

Population genetics of the oyster *Crassostrea corteziensis* in the Gulf of California

Genética poblacional del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en el Golfo de California

R Pérez-Enríquez, S Ávila, AM Ibarra

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR), Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo de Sta. Rita, CP 23090, La Paz, Baja California Sur, México. * E-mail: rperez@cibnor.mx

Abstract

The native oyster *Crassostrea corteziensis* is a cultured species along the Mexican Pacific with considerable growth potential. For this reason CIBNOR is working towards obtaining greater knowledge that can be used in the future to begin a selective breeding program. To take advantage of the potential of using multiple populations, the genetic diversity and structure of the wild population was analyzed. Samples were obtained from five sites from Sonora to Nayarit in the Gulf of California (Mexico). Allozyme analysis showed high gene flow in the area, indicating no genetic structure. High genetic diversity was also observed, indicating an adequate potential for selective breeding and species recovery management. Allozyme and mitochondrial DNA analyses revealed the presence of a sympatric species, presumably *C. columbiensis*, which was found at one of the collection sites instead of *C. corteziensis*. Further ecological and molecular studies on both species are recommended to understand the relationships between them and the environment.

Key words: allozymes, *Crassostrea corteziensis*, genetic diversity, oyster.

Resumen

El ostión de placer *Crassostrea corteziensis* es una especie que se cultiva en las costas del Pacífico mexicano con amplio potencial de desarrollo. Por ello, CIBNOR está realizando estudios para profundizar en su conocimiento para el futuro desarrollo de un programa de reproducción selectiva. Con el fin de indagar la potencial utilización de múltiples poblaciones para el cultivo, se llevó a cabo un análisis de diversidad y estructura genética de la población natural. Se obtuvieron muestras de cinco localidades entre Sonora y Nayarit, en el Golfo de California. El análisis con alozimas mostró un amplio flujo genético en el área de estudio que indica que la población no se encuentra estructurada. La gran diversidad genética observada indica un importante potencial de manejo tanto para la selección como para la recuperación de los stocks naturales. Los análisis basados en alozimas y ADN mitocondrial revelaron la presencia de una especie simpátrica, presumiblemente *C. columbiensis*. Se recomiendan estudios ecológicos y moleculares para entender las relaciones entre estas dos especies, así como las de éstas con las variables ambientales.

Palabras clave: alozimas, *Crassostrea corteziensis*, diversidad genética, ostión.

Introduction

The oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) is cultured in northwestern Mexico under semi-extensive conditions and, because of its characteristics, it is a species that has high aquaculture potential along the tropical Pacific coast of not only Mexico but also Central America (Chávez-Villalba *et al.* 2005).

Even though aquaculture farms in the Mexican states of Sinaloa and Nayarit depend on the natural collection of spat, several studies have shown the feasibility of controlled seed production, leading to the installation of commercial hatcheries in Baja California Sur and Sinaloa. However, in order to maintain a controlled, long-term seed production, it would be recommendable to develop a breeding stock that must be appropriately managed to avoid a reduction in genetic diversity

Introducción

El ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Hertlein 1951) es una especie que se cultiva a nivel semi-extensivo en la región noroeste de México desde hace varios años y, por sus características (Chávez-Villalba *et al.* 2005), representa una especie con alto potencial acuícola para el Pacífico tropical, no sólo de México sino también de Centroamérica.

Aun cuando los cultivos que se realizan en los estados de Sinaloa y Nayarit dependen de la captación natural de semilla, diversos estudios han mostrado la factibilidad de la producción controlada de ésta, lo que ha permitido la instalación de laboratorios para su producción a nivel comercial. Para que una producción controlada de semilla sea potencialmente viable en el largo plazo es necesario contar con reproductores que sean manejados adecuadamente para mantener su diversidad

and increased inbreeding, and constitute the basis for future genetic improvement programs.

Knowledge of the genetic composition and structure of *C. corteziensis* throughout its distribution area will also be of aid in the appropriate management of the species, including the conservation of its genetic diversity and structure.

Few phylogenetic and population genetic studies on *C. corteziensis* are available. In an allozyme analysis of the species at San Blas, Nayarit, Hedgecock and Okazaki (1984) reported a moderately high genetic diversity, with 2.07 alleles per locus, 67% of polymorphic loci, and expected heterozygosity of 20%. Rodríguez-Romero *et al.* (1988) compared *C. corteziensis* individuals from two coastal sites with different salinity conditions and found low genetic differentiation between them, without ruling out the possibility of genetic differences in a wider geographic range.

Despite the low variability of allozymes, studies on other *Crassostrea* species have been able to detect genetic differences among populations. Such is the case of *C. virginica* in the Gulf of Mexico (Buroker 1983) and of *C. angulata* in Spain and Portugal (Michinina and Rebordinos 1997). Even though these species have high dispersal potential in the larval stage, these differences are probably due to selective pressures because of habitat differences. This suggests that given the distribution of *C. corteziensis* over a wide salinity range, the presence of genetic differences between sites is possible. If this is the case, knowledge of the genetic composition of the species at different sites will be important in the conformation of a breeding stock.

In this study we estimated the genetic diversity, differentiation, and gene flow of *C. corteziensis* at several locations within the Gulf of California, to determine the genetic structure of this oyster.

Material and methods

Sample collection

Five sites in northwestern Mexico (fig. 1) were sampled between January 2004 and March 2005: Guaymas (Bahía de Lobos: 27°20' N, 110°30' W), Topolobampo (Bahía de Santa María: 25°39' N, 109°13' W), Culiacán (Bahía de Ceuta: 24°05' N, 107°09' W), North Nayarit (Estero de Tecuala: 22°28' N, 105°40' W), and Nayarit (Boca de Camichín: 21°45' N, 105°30' W). The specimens from Topolobampo, supposedly of the same species, were smaller than those from the other sites. The individual oysters were transported live or frozen to the genetics laboratory at CIBNOR, following the methodology of Hedgecock and Okazaki (1984), where they were dissected and their muscle and mantle tissues sampled. Wild population specimens were obtained from mangrove roots, with the exception of the sample taken from Boca de Camichín, which was collected from aquaculture rafts. Fifty animals were collected at each site.

genética, reducir problemas potenciales ocasionados por endogamia y que sirvan de fuente a futuros programas de mejora genética.

El conocimiento del acervo genético de la especie a lo largo de su rango de distribución es un factor importante que permitirá realizar un manejo adecuado, tanto para la creación de un stock de reproductores como para evitar que los cultivos dependientes del suministro natural de semilla pierdan diversidad genética y sufran cambios en su estructura genético-poblacional.

Existen pocos estudios filogenéticos y genético-poblacionales sobre el ostión de placer *C. corteziensis*. En un análisis filogenético con alozimas en especies de *Crassostrea*, Hedgecock y Okazaki (1984) reportaron que una población de *C. corteziensis* de San Blas, Nayarit, presentó valores moderadamente altos de diversidad genética con un promedio de 2.07 alelos por locus, un 67% de loci polimórficos y una heterocigosidad esperada de 20%. Por otra parte, un análisis basado en electroforesis de proteínas entre poblaciones de dos lagunas costeras de Nayarit con condiciones de salinidad distintas (Rodríguez-Romero *et al.* 1988), indicó una baja diferenciación genética entre localidades, sin descartarse la posibilidad de diferenciación en un rango geográfico más amplio.

A pesar de la poca variabilidad comúnmente detectada por las alozimas, diversos estudios con especies de *Crassostrea* han sido capaces de detectar diferencias genéticas entre poblaciones. Tal es el caso de *C. virginica* en el Golfo de México (Buroker 1983) y *C. angulata* en España y Portugal (Michinina y Rebordinos 1997). Estos autores mencionan que, a pesar del potencial de dispersión de la especie en su etapa larvaria, dichas diferencias se deben probablemente a presiones selectivas por diferencias en el hábitat. La distribución de *C. corteziensis* en diferentes ambientes estuarinos (de hipersalinos a salobres) podría originar también diferencias genéticas detectables. De resultar así, para la creación de un stock de reproductores será de gran utilidad contar con información sobre si existe o no diferenciación genética de esta especie entre sus distintas localidades y, dado el caso, el grado de diferenciación entre las poblaciones.

En este estudio se estimó la diversidad genética, la diferenciación y el flujo genético de *C. corteziensis* entre localidades del Golfo de California con el fin de determinar la estructura genética de su población.

Materiales y métodos

Obtención de muestras

Se obtuvieron muestras de *C. corteziensis* de cinco localidades del noroeste de México, entre enero de 2004 y marzo de 2005. Las localidades muestreadas fueron: Guaymas (Bahía de Lobos: 27°20' N, 110°30' W), Topolobampo (Bahía de Santa María: 25°39' N, 109°13' W), Culiacán (Bahía de Ceuta: 24°05' N, 107°09' W), Nayarit Norte (Estero de Tecuala: 22°28' N, 105°40' W) y Nayarit (Boca de Camichín: 21°45' N,

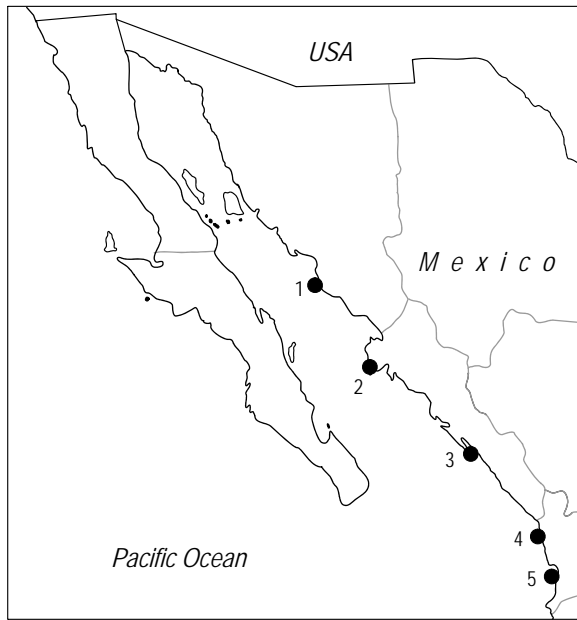


Figure 1. Sampling locations of the oyster *Crassostrea corteziensis*: (1) Guaymas, (2) Topolobampo, (3) Culiacán, (4) North Nayarit, and (5) Nayarit.
Figura 1. Localidades de muestreo de ostión de placer *Crassostrea corteziensis*: (1) Guaymas, (2) Topolobampo, (3) Culiacán, (4) Nayarit Norte, y (5) Nayarit.

Allozyme analyses

Based on Hegdecock and Okazaki (1984), a standardization process was carried out using muscle and mantle tissues for the following enzymes (nomenclature and EC number are included according to Shaklee *et al.* 1990): adenylate kinase (*AK**, EC 2.7.4.3), aspartate aminotransferase (*AAT**, EC 2.6.1.1), glucose-6-phosphate isomerase (*GPI**, EC 5.3.1.9), glutamate dehydrogenase (*GDH**, EC 1.4.1.-), leucine aminopeptidase (*LAP**, EC 3.4.11.1), malate dehydrogenase (*MDH**, EC 1.1.1.37), phosphoglucomutase (*PGM**, EC 5.4.2.2), phosphogluconate dehydrogenase (*PGDH**, EC 1.1.1.44), superoxide dismutase (*SOD**, EC 1.15.1.1), triosephosphate isomerase (*TPI**, EC 5.3.1.1), and xanthine dehydrogenase (*XDH**, EC 1.17.1.4). Enzymes *AAT**, *GDH**, *GPI**, *LAP**, *PGM**, *SOD**, and *XDH** were tested using buffer system R (May 1992); *AAT**, *AK**, *MDH**, *PGDH**, and *TPI** using the T-C system (Shaw and Prasad 1970, Benzie *et al.* 1993); *AK**, *MDH**, and *PGDH** using the CAAMP system (Shaklee and Keenan 1986, Murphy *et al.* 1996); *PGM**, *PGDH**, and *SOD** using the phosphate-citrate system (Selander *et al.* 1971); *AAT**, *GPI**, *LAP**, and *SOD** using system A (Ayala *et al.* 1972); *GDH**, *TPI**, and *XDH** using system B (Ayala *et al.* 1972); and *AK**, *MDH**, and *PGDH** using system C (Ayala *et al.* 1972). In this exploratory phase, appropriate results were only obtained for enzymes *PGM**, *GPI**, and *SOD**, analyzed in muscle tissue with the R system, and for *AK** and *MDH**, analyzed in mantle and muscle tissues, respectively, using the T-C system. These enzymes were therefore selected for the genetic analysis.

105°30' W) (fig. 1). Los ejemplares de Topolobampo, presuntamente de la misma especie, fueron más pequeños que los del resto de los sitios. Todos los organismos fueron transportados vivos o congelados al CIBNOR, siguiendo el método de Hegdecock y Okazaki (1984), donde se realizó su disección. Los organismos silvestres se recolectaron de las raíces de los mangles, con excepción de la muestra de Boca de Camichín que fue tomada de una balsa de cultivo (de fijación natural). Se obtuvieron 50 individuos de cada localidad.

Análisis genético por alozimas

Se estandarizaron las condiciones de análisis de alozimas con base en el trabajo de Hegdecock y Okazaki (1984) con esta misma especie, utilizando tejido de músculo y manto para las siguientes enzimas (se incluye nomenclatura y número EC de acuerdo con Shaklee *et al.* (1990)): adenilato kinasa (*AK**, EC 2.7.4.3), aspartato aminotransferasa (*AAT**, EC 2.6.1.1), fosfoglucomutasa (*PGM**, EC 5.4.2.2), fosfogluconato deshidrogenasa (*PGDH**, EC 1.1.1.44), glucosa-6-fosfato isomerasa (*GPI**, EC 5.3.1.9), glutamato deshidrogenasa (*GDH**, EC 1.4.1.-), leucin-aminopeptidasa (*LAP**, EC 3.4.11.1), malato deshidrogenasa (*MDH**, EC 1.1.1.37), superóxido dismutasa (*SOD**, EC 1.15.1.1), triosefosfato isomerasa (*TPI**, EC 5.3.1.1), xantina deshidrogenasa (*XDH**, EC 1.17.1.4). Las enzimas *AAT**, *GDH**, *GPI**, *LAP**, *PGM**, *SOD** y *XDH** se analizaron con el sistema amortiguador R (May 1992); las enzimas *AAT**, *AK**, *MDH**, *PGDH** y *TPI** con el sistema T-C (Shaw y Prasad 1970, Benzie *et al.* 1993); las enzimas *AK**, *MDH** y *PGDH** en el sistema CAAMP (Shaklee y Keenan 1986, Murphy *et al.* 1996); las enzimas *PGM**, *PGDH** y *SOD** con el sistema fosfato-citrato (Selander *et al.* 1971); las enzimas *AAT**, *GPI**, *LAP** y *SOD** con el sistema A (Ayala *et al.* 1972); las enzimas *GDH**, *TPI** y *XDH** con el sistema B (Ayala *et al.* 1972), y las enzimas *AK**, *MDH** y *PGDH** con sistema "C" (Ayala *et al.* 1972). Como resultado de esta etapa exploratoria sólo se obtuvieron revelados adecuados para las enzimas *PGM**, *GPI** y *SOD** analizadas en músculo con el sistema R, y para *AK** y *MDH** analizadas en manto y músculo, respectivamente, con el sistema T-C, por lo que éstas fueron las enzimas seleccionadas para el análisis de las muestras.

Análisis de datos

Las lecturas alélicas se efectuaron con geles en fresco y se fotodocumentaron. Se asignaron letras a los alelos considerando como *a la banda con mayor avance anodal. Con las lecturas electroforéticas se calcularon las frecuencias alélicas y se estimaron los siguientes parámetros de diversidad genética: proporción de loci polimórficos (*PI*), número de alelos por locus (*A*), y heterocigosidad observada (*H_o*) y esperada (*H_e*), todo ello utilizando el programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander 1981). Se estimó la deficiencia de heterocigotos mediante el índice de endogamia *F_{is}* y se realizaron pruebas exactas de Fisher para determinar desviaciones con respecto al

Data analysis

After starch gel electrophoresis, allelic readings were done in fresh and then photodocumented. Alleles were assigned letters, with *a corresponding to the band of greater anodal migration. Allele frequencies were calculated and the following genetic diversity parameters were estimated: proportion of polymorphic loci (PI), number of alleles per locus (A), and observed and expected heterozygosity (H_o and H_e , respectively), using BIOSYS-1 software (Swofford and Selander 1981). Heterozygote deficiency was estimated by the inbreeding coefficient F_{is} , and Fisher exact tests were done to determine conformation to Hardy-Weinberg equilibrium for each locus and each site, using the FSTAT program (Goudet 2000). A sequential Bonferroni test was carried out to correct significance levels in multiple tests (Rice 1989). The population differentiation analysis was based on θ_{st} as estimator of F_{st} (Weir and Cockerham 1984). Its significance was estimated by the bootstrap resampling method (15,000 iterations) included in FSTAT (Goudet 2000). Nei's genetic distance (Nei 1978) and mean gene flow ($Nm = 0.25 (1 - F_{st})/F_{st}$) among and between sites were also calculated using PopGene software (Yeh *et al.* 1999). A UPGMA genetic distance tree was obtained with TreeView (Page 1996).

Mitochondrial DNA analysis

The allozyme analysis results indicated the possible presence of another *Crassostrea* species other than *C. corteziensis*. An analysis based on partial 16srRNA gene sequences was done among three specimens from Guaymas, five from Topolobampo, and four from Culiacán. Three *C. gigas* individuals collected from a commercial facility were also included to serve as an out-group. Genomic DNA from each organism was obtained following the protocol described by Sweijd *et al.* (1998). A 550-base-pair fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using universal primers 16Sar-L and 16Sbr-H (Palumbi *et al.* 1991). The PCRs were performed in 50 μ L reactions containing PCR buffer 1 \times (Invitrogen), 0.2 mM dNTP mix, 0.48 μ M of each primer, 4.0 mM MgCl₂, and 2.5 U of *Taq* polymerase (Invitrogen). Thermal conditions (iCycler, Bio-Rad) were 2 min at 94°C, 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, and 2 min at 72°C, with a final extension of 4 min at 72°C.

The PCR products were sequenced (Macrogen, Korea) in both directions (sense and antisense), and the sequences were edited using ChromasPro ver. 1.15 (Technelysium, Australia). Neighbor-joining trees were constructed based on sequence divergence using the Kimura two-parameter model implemented in MEGA ver. 3.1 (Kumar *et al.* 2004), in which *C. gigas* was the out-group. The MEGA software includes the bootstrap resampling method with 500 iterations to verify the probability of the correct tree topology. Four sequences were deposited in the GenBank database: two from *C. corteziensis* (individuals collected at Culiacán and Guaymas), one from

equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus en cada localidad con el programa FSTAT (Goudet 2000). Se llevó a cabo un ajuste de secuencia de Bonferroni para las pruebas múltiples de significancia (Rice 1989). Se realizó un análisis de diferenciación de poblaciones basado en el índice θ_{st} como estimador de F_{st} (Weir y Cockerham 1984), cuya significancia se estimó mediante el método de remuestreo con reemplazo denominado *bootstrap* (15,000 repeticiones) incluido en el programa FSTAT (Goudet 2000). La distancia genética de Nei (1978) y el flujo genético medio entre localidades ($Nm = 0.25 (1 - F_{st})/F_{st}$) se estimaron con la ayuda del programa PopGene (Yeh *et al.* 1999). El dendrograma UPGMA de distancias genéticas se obtuvo con el programa TreeView (Page 1996).

Análisis de ADN mitocondrial

Los resultados del análisis por alozimas indicaron la posible presencia de otra especie de *Crassostrea* diferente a *C. corteziensis*. Para confirmar lo anterior se llevó a cabo un análisis de secuencias parciales del gen 16srRNA entre ejemplares de Guaymas (3), Topolobampo (5) y Culiacán (4). Se incluyeron además tres ejemplares de *C. gigas* obtenidos de una granja de cultivo de Baja California Sur. Para este análisis se extrajo el ADN genómico siguiendo un protocolo estandarizado (Sweijd *et al.* 1998). Se amplificó por PCR un fragmento de aproximadamente 550 pares de bases utilizando los iniciadores universales 16Sar-L y 16Sbr-H reportados por Palumbi *et al.* (1991) bajo las siguientes condiciones: amortiguador de PCR 1 \times (Invitrogen), 0.2 mM de mezcla de dNTP, 0.48 μ M de cada iniciador, 4.0 mM de MgCl₂ y 2.5 U de polimerasa *Taq* (Invitrogen) en un volumen de 50 μ L. Las condiciones de temperatura del termociclador (iCycler, BioRad) fueron: 2 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C y 2 min a 72°C, y una extensión final de 4 min a 72°C.

Los productos de PCR fueron secuenciados en sentido y antisentido (Macrogen, Corea) y las secuencias fueron editadas utilizando el programa ChromasPro ver. 1.15 (Technelysium, Australia). Se construyeron árboles filogenéticos del tipo "vecino más cercano" basados en las divergencias entre pares de secuencias utilizando el modelo parámetro-dos de Kimura instrumentado en el programa MEGA ver 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) en el cual *C. gigas* quedó como grupo externo. El programa MEGA incluye el método de remuestreo *bootstrap* con 500 repeticiones para verificar la probabilidad de ocurrencia de la topología del árbol obtenido. Se depositaron cuatro secuencias en la base de datos pública "GenBank": dos de *C. corteziensis* (ejemplares recolectados en Culiacán y Guaymas), una de *Crassostrea* sp. (ejemplar recolectado en Topolobampo) y una de *C. gigas*. Las secuencias quedaron registradas con números de acceso EU733651 a EU733654.

Se estimó el grado de divergencia genética entre la secuencia de *C. corteziensis* y *Crassostrea* sp. (muestra de Topolobampo) dividiendo el número de bases variables de la secuencia del gen 16SrRNA de las dos especies entre el total de bases de la secuencia. Este valor se comparó con el grado

Table 1. Genetic variability of the oyster *Crassostrea corteziensis* from five sites along the Gulf of California (standard deviation in parentheses).**Tabla 1.** Variabilidad genética del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* recolectado en cinco localidades del Golfo de California (desviación estándar entre paréntesis).

	Guaymas	Topolobampo	Culiacán	North Nayarit	Nayarit
Number of organisms analyzed	49.8 (0.2)	49.0 (1.0)	49.8 (0.2)	50.0 (0.0)	50.0 (0.0)
Proportion of polymorphic loci*:					
95%	33.3	16.7	50.0	50.0	33.3
99%	50.0	50.0	50.0	66.7	50.0
Number of alleles per locus	3.3 (1.4)	2.5 (1.0)	2.5 (0.7)	3.2 (0.9)	2.8 (0.8)
Heterozygosity:					
Observed (H_o)	0.098	0.058	0.080	0.117	0.093
Expected (H_e)	0.126	0.129	0.090	0.127	0.089
Inbreeding coefficient F_{is}	0.232**	0.559**	0.112	0.092	-0.042

* Loci whose most common allele frequency is less or equal to 95% and 99%.

** Statistically significant ($P < 0.01$) after the sequential Bonferroni correction.

Crassostrea sp. (a specimen collected at Topolobampo), and one from *C. gigas*. GenBank accession numbers are EU733651 to EU733654.

The degree of genetic divergence between *C. corteziensis* and *Crassostrea* sp. (sample from Topolobampo) was estimated dividing the number of variable nucleotide sites on the 16S rRNA gene of both species by the total number of bases in the sequence. This value was compared with the sequence divergence of the same gene of three other *Crassostrea* species registered in GenBank: *C. ariakensis*, *C. rhizophorae*, and *C. virginica* (accession numbers AY160757, DQ839415, and AY905542, respectively). A phylogenetic dendrogram was constructed as described above.

Results

Six loci from five allozymes were resolved, of which two were monomorphic (*MDH-2*, *SOD*) in all the populations. The polymorphic allozyme loci (99% criterion in at least one site) were *AK**, *PGM**, *GPI**, and *MDH-1**. The genetic diversity estimators (P_i , A , H_o) indicated that Topolobampo was the least variable location (table 1). North Nayarit presented the highest diversity values, particularly in heterozygosity ($H_o = 0.117$). Similar genetic diversity levels were observed among the other locations. Mean F_{is} values per site indicate a significant heterozygote deficiency at Guaymas and Topolobampo, and marginally significant at Culiacán ($P = 0.0467$), which nevertheless was not significant after the sequential Bonferroni test. North Nayarit and Nayarit did not depart from Hardy-Weinberg equilibrium (table 1).

Three of the four polymorphic loci showed a considerably high number of alleles (5 in *AK**, 6 in *GPI**, and 11 in *PGM**) at the five sites (table 2). With the exception of Topolobampo, the most common alleles in *AK**, *GPI**, and *PGM** (*c, *c, and *g, respectively) coincided in all locations with high homogeneity in their frequencies (fig. 2). At Topolobampo, the most

de divergencia de secuencias del mismo gen de otras especies de ostión registradas en el GenBank (*C. ariakensis*, *C. rhizophorae* y *C. virginica*, con números de acceso AY160757, DQ839415 y AY905542, respectivamente). Se construyó un árbol filogenético de la misma manera descrita en el párrafo precedente.

Resultados

De las cinco enzimas analizadas se resolvieron seis loci, de los cuales dos fueron monomórficos (*MDH-2*, *SOD*) en todas las poblaciones. Los loci polimórficos, es decir aquellos que dieron como resultado un alelo en al menos un individuo (criterio del 99%) y en al menos una población, fueron *AK**, *PGM**, *GPI** y *MDH-1**. El conjunto de estimadores de la diversidad genética (P_i , A y H_o) indican que la localidad menos diversa es la de Topolobampo (tabla 1). Nayarit Norte sobresale del resto por presentar los valores más altos, en particular en cuanto a la heterocigosidad ($H_o = 0.117$). Las tres localidades restantes presentan valores comparativamente similares entre ellas. Los valores medios de F_{is} por localidad indican una deficiencia significativa de heterocigotos en Guaymas y Topolobampo y marginalmente significativa en Culiacán ($P = 0.0467$); sin embargo, esta última pasó a ser no significativa después del ajuste secuencial de Bonferroni. Nayarit Norte y Nayarit no muestran disparidades entre lo observado y lo esperado en función del equilibrio de Hardy-Weinberg (tabla 1).

Tres de los cuatro loci polimórficos presentaron un número considerable de alelos en el total de las localidades (5 en *AK**, 6 en *GPI** y 11 en *PGM**) (tabla 2). Con la excepción de Topolobampo los alelos más comunes en *AK**, *GPI** y *PGM** (*c, *c y *g, respectivamente) coincidieron en todas las localidades con alta homogeneidad en sus frecuencias. En Topolobampo los alelos más comunes en *AK**, *GPI** y *PGM** (*b, *fe *i, respectivamente) presentaron una notoria diferencia en sus frecuencias con respecto al resto de las localidades (fig. 2). De

Table 2. Allele frequencies of polymorphic loci of *Crassostrea corteziensis*. *N*: number of individuals analyzed; *P*: probability of fit to Hardy-Weinberg expectations by Fisher exact tests (*P*-Ex) and of heterozygote deficiency measured by the inbreeding coefficient *Fis*.

Tabla 2. Frecuencias alélicas de loci polimórficos de ostión de placer. *N*: número de individuos analizados; *P*: probabilidades de ajuste al modelo de Hardy-Weinberg mediante pruebas exactas de Fisher (*P*-Ex) y de verificación de deficiencia de heterocigotos mediante el parámetro *Fis*.

Locus	Allele	Guaymas	Topolobampo	Culiacán	North Nayarit	Nayarit
<i>AK*</i>	<i>N</i>	50	50	49	50	50
	<i>*a</i>	–	0.010	–	0.010	–
	<i>*b</i>	–	0.980	0.020	0.040	0.020
	<i>*c</i>	0.960	–	0.918	0.900	0.920
	<i>*d</i>	0.040	–	0.041	0.050	0.040
	<i>*e</i>	–	0.010	0.020	–	0.020
	<i>P</i> -Ex	0.060	1.000	0.266	0.059	1.000
	<i>Fis</i>	0.052	1.000	0.263	0.015	1.000
<i>GPI*</i>	<i>N</i>	50	50	50	50	50
	<i>*a</i>	0.030	–	0.090	0.040	0.060
	<i>*b</i>	0.030	–	0.010	–	0.020
	<i>*c</i>	0.810	–	0.860	0.840	0.830
	<i>*d</i>	0.040	–	0.010	0.030	0.040
	<i>*e</i>	0.050	0.010	0.030	0.070	0.050
	<i>*f</i>	0.040	0.990	–	0.020	–
	<i>P</i> -Ex	0.347	1.000	1.000	1.000	1.000
<i>Fis</i>	0.008	1.000	0.417	0.392	0.802	
<i>MDH-1*</i>	<i>N</i>	50	50	50	50	50
	<i>*a</i>	1.000	1.000	1.000	0.990	1.000
	<i>*b</i>	–	–	–	0.010	–
	<i>P</i> -Ex	–	–	–	1.000	–
	<i>Fis</i>	–	–	–	1.000	–
<i>PGM*</i>	<i>N</i>	49	45	50	50	50
	<i>*a</i>	0.010	–	–	0.010	0.010
	<i>*b</i>	0.010	–	–	–	–
	<i>*c</i>	0.092	0.022	0.050	0.070	0.010
	<i>*d</i>	0.010	0.022	–	–	0.010
	<i>*e</i>	–	–	–	–	–
	<i>*f</i>	0.031	–	0.020	0.030	–
	<i>*g</i>	0.806	0.333	0.930	0.850	0.960
	<i>*h</i>	–	0.011	–	0.010	0.010
	<i>*i</i>	0.020	0.344	–	0.030	–
	<i>*j</i>	0.010	0.044	–	–	–
	<i>*k</i>	0.010	0.222	–	–	–
	<i>P</i> -Ex	0.060	<0.001**	0.201	1.000	1.000
<i>Fis</i>	0.083	0.002**	0.092	0.707	1.000	

** Statistically significant after the sequential Bonferroni correction.

common alleles in these loci (**b*, **f*, and **i*, respectively) showed large differences in frequencies (fig. 2). The Fisher exact tests and *Fis* values showed that most loci were in Hardy-Weinberg equilibrium (table 2), with the only exception of *PGM** at Topolobampo. Even though the *Fis* *P* values after the sequential Bonferroni correction of *AK** and *GPI** in Guaymas, and of *AK** in North Nayarit were not significant, they were actually rather low (table 2). Considering that, as is explained below, the individuals collected at Topolobampo represent another species that is not *C. corteziensis* and that

acuerdo a las pruebas exactas de Fisher y a los valores de *Fis*, todas las poblaciones se ajustaron al equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los loci (tabla 2), con la única excepción del locus *PGM** en Topolobampo. Cabe mencionar que, aunque los valores de *P* del coeficiente de endogamia *Fis* antes del ajuste secuencial de Bonferroni en Guaymas (*AK** y *GPI**) y en Nayarit Norte (*AK**) fueron no significativos, en realidad fueron más bien bajos (tabla 2). Considerando que, como se explica más adelante, los ejemplares recolectados en Topolobampo representan a una especie diferente a *C.*

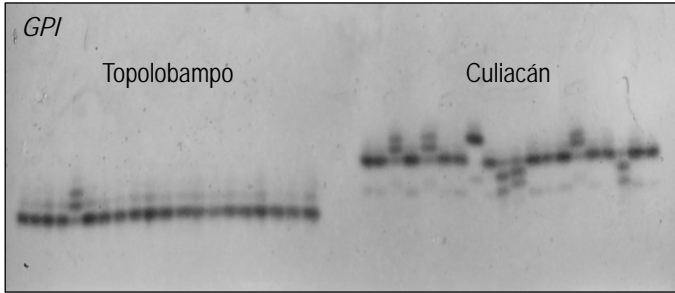


Figure 2. Allozyme electropherogram showing *GPI** at two sites.
 Figura 2. Corrida electroforética de la enzima *GPI** en dos localidades.

specimens characteristic of this site were also found in Guaymas and North Nayarit, a new *Fis* analysis was done extracting the “Topolobampo-like” specimens (i.e., those showing the *PGM*ff* genotype) from the data. There was an evident change in the *Fis* *P* values to nonsignificant in both locations, passing from 0.008 to 0.337 for *GPI**, and from 0.015 to 0.130 for *AK**, at Guaymas and North Nayarit, respectively. The only exception was *AK** at Guaymas, since its *P* value did not change but remained on a marginal level ($P \approx 0.05$).

A highly significant value of $Fst = 0.536$ ($P < 0.01$) indicated that at least one location differed. The evident differences in allele frequencies between Topolobampo and the other locations revealed that this site is genetically different. Excluding Topolobampo from the analysis results in a nonsignificant value of $Fst = 0.004$ ($P < 0.05$), indicating that there are no genetic differences among oysters from Guaymas, Culiacán, North Nayarit, and Nayarit. The genetic distance dendrogram (fig. 3) clearly shows the separation of Topolobampo from the other sites. It can also be observed that even though Culiacán seems to be more related to Nayarit and North Nayarit to Guaymas, the distances are minimal among them. Gene flow, calculated from the global *Fst* excluding Topolobampo, was 24.3 migrants per generation; the pairwise *Fst* values resulted in high and rather homogeneous values (Guaymas/Culiacán, $Nm = 21.4$; Guaymas/North Nayarit, $Nm = 66.4$; Guaymas/Nayarit, $Nm = 17.2$; Culiacán/North Nayarit, $Nm = 43.6$; Culiacán/Nayarit, $Nm = 83.5$; North Nayarit/Nayarit, $Nm = 30.8$). Based on these results there is no evidence that *C. corteziensis* is structured in the study area.

The high genetic differentiation between Topolobampo and the other locations was confirmed by the mtDNA 16SrRNA gene sequence analysis, with a divergence of 6% (table 3). The resulting dendrogram clearly separated Topolobampo, not only from Guaymas and Culiacán but also from the *C. gigas* outgroup, showing bootstrap values of 100% at the nodes (fig. 4a). Sequence analyses including other *Crassostrea* species for which sequences are available in GenBank (*C. ariakensis*, *C. rhizophorae*, and *C. virginica*) indicated that the degree of difference between the Topolobampo oyster and *C. corteziensis* is slightly higher than that found between *C. rhizophorae*

corteziensis y que se detectaron ejemplares característicos de dicha localidad en las localidades de Guaymas y Nayarit Norte, se realizó un nuevo análisis de *Fis* en estos dos sitios extrayendo los ejemplares “tipo-Topolobampo” (i.e., aquellos que presentaron el genotipo *PGM*ff*). El cambio del valor de *P* de *Fis* hacia la no significancia fue claro en ambas localidades, pasando de 0.008 a 0.377 en *GPI** y de 0.015 a 0.130 en *AK**, en Guaymas y Nayarit Norte, respectivamente. La única excepción fue *AK** en Guaymas, cuyo valor no se modificó pero se mantuvo en un nivel marginal no significativo ($P \approx 0.05$).

El análisis genético-poblacional mostró un valor altamente significativo de $Fst = 0.536$ ($P < 0.01$) que indica que al menos una localidad es distinta. Las evidentes diferencias en las frecuencias alélicas entre Topolobampo y el resto de las localidades indican claramente que esta localidad es genéticamente distinta. El análisis de diferenciación, excluyendo a Topolobampo, dio como resultado un valor no significativo de $Fst = 0.004$ ($P > 0.05$), lo que muestra que no hay diferencias genéticas entre Guaymas, Culiacán y las dos localidades de Nayarit. La asociación entre el conjunto de localidades se aprecia en el dendrograma basado en la distancia genética (fig. 3), en donde se observa la evidente separación de Topolobampo, y si bien Culiacán se asocia más con Nayarit y Nayarit Norte con Guaymas, las distancias entre estos dos grupos son mínimas. El flujo genético entre localidades, calculado a partir del *Fst* global excluyendo Topolobampo, fue de 24.3 migrantes por generación; los valores pareados de *Fst* dieron como resultado valores de flujo genético relativamente homogéneos (Guaymas/Culiacán, $Nm = 21.4$; Guaymas/Nayarit Norte, $Nm = 66.4$; Guaymas/Nayarit, $Nm = 17.2$; Culiacán/Nayarit Norte, $Nm = 43.6$; Culiacán/Nayarit, $Nm = 83.5$; Nayarit Norte/Nayarit, $Nm = 30.8$). Con base en estos resultados no hay evidencias para considerar que la población de *C. corteziensis* se encuentre estructurada.

El elevado nivel de diferenciación genética del ostión de Topolobampo respecto al resto de las localidades (una divergencia del 6%) fue confirmado con el análisis de secuencias del gen mitocondrial 16srRNA (tabla 3), el cual dio como resultado un dendrograma que separa claramente las muestras de ostión de Topolobampo de las de Guaymas y Culiacán y las

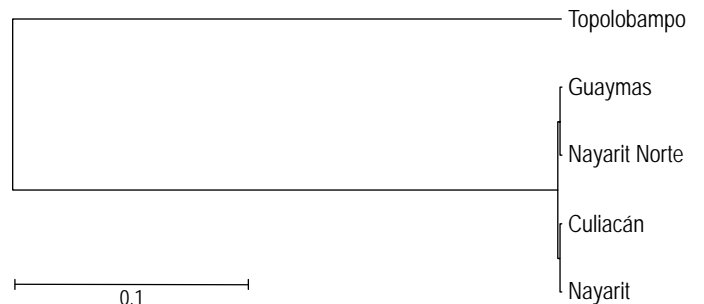


Figure 3. UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance over five allozyme loci.
 Figura 3. Dendrograma UPGMA de distancias genéticas de Nei del ostión de placer, obtenidas con cinco loci alozímicos.

and *C. virginica* (4.9% divergence), and between *C. gigas* and *C. ariakensis* (3.4%) (fig. 4b).

Discussion

Genetic diversity

Even though the allozymes used by Hedgecock and Okazaki (1984) in *C. corteziensis* from Nayarit differ from those used here, the estimated genetic diversity is comparable between the two studies, indicating that a decrease in diversity has not occurred in a period of about 20 years. This result and the homogeneous diversity among the locations from where *C. corteziensis* was collected has important implications in terms of both the fishery and aquaculture. In the first case, considering that *C. corteziensis* has been heavily exploited near the

de *C. gigas* con valores del remuestreo de 100% en cada nodo (fig. 4a). El análisis de secuencias incluyendo a otras especies de ostión registradas en el GenBank (*C. ariakensis*, *C. rhizophorae* y *C. virginica*) evidenció que el grado de diferenciación del ostión encontrado en Topolobampo y *C. corteziensis* a nivel de especie (fig. 4b) fue ligeramente mayor al observado entre *C. rhizophorae* y *C. virginica* (4.9%) y entre *C. gigas* y *C. ariakensis* (3.4%).

Discusión

Diversidad genética

A pesar de que los loci alozimáticos utilizados por Hedgecock y Okazaki (1984) en *C. corteziensis* recolectados

Table 3. Comparative analysis of the 334-base-pair 16SrRNA gene sequence of three oyster species: *Crassostrea corteziensis* (origin: Culiacán and Guaymas), *Crassostrea* sp. (Topolobampo), and *C. gigas*. The number indicates the position of the nucleotide in the sequence. The dot indicates the same nucleotide as in the *C. corteziensis* sequence and the dash indicates the absence of a nucleotide relative to *C. gigas*.

Tabla 3. Análisis comparativo de la secuencia de 334 bases del gen 16SrRNA en tres especies de ostión: *Crassostrea corteziensis* (origen: Culiacán y Guaymas), *Crassostrea* sp. (Topolobampo) y *C. gigas*. El número indica la posición de la base nucleotídica variable en la secuencia; el punto indica la misma base que en la secuencia de *C. corteziensis*; el guión indica la ausencia de la base respecto a *C. gigas*.

Species	11	12	14	16	18	19	20	24	35	76	82	87	101	109
<i>Crassostrea corteziensis</i>	A	T	-	-	A	T	T	C	T	A	A	A	G	C
<i>Crassostrea</i> sp.	G	•	-	-	•	C	•	T	•	•	•	•	•	•
<i>Crassostrea gigas</i>	G	A	A	A	T	A	C	A	C	G	G	T	A	T
	110	112	122	124	125	127	129	130	141	143	146	157	161	165
<i>Crassostrea corteziensis</i>	C	C	C	G	C	C	A	T	C	G	G	A	C	A
<i>Crassostrea</i> sp.	•	•	T	•	•	T	•	C	•	•	A	G	T	•
<i>Crassostrea gigas</i>	T	G	A	A	T	T	T	•	T	C	A	•	T	T
	166	167	173	180	208	210	211	213	216	218	219	220	221	222
<i>Crassostrea corteziensis</i>	A	G	A	G	G	C	A	G	A	A	T	G	G	C
<i>Crassostrea</i> sp.	•	A	•	•	•	T	•	A	•	•	•	T	A	•
<i>Crassostrea gigas</i>	T	A	T	A	C	T	T	A	C	G	G	A	•	T
	234	246	248	250	253	257	259	266	268	271	272	281	286	288
<i>Crassostrea corteziensis</i>	A	G	A	G	G	A	A	C	T	T	T	T	A	T
<i>Crassostrea</i> sp.	G	•	•	•	T	G	•	•	•	•	•	•	•	•
<i>Crassostrea gigas</i>	•	T	G	A	C	G	C	T	C	A	A	C	T	C
	289	292	299	202	203	204	205	207	215	244	257	260	268	269
<i>Crassostrea corteziensis</i>	G	G	C	C	C	T	A	G	A	C	A	C	A	A
<i>Crassostrea</i> sp.	A	•	T	•	A	•	•	•	•	•	•	•	•	•
<i>Crassostrea gigas</i>	•	T	•	T	T	A	T	T	T	T	G	T	G	G
	278	306	313	316	325	332	333	334						
<i>Crassostrea corteziensis</i>	C	T	T	G	C	A	C	T						
<i>Crassostrea</i> sp.	A	•	C	A	•	G	T	T						
<i>Crassostrea gigas</i>	A	A	•	A	G	A	A	A						

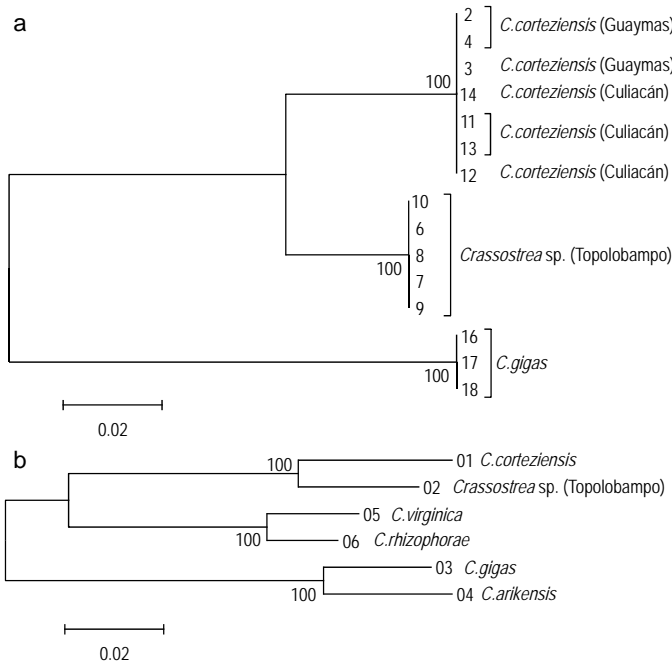


Figure 4. Neighbor-joining dendrogram of mtDNA sequence homologies: (a) location comparison and (b) *Crassostrea* species comparison. Numbers in nodes represent bootstrap values (500 iterations).

Figura 4. Dendrograma de vecino más cercano de homologías de secuencias de ADN mitocondrial: (a) comparación entre localidades de muestreo y (b) comparación entre especies de *Crassostrea*. Los valores en los nodos corresponden al re-muestreo mediante la técnica *bootstrap* (500 repeticiones).

Guaymas region and north of the state of Sinaloa (Chávez-Villalba *et al.* 2005), our data show that there is no evidence that the population has passed through a bottleneck, and thus the effective population size has probably not been significantly reduced.

In regard to aquaculture, *C. corteziensis* has been cultured in Nayarit for more than 25 years (Stuardo and Martínez 1975). The culture system in this region has depended on the natural collection of spat settled in seed collectors at Boca de Camichín estuary, and since large amounts of oysters are being cultivated, it is highly probable that most seed comes from cultured animals. No reduction in genetic diversity between the wild population area (North Nayarit) and the cultured area (Nayarit) has been observed, nor is there evidence of bottleneck caused by aquaculture. This indicates that the cultured population maintains a sufficiently large effective size, contrary to what commonly occurs in artificial spat production in hatcheries of other oyster species such as *Ostrea edulis* (Saavedra 1997), where just a few organisms are used as broodstock, leading to a reduction in genetic variability.

Gene flow and population structure

The high gene flow detected by the allozyme analysis indicates that this species forms a single panmictic population

en Nayarit son distintos a los del presente estudio, los niveles de diversidad genética son comparables entre ambos estudios, en particular con los de la muestra de Nayarit Norte, lo que indica que probablemente no ha ocurrido un descenso considerable de este indicador de diversidad en un periodo de aproximadamente 20 años. Lo anterior, aunado a la homogeneidad en la diversidad genética observada entre las localidades en donde se recolectó *C. corteziensis*, tiene implicaciones de interés tanto desde el punto de vista pesquero como acuícola. En el primer caso, si se considera que *C. corteziensis* ha estado sujeto a una intensa pesquería, particularmente en la región de Guaymas y el norte de Sinaloa (Chávez-Villalba *et al.* 2005), los datos indican que a pesar de ello, aún no existen evidencias de que la población se haya visto afectada por un cuello de botella, lo que permite hipotetizar que probablemente el tamaño efectivo de la población en el área de pesca no se ha reducido significativamente, o bien que el número de generaciones no ha sido suficiente que se acumulen los efectos de un cuello de botella.

Por lo que se refiere a la actividad acuícola, el cultivo de *C. corteziensis* en sartas se lleva a cabo desde hace muchos años, particularmente en el estado de Nayarit, en donde Stuardo y Martínez (1975) demostraron la factibilidad de dicho cultivo. En esta región la semilla para el cultivo se obtiene de colectores colocados en el cuerpo de agua del estero Boca de Camichín en áreas cercanas a los propios sitios de cultivo, de manera que es muy probable que dicha semilla provenga de los propios organismos cultivados. En este sentido no se observan reducciones en la diversidad genética entre el área de recolecta silvestre (Nayarit Norte) y los organismos recolectados de las sartas de cultivo (Nayarit), así como tampoco existen evidencias de cuellos de botella causados por el cultivo. Lo anterior indica que pese a la extensa actividad acuícola en Nayarit, la población en cultivo se mantiene con un tamaño efectivo suficientemente grande. Es evidente que esta población no presenta un comportamiento como el de la semilla derivada de laboratorios de producción de larvas de otras especies de ostión como *Ostrea edulis*, en los cuales es común que se utilicen pocos reproductores para producir los lotes de semilla, lo que resulta en una baja diversidad genética (Saavedra 1997).

Flujo genético y estructura de la población

El elevado flujo genético detectado con el análisis alozimático indica que esta especie está conformada por una sola población panmictica a lo largo del área de estudio. El tiempo de vida en estado larvario, de aproximadamente 18–22 días (Mazón-Suástegui *et al.* 2002), aunado al régimen de corrientes de la región, se puede considerar la causa del elevado flujo genético. De acuerdo con Marinone (2003), la dirección de la corriente superficial a lo largo de la costa oriental del Golfo de California muestra un patrón norte-sur en la primavera y el otoño, mientras que el patrón es sur-norte en el verano. El hecho de que la temporada de reproducción de *C. corteziensis* tenga lugar predominantemente de julio a noviembre (Stuardo y

throughout the study area. The 18- to 22-day larval period of the species (Mazón-Suástegui *et al.* 2002), together with the coastal oceanic current regime could be the main causes of this high gene flow. According to Marinone (2003), the direction of the surface current along the eastern coast of the Gulf of California shows a northward pattern during spring and winter, and a southward pattern in summer. The fact that the reproductive season of *C. corteziensis* occurs mainly from July to November (Stuardo and Martínez 1975) would explain the gene flow in both directions. The results contrast with that reported for other oyster species such as *Ostrea edulis* in Europe and *C. virginica* in the Gulf of Mexico, for which genetic differences between populations have been found with allozymes as well as nuclear and mitochondrial DNA, showing an isolation-by-distance pattern (Hare and Avise 1996, Launey *et al.* 2002). Even though the geographic range analyzed is over 900 km, it is possible that this pattern has not been detected for *C. corteziensis* because of the relative environmental homogeneity of the region, consisting of large estuarine systems. As the distribution area of the species extends along the tropical Pacific from Mexico to Peru (Fischer *et al.* 1995), in the future it will be necessary to expand the study range for a better understanding of the resource. Moreover, our results differ from those reported by Licona-Chávez *et al.* (2007) for *Chione californiensis*, who found slight but significant genetic differentiation between two locations in the Gulf of California (Agiabampo, Sonora, and La Paz, Baja California Sur). They attributed the limitation of gene flow to the presence of geographic barriers at Agiabampo Estuary that might be partially preventing the entrance of larvae to the lagoon.

The absence of a *C. corteziensis* population genetic structure and its high genetic diversity indicate that the species has recovery potential in those areas that have been under high fishery pressure or affected by habitat destruction. Thus, it will be necessary to determine the location of the stocks that serve as recruit donors, and to design management and restoration strategies for their recovery. Nevertheless, those strategies should take into consideration the influence of other factors such as habitat availability and variations in environmental parameters. As for the implications to aquaculture, it will be possible to develop breeding stocks by collecting animals from diverse parts of the study area.

The high shell morphological variability, characteristic of *Crassostrea* species, usually makes species identification difficult (Galtsoff 1964). To overcome this problem, identification based on molecular markers and cariology has been recommended (Lapegue *et al.* 2002). Using these markers, Lapegue *et al.* (2002) found *C. gasar* on the coasts of Brazil, a species previously reported only for Africa. In the case of the Topolobampo oyster, the combination of the allozyme and mtDNA results indicated that it is not *C. corteziensis* but a different species. From the identification keys of Fischer *et al.* (1995) and the descriptions of Keen (1971), the species identified might be *C. columbiensis*, which has a similar

(Martínez 1975), es decir en verano y otoño, explicaría el amplio flujo genético en ambos sentidos. Los resultados contrastan con lo encontrado en otras especies de ostiones tales como *Ostrea edulis* en Europa y *C. virginica* en el Golfo de México, en las cuales se han detectado diferencias genéticas interpopulacionales, tanto con alozimas como con marcadores genéticos de ADN nuclear y mitocondrial, con patrones marcados bajo el modelo de "aislamiento por distancia" (Hare y Avise 1996, Launey *et al.* 2002). Es probable que este patrón no haya sido detectado en *C. corteziensis* a pesar de que el rango geográfico analizado sea del orden de 900 km, debido a la relativa homogeneidad ambiental de la región, constituida por extensos sistemas estuarinos. Dado que el área de distribución de la especie abarca del Pacífico tropical de México hasta el Perú (Fischer *et al.* 1995) será necesario ampliar el ámbito del estudio hasta esas latitudes, para conocer mejor su comportamiento. Por otro lado, los resultados difieren también a lo observado en la almeja *Chione californiensis* por Licona-Chávez *et al.* (2007), quienes encontraron diferencias ligeras pero significativas entre localidades del Golfo de California (Agiabampo, Sonora, y La Paz, Baja California Sur). De acuerdo con estos autores, el limitado flujo genético entre ellas podría atribuirse a la presencia de barreras geográficas en la Laguna de Agiabampo que evitan parcialmente la entrada de larvas hacia el sistema lagunar.

La ausencia de estructura genética de la población de *C. corteziensis* aunada con los niveles de diversidad genética antes mencionados, indica que la especie tiene un potencial de recuperación en las áreas sujetas a sobreexplotación por pesquerías, o afectadas por efectos del deterioro del hábitat. Para ello será necesario determinar la ubicación de los stocks que pueden funcionar como fuentes de reclutas para los stocks explotables y diseñar esquemas de repoblación y manejo que permitan su recuperación. Sin embargo, dichos esquemas deberán tomar en cuenta la influencia de otros factores como la disponibilidad de hábitat o las variaciones de parámetros ambientales. En cuanto a las implicaciones para la acuicultura, se tendrá la posibilidad de recurrir a la recolecta de organismos en las diversas zonas en donde se distribuye la especie a lo largo del área estudiada, para la conformación de los lotes de reproductores.

Galtsoff (1964) señala que la elevada variabilidad morfológica de la concha de especies de *Crassostrea* dificulta en muchos casos una identificación adecuada. En este sentido, Lapegue *et al.* (2002) recomiendan la utilización de análisis cariológicos y moleculares, a través de los cuales dilucidaron la presencia de una especie antes reportada sólo para África (*C. gasar*) en las costas de Brasil. Para el caso de la muestra de Topolobampo, la combinación de los resultados de alozimas y ADN mitocondrial indicó que se trata de una especie distinta a *C. corteziensis*. El uso de las claves de identificación de Fischer *et al.* (1995) y las descripciones de Keen (1971) indican que posiblemente la especie presente en esa localidad es *C. columbiensis*, la cual tiene un rango de distribución similar al de *C. corteziensis*. Sin embargo, existen todavía vaguedades en

geographic distribution to *C. corteziensis*; however, since *C. columbiensis* has only been vaguely described, the molecular characterization of this and other ostreid species of the Pacific is recommended.

Irrespective of the precise species identification, it should be mentioned that although sample collection was done under similar environmental conditions in all the estuarine systems (mangrove roots at the subtidal level), at Santa María Bay (Topolobampo) only individuals identified as potentially *C. columbiensis* were found. This suggests that it is necessary to determine the specific environmental conditions that favor the development of one species over another, and the ecological relationship between them (e.g., competition for space). Therefore, more intensive sampling within Santa María Bay and the surrounding areas is recommended.

The possible confusion in the identification of the two species should be carefully considered, particularly when individuals are collected to conform broodstocks. If not, there could be the risk of producing hybrid individuals (viable or not), as has occurred in the production of *C. gigas*, which was unintentionally bred with *C. sikamea* specimens (Banks *et al.* 1994).

Acknowledgements

This research was funded by a SAGARPA-CONACYT grant (No. 2003-035) to AM Ibarra. The support of JL Ramírez-Arce was fundamental for obtaining most samples. Thanks are also due to CESANAY for sampling support at Boca de Camichín (Nayarit). An anonymous reviewer helped to improve the manuscript.

References

- Ayala FJ, Powell, JR, Tracey ML, Mourão CA, Pérez-Salas S. 1972. Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics* 70: 113–139.
- Banks MA, McGoldrick DJ, Borgeson W, Hedgecock D. 1994. Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea*. *Mar. Biol.* 121: 127–135.
- Benzie JAH, Williams ST, Macaranas JM. 1993. Allozyme electrophoretic methods for analyzing genetic variation in giant clams (Tridacnidae). Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Tech. Rep. 23, 49 pp.
- Buroker NE. 1983. Population genetics of the American oyster *Crassostrea virginica* along the Atlantic coast and the Gulf of Mexico. *Mar. Biol.* 75: 171–184.
- Chávez-Villalba J, López-Tapia M, Mazon-Suástegui JM, Robles-Mungaray M. 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, Mexico. *Aquacult. Res.* 36: 1337–1344.
- Fischer W, Krupp F, Schneider W, Sommer C, Carpenter KE, Niem VH. (1995) Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico Centro-oriental. Vol. 1. Plantas e Invertebrados. FAO, Rome, Italy, pp. 156–163.
- Galtsoff PS. 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *US Fish Wildl. Serv. Fish. Bull.* 64: 1–480.
- algunas de las descripciones de ambos autores, por lo que es recomendable profundizar en la caracterización molecular de ésta y otras especies de ostréidos del Pacífico.
- Independientemente de la precisa identificación de los ejemplares, cabe mencionar que a pesar de que la recolección de las muestras se realizó bajo condiciones ambientales similares en todos los sistemas lagunares (raíces de los mangles en el nivel submareal), resalta que en la Bahía de Santa María (Topolobampo) se encontraron ejemplares únicamente de la otra especie de *Crassostrea* (posiblemente *C. columbiensis*), lo que indica la necesidad de determinar las condiciones ambientales específicas en las cuales se favorece el desarrollo de una especie sobre el de la otra, así como las relaciones interespecíficas entre ellas (e.g. competencia por espacio). Para ello será necesario hacer muestreos más intensivos dentro del sistema lagunar de la región de Topolobampo y los sistemas lagunares vecinos.
- Por otra parte, debe considerarse la posibilidad de confusión entre las dos especies, particularmente cuando se buscan organismos para conformar lotes de reproductores debido a que se podría incurrir en la producción de híbridos (viables o no), como ha ocurrido en la producción de *C. gigas*, al no saber que algunos reproductores de esta especie se encontraban mezclados con reproductores de *C. sikamea* (Banks *et al.* 1994).

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el fondo sectorial SAGARPA-CONACYT (2003-035) a AM Ibarra. El apoyo de JL Ramírez-Arce fue fundamental para la obtención de la mayor parte de las muestras. Se agradece al CESANAY su apoyo para la obtención de las muestras de Boca de Camichín (Nayarit). Un árbitro anónimo aportó importantes comentarios para mejorar el manuscrito.

- Goudet J. 2000. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.1). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Hare MP, Avise JC. 1996. Molecular genetic analysis of a stepped multilocus cline in the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution* 50: 2305–2315.
- Hedgecock D, Okazaki NB. 1984. Genetic diversity within and between populations of American oysters (*Crassostrea*). *Malacologia* 25: 535–549.
- Keen AM. 1971. Sea Shells of Tropical West America: Marine Mollusks from Baja California to Peru. Stanford Univ. Press, California, pp. 80–84.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinformatics* 5: 150–163.
- Lapegue S, Boutet I, Leitao A, Heurtebire S, García P, Thiriot-Quievreux C, Boudry P. 2002. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16s mtDNA and karyological analyses. *Biol. Bull.* 202: 232–242.
- Launey S, Ledu C, Boudry P, Bonhomme F, Naciri-Graven Y. 2002. Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.)

- as revealed by microsatellite polymorphism. *J. Hered.* 93: 331–351.
- Licona-Chávez A, Correa-Sandoval F, De la Rosa-Vélez J, Camarena-Rosales F. 2007. Genetic and morphometric analysis of *Chione californiensis* and *C. subimbricata* (Bivalvia: Veneridae) from the Mexican East Pacific and Gulf of California. *Cienc. Mar.* 33: 149–171.
- Marinone SG. 2003. A three-dimensional model of the mean and seasonal circulation of the Gulf of California. *J. Geophys. Res.* 108(C10): 3325, doi:10.1029/2002JC001720.
- May B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. In: Hoelzel AR (ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations*. Oxford Univ. Press, pp. 1–27 and 271–280.
- Mazón-Suástegui JM, Robles-Mungaray M, Flores-Higuera F, Avilés-Quevedo S. 2002. Experiencias en la producción de semilla de ostión de placer *Crassostrea corteziensis* en el laboratorio. *Memorias del IV Simposio Nacional de Acuicultura y Pesca*. Antigua, Guatemala, 16–18 de octubre de 2002, pp. 16–18.
- Michinina SR, Rebordinos L. 1997. Genetic differentiation in marine and estuarine natural populations of *Crassostrea angulata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 154: 167–174.
- Murphy RW, Sites JW, Buth DG, Haufler CH. 1996. Proteins: Isozyme electrophoresis. In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (eds.), *Molecular Systematics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts, pp. 51–120.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a smaller number of individuals. *Genetics* 89: 583–590.
- Page RDM. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comp. Appl. Biosci.* 12: 357–358.
- Palumbi SR, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G. 1991. A simple fool's guide to PCR, ver. 2.0. Special publication of the University of Hawaii Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, 46 pp.
- Rice WR. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223–225.
- Rodríguez Romero F, García Saez C, Laguarda Figueras A. 1988. Electrophoretic patterns variation in two oyster populations of *Crassostrea corteziensis* from the Mexican coast. *An. Cienc. Mar Limnol.* 15: 177–184.
- Saavedra C. 1997. Low effective sizes in hatchery populations of the European oyster (*Ostrea edulis*): Implications for the management of genetic resources. *J. Shellfish Res.* 16: 441–446.
- Selander RK, Smith MH, Yang SY, Johnson WE, Gentry JB. 1971. Biochemical polymorphism and systematics in the genus *Peromyscus*. I. Variation in the old-field mouse (*Peromyscus polionotus*). In: Marshall-Wheeler Genetics Foundation (ed.), *Studies in Genetics*. VI. Univ. Texas Publ. 7103, pp. 49–90.
- Shaklee JB, Keenan CP. 1986. A practical laboratory guide to the techniques and methodology of electrophoresis and its application to fish fillet identification. CSIRO Marine Laboratories, Rep. 177, 59 pp.
- Shaklee JB, Allendorf FW, Morizot DC, Whitt GS. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 2–15.
- Shaw CR, Prasad R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes: A compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 4: 297–320.
- Stuardo J, Martínez A. 1975. Relaciones entre algunos factores ecológicos y la biología, de poblaciones de *Crassostrea corteziensis* Hertlein, 1951, de San Blas, Nayarit, México. *An. Cent. Cienc. Mar Limnol.* 2: 89–130.
- Sweijd N, Bowie RCK, Lopata AL, Marinaki AM, Harley EH, Cook PA. 1998. A PCR technique for forensic species-level identification of abalone tissue. *J. Shellfish Res.* 17: 889–895.
- Swofford DL, Selander RB. 1981. BIOSYS-1: A Fortran program for the comprehensive analyses of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.* 72: 281–283.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- Yeh FC, Rong-cai Y, Boyle T. 1999. Popgene version 1.31. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta. Available from <http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh>.

Recibido en julio de 2007;
aceptado en junio de 2008.