

- Carlsson, J. y Reece, K.S. 2007. Eight PCR primers to amplify EST-linked microsatellites in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica* genome. *Molecular Ecology Notes*. 7: 257-259.
- Cenic, J.L. 2000. Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas. *Revista Terralia*. 12: 40-43.
- Cornuet, J.M. y Luikart, G. 1996. Description and evaluation of two tests for detecting recent bottlenecks. *Genetics*. 144: 2001-2014.
- Cruz, P., Yañez-Jacome, B., Ibarra, A.M. y Rangel-Becerril, J. 2007. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Pacific pleasure oyster, *Crassostrea corteziensis*, and their cross-species amplification in four other oyster species. *Molecular Ecology Notes*. 7: 448-450.

- De la Rosa-Vélez, J., Gutiérrez-Wing, M.T. y Radilla-Camacho, R. 1991. El ostricultivo de Bahía de San Quintín, B.C. México; Aspectos genéticos. *Ciencias Marinas*. 17: 133-147.
- Enríquez-Espinoza, T.L. y Grijalva-Chon, J.M. 2010. Genetic variability of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from a hatchery in northwestern Mexico. *Ciencias Marinas*. 36: 333-344.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*. 10: 1500-1508.
- Freitas, P.D. y Galetti Jr., P.M. 2005. Assessment of the genetic diversity in five generations of a commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp. *African Journal of Biotechnology*. 4: 1362-1367.
- Gaffney, P.M. 1990. Enzyme heterozygosity, growth rate and viability in *Mytilus edulis*: another look. *Evolution*. 44: 204-210.
- Geist, J., Rottmann, O., Schröder, W. y Kühn, R. 2003. Development of microsatellite markers for the endangered freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* L. (Bivalvia: Unionoidea) *Molecular Ecology Notes*. 3:444-446.
- Huvet, A., Boudry, P., Ohresser, M., Delsert, C. y Bonhomme, F. 2000. Variable microsatellites in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and other cupped oyster species. *Animal Genetics*. 31: 71-72.
- Islas, O.R. 1975. El ostión japonés (*Crassostrea gigas*) en Baja California. *Ciencias Marinas*. 2: 58-59.
- Kalinowski, S.T. 2006. HW-QUICKCHECK: an easy-to-use computer program for checking genotypes for agreement with Hardy-Weinberg expectation. *Molecular Ecology Notes*. 6: 974-979.
- Launey, S. y Hedgecock, D. 2001. High genetic load in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*. 159: 255-265.
- Li, C.C. y Horvitz, D.G. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics*. 5: 107-117.
- Li, G., Hubert, S., Bucklin, K., Ribes, V. y Hedgecock, D. 2003. Characterization of 79 microsatellite DNA markers in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Notes*. 3: 228-232.
- Li, Q., Yu, H. y Yu, R. 2006. Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture*. 259: 95-102.
- Liu, H.P. y Hershler, R. 2009. Genetic diversity and population structure of the threatened Bliss Rapids snail (*Taylorconcha serpenticola*). *Freshwater Biology*. 54: 1285-1299.
- Magoulas, A., Gjetvag, B., Terzoglou, V. y Zouros, E. 1998. The polymorphic microsatellites in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Animal Genetics*. 29: 69-70.
- McGoldbrick, D.J., Hedgecock, D., English, L., Baoprasertkul, P. y Ward, R.D. 2000. The transmission of microsatellite alleles in Australian and North American stocks of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*): selection and null alleles. *Journal of Shellfish Research*. 19: 779-788.
- Milligan, B.G., Leebens-Mack, J. y Strand, A.E. 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology*. 3: 423-435.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Ozaki, H. y Fujio, Y. 1985. Genetic differentiation in geographical populations of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) around Japan. *Tohoku Journal of Agriculture Research*. 36: 49-61.
- Peakall, R. y Smouse, P.E. 2006. GenAlEx6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295.
- Piry, S., Luikart, G. y Cornuet, J.M. 1999. Bottleneck: a computer for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*. 90: 502-503.
- Raymond, M. y Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 4): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86: 248-249.
- Rivera-García, M. y Grijalva-Chon, J.M. 2006. Genetic variability and differentiation in cultured white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei* with low and high growth. *Ciencias Marinas*, 32(1A): 1-11.
- Sauvage, C., Boudry, P. y Lapégue, S. 2009. Identification and characterization of 18 novel polymorphic microsatellite makers derived from expressed sequence tags in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Molecular Ecology Resources*. 9: 853-855.
- Sbordoni, V., de la Rosa, G., Mattoccia, M., Cobolli-Sbordoni, M. y de Mattheis, E. 1987. Genetic changes in seven generations of hatchery stock of the kuruma prawn, *Penaeus japonicus* (Crustacea, decapoda). *En Proceedings of the World Symposium on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Acuaculture*. K. Tiews (ed.), pp 143-155. Burdeos, Francia, 27-30 Mayo, 1986.
- Sekino, M., Hamaguchi, M., Aranishi, F. y Okoshi, K. 2003. Development of novel microsatellite DNA markers from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biotechnology*. 5: 227-233.
- Swofford, D. y Selander, R. 1981. BIOSYS-1: A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetic and systematics. *Journal of Heredity*. 72: 281-283.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*. 17: 6463-6471.

- Workman, P.L. y Niswander, J.D. 1970. Population studies on southwestern Indian Tribes. II Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics*. 22: 24–29.
- Xiao, J., Cordes, J.F., Jones, K.C. y Reece, K.S. 2008. Eleven novel microsatellite markers for the Asian oyster *Crassostrea ariakensis*. *Molecular Ecology Resources*. 8: 843-845.
- Yang, R., Yu, Z., Chen, Z., Kong, X. y Dai, J. 2000. Allozyme variation within *Crassostrea plicatula* and *Crassostrea gigas* from Shandong coastal waters. *Fisheries China*. 24: 130-133.
- Yu, H., Li, Q. y Yu, R. 2008. Genetic differentiation between the oyster *Crassostrea plicatula* and Pacific oyster *Crassostrea gigas* populations in China assessed by microsatellite analysis. *Fisheries Science*. 74: 88–97.
- Yu, Z. y Guo, X. 2005. Genetic analysis of selected strains of eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) using AFLP and microsatellite markers. *Marine Biotechnology*. 6: 575-586.
- Zane, L., Bargelloni, L y Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*. 11: 1-16