

## Genetic variability of *Crassostrea gigas* and *Crassostrea corteziensis* from a hatchery in northwestern Mexico

### Variabilidad genética de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea corteziensis* de un laboratorio de producción del noroeste de México

TL Enríquez-Espinoza, JM Grijalva-Chon\*

Universidad de Sonora, Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas, Rosales y Niños Héroes s/n, Hermosillo 83000, Sonora, México. \*E-mail: mgrijal@guayacan.uson.mx

**ABSTRACT.** To evaluate the genetic variability of oysters supplied by the Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (Marine Species Hatchery Center of the State of Sonora), allozyme loci of triploid *Crassostrea gigas* ( $n = 78$ ) and the F1 generation of a new batch of diploid native oyster *Crassostrea corteziensis* ( $n = 78$ ) were analyzed. For the *C. gigas* sample, 10 enzymatic systems were analyzed, revealing 16 loci of which 12 were polymorphic. For *C. corteziensis*, 9 enzymatic systems revealed 13 loci, of which 8 were polymorphic. The average expected and observed heterozygosities for *C. gigas* were 0.350 and 0.309, respectively, with no significant differences between them. These figures are similar to those reported for wild diploid organisms, but lower than those reported for triploids. The average expected and observed heterozygosities for *C. corteziensis* were 0.294 and 0.065, with significant differences ( $P = 0.001$ ). The phenotypic frequency analysis of the 12 polymorphic loci of *C. gigas* demonstrated that only 3 loci (AKP\*, EST-2\*, and PEP-1\*) were in equilibrium according to the Hardy-Weinberg Law, with an average inbreeding of 0.133. For *C. corteziensis*, the 8 polymorphic loci were found outside of the Hardy-Weinberg Law, reflecting a high inbreeding value of 0.777 because of the large heterozygote deficiency in all loci, suggesting that the source broodstock is genetically eroded. If genetic variability is not considered in the selection of the broodstock, oyster culture in northwest Mexico will become unstable. We recommend a program of selection of diploid lineages of *C. gigas* with a good genetic variability and a good level of heterozygosity, and for *C. corteziensis* it is important to choose the wild population with the lowest inbreeding index in order to get a genetically healthy broodstock.

*Key words:* oyster, molluscs, aquaculture, genetic variability, allozymes.

**RESUMEN.** Para evaluar la variabilidad genética de los ostiones suministrados por el Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora, se analizaron loci alozímicos en *Crassostrea gigas* triploide ( $n = 78$ ) y la F1 de un nuevo lote de ostión nativo *Crassostrea corteziensis* ( $n = 78$ ). En la muestra de *C. gigas* se analizaron 10 sistemas enzimáticos que revelaron 16 loci, de los cuales 12 fueron polimórficos. Para *C. corteziensis*, 9 sistemas enzimáticos revelaron 13 loci, de los cuales 8 fueron polimórficos. Los promedios de la heterocigosis esperada y observada para *C. gigas* fueron de 0.350 y 0.309, respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos. Estos niveles son similares a los reportados para organismos silvestres diploides pero menores a los reportados para organismos triploides. Los promedios de la heterocigosis esperada y observada para *C. corteziensis* fueron de 0.294 y 0.065, con diferencias significativas ( $P = 0.001$ ). El análisis de las frecuencias fenotípicas de los 12 loci polimórficos en *C. gigas* demostró que sólo 3 loci (AKP\*, EST-2 y PEP-1\*) estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg, con una endogamia promedio de 0.133. Para *C. corteziensis*, los 8 loci polimórficos estuvieron fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg y reflejaron una alta endogamia de 0.777 debido a una gran deficiencia de heterocigotos en todos los loci, sugiriendo que el pie de cría fuente está genéticamente erosionado. Si la variabilidad genética no se considera en la selección del pie de cría, el cultivo de ostión en el noroeste de México será inestable. Se recomienda un programa de selección de un linaje diploide de *C. gigas* que posea una buena variabilidad genética y un buen nivel de heterocigosis, además de seleccionar las poblaciones silvestres de *C. corteziensis* con el menor índice de endogamia con el fin de obtener un pie de cría genéticamente saludable.

*Palabras clave:* ostión, moluscos, acuicultura, variabilidad genética, alozimas.

## INTRODUCTION

In Mexico, the cultivation of *Crassostrea gigas* began in the 1970s in San Quintín, Baja California, using spat from the USA. At present, *C. gigas* culture along the Mexican Pacific coast survives with ups and downs because of mass mortality events that have occurred since 1997, with up to 90% of the organisms dying in each event. During this time, efforts have been made to establish culture schemes for *Crassostrea corteziensis* since it is a potential endemic alternative

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Crassostrea gigas* se estableció en México en la década de los setentas en San Quintín, Baja California, con semilla proveniente de los Estados Unidos. Actualmente, el cultivo de *C. gigas* a lo largo de la costa del Pacífico mexicano sobrevive con altas y bajas debido a eventos de severas mortalidades masivas que han ocurrido desde 1997, con mortalidades de hasta 90% en cada evento. Durante este tiempo se han hecho algunos esfuerzos para establecer

(Baqueiro 1991, Chávez-Villalba *et al.* 2005), though its low growth rate is not attractive enough for some oyster farmers. Official data do not discriminate oyster species and report yields of 41,700 t per year from cultures in both Pacific and Gulf of Mexico waters (CONAPESCA 2005).

The massive production of aquatic species requires knowledge and tracking of the genetic variability, which is easily eroded by the artificial selection involved in the genetic improvement process (Álvarez-Jurado 1987, Benzie and Williams 1996). Oysters are highly fecund and hatcheries sometimes use just a few organisms per generation as breeders (Appleyard and Ward 2006) with severe consequences to heterozygosity. In Mexico, only two genetic studies of *C. gigas* have been made, both based on allozymes. De la Rosa-Vélez *et al.* (1991) reported good genetic variability in cultures at San Quintín, Baja California, but more than 10 years later, Correa *et al.* (2004) reported a severe reduction in variability at the same oyster farm. For *C. corteziensis*, Cruz *et al.* (2007) characterized microsatellite markers and Pérez-Enríquez *et al.* (2008) carried out a population genetic study based on allozymes along the Mexican Pacific coast.

The Marine Species Hatchery Center of the State of Sonora (Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora, CREMES) supplies more than 50 oyster farms in northwestern Mexico, providing spat of both diploid *C. gigas* and *C. corteziensis*. It has an operating capacity of 50 million spat per year, and is the first certified hatchery and the only one with a production capability of 100 million spat in Mexico. Also, CREMES imports triploid spat from abroad depending on availability. As severe mortality events are of great concern to the oyster-culture industry, a multidisciplinary research project was initiated in 2006 to describe the status of cultured oysters. Here we analyze the genetic variability of triploid *C. gigas* imported by CREMES and distributed to oyster farms for cultivation, and of a F1 generation of *C. corteziensis* that is to be used to establish a new culture strain.

## MATERIAL AND METHODS

CREMES provided 78 adult interplod (diploid  $\times$  tetraploid) triploid *C. gigas* acquired as spat from a hatchery in Oregon, USA, and grown at the coastal lagoon of La Cruz, Sonora (28°47'60" N, 111°55'04" W). It also provided 78 adult *C. corteziensis* grown at the same site as *C. gigas* and representing the F1 offspring of wild organisms collected 450-km south of La Cruz, off Ahome, Sinaloa (25°45'58" N, 109°27'38" W). Live oysters were transported 110-km inland to the University of Sonora to obtain the abductor muscle and digestive gland, which were homogenized according to Grijalva-Chon *et al.* (1996); the protein suspensions were stored at -70°C until further analysis.

Ten enzymatic systems were analyzed for *C. gigas* and nine for *C. corteziensis* (table 1); these systems have shown

esquemas de cultivo para *Crassostrea corteziensis* ya que es una alternativa endémica potencial (Baqueiro 1991, Chávez-Villalba *et al.* 2005), pero su baja tasa de crecimiento no es lo suficientemente atractiva para algunos de los ostricultores. En los datos oficiales no se distinguen ostiones por especie y se reportan producciones de cultivo de 41,700 t por año para ambas costas, el Pacífico y el Golfo de México (CONAPESCA 2005).

La producción masiva de especies acuáticas requiere el conocimiento y seguimiento de la variabilidad genética, la cual es fácilmente erosionada por la selección artificial involucrada en el proceso de mejoramiento genético (Álvarez-Jurado 1987, Benzie y Williams 1996). Los ostiones son altamente fecundos y los laboratorios productores en ocasiones utilizan pocos organismos como reproductores (Appleyard y Ward 2006), con severas consecuencias en el nivel de la heterocigosis en la progenie resultante. En México sólo se han realizado dos estudios para *C. gigas*, ambos con alozimas. De la Rosa-Vélez *et al.* (1991) reportaron una buena variabilidad genética en cultivos de San Quintín, Baja California. Más de 10 años después, Correa *et al.* (2004) reportaron una severa reducción de la variabilidad en el mismo campo ostrícola. Para *C. corteziensis*, Cruz *et al.* (2007) caracterizaron marcadores microsatelitales y Pérez-Enríquez *et al.* (2008) realizaron un estudio genético poblacional con alozimas en varias localidades del Pacífico mexicano.

El Centro Reproductor de Especies Marinas del Estado de Sonora (CREMES) atiende a más de 50 campos ostrícolas en el noroeste de México, produciendo semilla de *C. gigas* y *C. corteziensis* diploides. Este centro tiene una capacidad operativa de 50 millones de semillas al año y es el primer laboratorio productor de semilla certificado, el único y más grande en el país con una capacidad instalada de 100 millones de semillas. También, CREMES importa del extranjero semillas de ostión diploide o triploide, dependiendo de la disponibilidad. Debido a que los eventos de mortalidad masiva son de gran interés y preocupación para la industria ostrícola, en 2006 inició un proyecto de investigación multidisciplinario para describir el estado de los ostiones en cultivo. En este trabajo se presentan los resultados sobre la variabilidad genética de los organismos triploides *C. gigas* importados por CREMES y distribuidos en los campos ostrícolas para su cultivo, y sobre la variabilidad de una generación F1 de *C. corteziensis* con la que se pretende establecer un nuevo linaje de cultivo para uso de los ostricultores de la región.

## MATERIALES Y MÉTODOS

CREMES proporcionó 78 adultos de *C. gigas* triploides interploides (producto de la cruce diploide  $\times$  tetraploide) que fueron adquiridos como semilla de un laboratorio ubicado en Oregon, EUA, y engordados en la laguna costera La Cruz, Sonora (28°47'60" N, 111°55'04" W). CREMES también proporcionó 78 adultos de *C. corteziensis*, engordados en el mismo sitio que *C. gigas*, que representaron una parte de

satisfactory results in diploid *C. gigas* and *C. virginica* (De la Rosa-Vélez and Rodríguez-Romero 1989, De la Rosa-Vélez *et al.* 1991, Correa *et al.* 2004). The electrophoresis support medium was a 12% starch gel, as used by Aebersold *et al.* (1987), and the loci were interpreted and named according to Grant *et al.* (1984), Utter *et al.* (1988), and Shaklee *et al.* (1990).

Data were analyzed using Biosys-1 software (Swofford and Selander 1981) and loci were considered polymorphic if the frequency of the most common allele did not exceed 95%. For the analysis of triploid *C. gigas*, the few triple heterozygotes found were not considered. In the other heterozygotes, the alleles with double doses could not be differentiated and were analyzed in the usual way with Biosys-1. Unbiased heterozygosity was calculated according to Nei (1978), and the differences between observed (*Ho*) and expected (*He*) values were tested using Student's *t*-test. Additionally, heterozygosity deficiency or excess was estimated by  $D = Ho - He/He$ . Genetic equilibrium according to the Hardy-Weinberg Law was tested using a  $\chi^2$  analysis. In the loci out of equilibrium, the phenotypes with discrepancies

la generación F1 de organismos silvestres recolectados a 450 km al sur de La Cruz frente a las costas de Ahome, Sinaloa (25°45'58" N, 109°27'38" W). Los ostiones fueron transportados vivos a las instalaciones de la Universidad de Sonora, 110 km tierra adentro, para obtener el músculo abductor y la glándula digestiva, los cuales fueron homogeneizados de acuerdo con Grijalva-Chon *et al.* (1996). Las suspensiones proteínicas fueron almacenadas a -70°C hasta su análisis.

Se analizaron 10 sistemas enzimáticos para *C. gigas* y 9 para *C. corteziensis* (tabla 1), los cuales han demostrado resultados satisfactorios en *C. gigas* diploide y *C. virginica* (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero 1989, De la Rosa-Vélez *et al.* 1991, Correa *et al.* 2004). El medio de soporte electroforético fue a base de geles de almidón al 12%, como se describe en Aebersold *et al.* (1987), y los *loci* se interpretaron y nombraron de acuerdo con Grand *et al.* (1984), Utter *et al.* (1988) y Shaklee *et al.* (1990).

Los datos se analizaron con el programa Biosys-1 (Swofford y Selander 1981), en donde los *loci* se consideraron polimórficos si la frecuencia del alelo más común no

**Table 1.** Revealed loci, buffer solutions, and stains used in the allozyme analysis of triploid *Crassostrea gigas* and diploid *C. corteziensis* from northwestern Mexico. EC, Enzyme Commission number.

**Tabla 1.** Loci revelados, soluciones amortiguadoras y tinciones utilizadas en el análisis de alozimas de *Crassostrea gigas* triploide y *C. corteziensis* diploide del noroeste de México. EC, nomenclatura de la Comisión Enzimática.

Enzymatic system	EC	<i>C. gigas</i>		<i>C. corteziensis</i>		Stain <sup>b</sup>
		Locus	Buffer <sup>a</sup>	Locus	Buffer <sup>a</sup>	
Alcohol dehydrogenase	1.1.1.1	<i>ADH*</i>	F	–	–	1
Aspartate aminotransferase	2.6.1.1	<i>AAT-1*</i>	C	<i>AAT-1*</i>	C	2
		<i>AAT-2*</i>	C	<i>AAT-2*</i>	C	
Cytosol dipeptidase	3.4.13.18	<i>PEP-1*</i>	J	<i>PEP-1*</i>	J	5
		<i>PEP-2*</i>	J	<i>PEP-2*</i>	J	
Malic enzyme	1.1.1.40	–	–	<i>MEZ-1*</i>	K	2
Esterase	3.1.1.1	<i>EST-2*</i>	D	<i>EST-2*</i>	K	1
		<i>EST-3*</i>	D	–	–	
		<i>EST-4*</i>	D	–	–	
Acid phosphatase	3.1.3.2	<i>ACP*</i>	C	<i>ACP*</i>	J	1
Alkaline phosphatase	3.1.3.1	<i>AKP*</i>	C	<i>AKP*</i>	J	4
Phosphoglucomutase	5.4.2.2	<i>PGM-1*</i>	K	<i>PGM-1*</i>	K	2
		<i>PGM-2*</i>	K	<i>PGM-2*</i>	K	
Glutamate dehydrogenase	1.4.1.3	<i>GDH*</i>	F	–	–	2
Isocitrate dehydrogenase	1.1.1.42	<i>IDH-1*</i>	K	<i>IDH-1*</i>	K	3
		<i>IDH-2*</i>	K	<i>IDH-2*</i>	K	
Leucinamine peptidase	3.4.11.1	<i>LAP*</i>	D	<i>LAP*</i>	D	1

<sup>a</sup> Buffer solutions: C = TRIS borate (Ayala *et al.* 1973), D = TRIS citrate pH 7.0 (Ayala *et al.* 1973), F = TRIS citrate (Shaw and Prasad 1970), J = lithium borate (Ridway *et al.* 1970), K = TRIS citrate pH 7.0 (Tracey *et al.* 1975).

<sup>b</sup> Stains: 1 = Shaw and Prasad (1970), 2 = Schaal and Anderson (1974), 3 = Abreu-Grobois (1983), 4 = Shaw and Koen (1968), 5 = May (1992).

in expected and observed frequencies were determined with HW-QuickCheck software (Kalinowski 2006). The inbreeding index (*Fis*) was calculated from allelic frequencies (Wright 1965) and the significance of its departures from zero was estimated according to Li and Horvitz (1953).

## RESULTS

In *C. gigas*, 16 loci were satisfactorily revealed, of which 12 were polymorphic (*AAT-2\**, *AKP\**, *EST-2\**, *EST-3\**, *EST-4\**, *IDH-1\**, *IDH-2\**, *LAP\**, *PEP-1\**, *PEP-2\**, *PGM-1\**, *PGM-2\**) and 4 monomorphic (*AAT-1\**, *ACP\**, *ADH\**, *GDH\**). In *C. corteziensis*, 13 loci were revealed, of which 8 were polymorphic (*AAT-1\**, *AAT-2\**, *EST-2\**, *LAP\**, *PEP-1\**, *PEP-2\**, *PGM-1\**, *PGM-2\**) and 5 monomorphic (*ACP\**, *AKP\**, *IDH-1\**, *IDH-2\**, *MEZ-1\**). The locus *MEZ-1\** in *C. gigas* and the loci *ADH\**, *EST-3\**, *EST-4\**, and *GDH\** in *C. corteziensis* were eliminated from the analysis because good resolution was not obtained. The triploid condition in *C. gigas* was corroborated in *LAP\** with eight three-banded heterozygotes. No other triple heterozygote was found in the other loci. Two-banded *LAP\** triploid heterozygotes have two alleles, one of them in double doses.

Because some organisms were inactive in the staining process, the average sample size per locus was  $67 \pm 3$  for *C. gigas* and  $69 \pm 3$  for *C. corteziensis*. The average number of alleles per locus and percentage of polymorphic loci were  $2.4 \pm 0.2$  and 75% for *C. gigas* and  $2.5 \pm 0.4$  and 62% for *C. corteziensis*. No significant differences were found between observed and expected heterozygosity ( $0.350 \pm 0.066$  vs  $0.309 \pm 0.072$ ) in *C. gigas*, whereas in *C. corteziensis* the observed heterozygosity was less than the expected heterozygosity ( $0.065 \pm 0.024$  vs  $0.294 \pm 0.080$ ,  $P = 0.001$ ). These differences in heterozygosity values are reflected in the heterozygosity per locus, especially in *C. corteziensis*, with a greater range for expected heterozygosity (tables 2, 3).

The phenotype frequency analysis of 12 polymorphic loci in *C. gigas* showed that only 3 loci (*AKP\**, *EST-2\**, and *PEP-1\**) were in Hardy-Weinberg equilibrium, whereas in *C. corteziensis* all 8 polymorphic loci were out of equilibrium. Several phenotypes were responsible for that disequilibrium, especially in *C. corteziensis* (tables 4, 5). The genetic disequilibrium was caused mainly by heterozygote deficiency in both species, and was corroborated by the negative values in the *D* coefficient and with repercussion in the high *Fis* values, especially in *C. corteziensis* (table 6).

## DISCUSSION

In northwestern Mexico, diploid *C. gigas* was introduced in the 1970s, chemical triploids were introduced in the 1980s, and interloid triploids in the 1990s from hatcheries in the USA; however, studies that certify the genetic variability of interloid triploid oysters cultured in Mexico are nonexistent. The importance of tetraploid  $\times$  diploid crossbreeding in terms

excedió 95%. Para el análisis de *C. gigas* triploide no se tomaron en cuenta los pocos triples heterocigotos que se presentaron. En el resto de los heterocigotos no se pudo discriminar con certeza el alelo con doble dosis, por lo que fueron analizados de la manera habitual en Biosys-1. La heterocigosis inesgada se calculó de acuerdo con Nei (1978) y las diferencias entre los valores observados (*Ho*) y los esperados (*He*) se verificaron con una prueba *t* de Student. Adicionalmente, la deficiencia o exceso de heterocigosis se estimó con  $D = Ho - He/He$ . El equilibrio genético de Hardy-Weinberg se comprobó con un análisis de  $\chi^2$ . En aquellos loci fuera de equilibrio, los fenotipos con discrepancias se determinaron con el programa HW-QuickCheck (Kalinowski 2006). A partir de las frecuencias alélicas se estimó el índice de endogamia (*Fis*) (Wright 1965) y la significancia de su igualdad a cero se estimó de acuerdo con Li y Horvitz (1953).

## RESULTADOS

Se revelaron satisfactoriamente 16 loci en *C. gigas*, de los cuales 12 fueron polimórficos (*AAT-2\**, *AKP\**, *EST-2\**, *EST-3\**, *EST-4\**, *IDH-1\**, *IDH-2\**, *LAP\**, *PEP-1\**, *PEP-2\**, *PGM-1\**, *PGM-2\**) y 4 monomórficos (*AAT-1\**, *ACP\**, *ADH\**, *GDH\**). En *C. corteziensis* se revelaron 13 loci, de los cuales 8 fueron polimórficos (*AAT-1\**, *AAT-2\**, *EST-2\**, *LAP\**, *PEP-1\**, *PEP-2\**, *PGM-1\**, *PGM-2\**) y 5 monomórficos (*ACP\**, *AKP\**, *IDH-1\**, *IDH-2\**, *MEZ-1\**). El locus *MEZ-1\** de *C. gigas* y los loci *ADH\**, *EST-3\**, *EST-4\** y *GDH\** en *C. corteziensis* se eliminaron del análisis ya que no presentaron buena resolución. La condición triploide en *C. gigas* se corroboró en *LAP\** con la presencia de ocho heterocigotos de tres bandas. Ningún otro triple heterocigoto se encontró en el resto de los loci. Los organismos triploides heterocigotos de *LAP\** con dos bandas tienen dos alelos, uno de ellos con dosis doble.

Considerando que algunos organismos se mostraron inactivos en el proceso de revelado enzimático, el tamaño promedio de la muestra por locus fue de  $67 \pm 3$  para *C. gigas* y de  $69 \pm 3$  para *C. corteziensis*. El número promedio de alelos por locus y el porcentaje de loci polimórficos para *C. gigas* fue de  $2.4 \pm 0.2$  y 75%, y para *C. corteziensis* fue de  $2.5 \pm 0.4$  y 62%. No se encontraron diferencias significativas entre la heterocigosis observada y la esperada ( $0.350 \pm 0.066$  vs  $0.309 \pm 0.072$ ) en *C. gigas*, a diferencia de *C. corteziensis* en donde la heterocigosis observada fue menor que la esperada ( $0.065 \pm 0.024$  vs  $0.294 \pm 0.080$ ,  $P = 0.001$ ). Esas diferencias en heterocigosis se ven reflejadas en la heterocigosis por locus, especialmente en *C. corteziensis*, con un mayor rango en la heterocigosis esperada (tablas 2, 3).

El análisis de las frecuencias fenotípicas de los 12 loci polimórficos de *C. gigas* mostraron que sólo 3 loci (*AKP\**, *EST-2\** y *PEP-1\**) estuvieron en equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que en *C. corteziensis* todos los 8 loci polimórficos estuvieron fuera de equilibrio. Varios fenotipos

**Table 2.** Allelic frequencies, observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity, and analyzed organisms ( $n$ ) in the polymorphic loci of triploid *Crassostrea gigas* cultured in northwestern Mexico.**Tabla 2.** Frecuencias alélicas, heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), y organismos analizados ( $n$ ) en los loci polimórficos de *Crassostrea gigas* triploide cultivado en el noroeste de México.

Locus	Allele	Allelic frequencies	$H_o$	$H_e$	$n$
AAT-2*	100	0.375	0.768	0.731	56
	85	0.321			
	63	0.179			
AKP*	100	0.923	0.128	0.143	78
	113	0.77			
EST-2*	100	0.455	0.657	0.683	67
	106	0.172			
	90	0.276			
	85	0.097			
EST-3*	100	0.493	0.667	0.612	69
	90	0.355			
	110	0.152			
EST-4*	100	0.801	0.315	0.330	73
	126	0.171			
	70	0.027			
IDH-1*	100	0.691	0.171	0.478	76
	105	0.138			
	95	0.171			
IDH-2*	100	0.862	0.101	0.243	69
	110	0.123			
	85	0.014			
LAP*	100	0.479	0.586	0.626	70
	110	0.343			
	90	0.179			
PEP-1*	100	0.689	0.356	0.433	45
	78	0.311			
PEP-2*	100	0.628	0.744	0.538	43
	82	0.233			
	117	0.140			
PGM-1*	100	0.640	0.293	0.506	75
	95	0.287			
	110	0.073			
PGM-2*	100	0.833	0.158	0.280	57
	85	0.167			

of genetic variability offers possibilities to better study allele combinations.

Several studies on wild and feral populations of *C. gigas* have reported heterozygosities of more than 20% (Buroker *et al.* 1975, 1979; Smith *et al.* 1986; English *et al.* 2000; Appleyard and Ward 2006), surpassing the heterozygosities for 17 species of the family Ostreidae (De la Rosa-Vélez *et al.* 1991). However, as for other cultured species, the loss of genetic variability in cultured *C. gigas* has been documented (Ward *et al.* 2000). In San Quintín (Baja California), the heterozygosity of *C. gigas* has dropped from 0.281 to

fueron responsables del desequilibrio, especialmente en *C. corteziensis* (tablas 4, 5). El desequilibrio genético estuvo causado principalmente por una deficiencia de heterocigotos en ambas especies y estuvo corroborado por los valores negativos del coeficiente  $D$  y con repercusión en los elevados valores de  $F_{is}$ , especialmente en *C. corteziensis* (tabla 6).

## DISCUSIÓN

En el noroeste de México el ostión *C. gigas* diploide fue introducido en los setentas, los triploides químicos en los

**Table 3.** Allelic frequencies, observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosity, and analyzed organisms ( $n$ ) in the polymorphic loci of diploid *Crassostrea corteziensis* cultured in northwestern Mexico.**Tabla 3.** Frecuencias alélicas, heterocigosis observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), y organismos analizados ( $n$ ) en los loci polimórficos de *Crassostrea corteziensis* diploide cultivado en el noroeste de México.

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

values  $<0.05$  in 10 years (De la Rosa-Vélez *et al.* 1991, Correa *et al.* 2004). It is evident that during that lapse of time the importance of genetic variability was not considered to obtain a progeny of quality. In hatcheries where environmental factors are controlled, the loss of genetic variability depends on the number of broodstock (De la Rosa-Vélez and Rodríguez-Romero 1988, Appleyard and Ward 2006), which is an important aspect that should not be minimized to avoid genetic erosion.

For aquaculture, the relevance of triploid oysters lies in their fast growth rate, their sterility, and their better taste when compared with mature diploids (Boudry *et al.* 1998, Hand *et al.* 2004). Furthermore, the three chromosome complement implies higher heterozygosity (Ward *et al.* 2000) and more genotypic classes are therefore expected, so that inter-ploid triploids have a genetic variability 19% greater than chemical triploids (Wang *et al.* 2002). In our study, observed heterozygosity for triploid *C. gigas* was 0.309. This value is similar to that reported for Australian feral populations, wild Japanese populations, and four-generation hatchery strains

ochentas y los triploides interploides en los noventas, todos de laboratorios de los EUA; sin embargo, no existen estudios que certifiquen la variabilidad genética de los triploides interploides cultivados en México. La importancia en términos genéticos de las cruces de organismos tetraploides  $\times$  diploides estriba en que ofrecen posibilidades para estudiar mejor las combinaciones alélicas resultantes.

Varios estudios sobre poblaciones silvestres y ferales de *C. gigas* reportaron heterocigosis mayores que 20% (Buroker *et al.* 1975, 1979; Smith *et al.* 1986; English *et al.* 2000; Appleyard y Ward 2006), lo cual rebasa las heterocigosis para 17 especies de la familia Ostreidae (De la Rosa-Vélez *et al.* 1991). Sin embargo, como en otras especies cultivadas, se ha documentado la pérdida de variabilidad genética en *C. gigas* cultivado (Ward *et al.* 2000). En San Quintín, Baja California, la heterocigosis de *C. gigas* ha disminuido de 0.281 a valores menores que 0.05 en 10 años (De la Rosa-Vélez *et al.* 1991, Correa *et al.* 2004). Fue evidente que en ese lapso de tiempo los proveedores de semilla no consideraron la importancia de la variabilidad genética para obtener

**Table 4.** Observed and expected phenotype distributions at the polymorphic loci for triploid *Crassostrea gigas* cultured in northwestern Mexico. The probability of fit to the Hardy-Weinberg distribution per locus is shown in parentheses.  $P_0$ , probability of fit per phenotype. NS, not significant.

**Tabla 4.** Distribuciones fenotípicas observadas y esperadas en los loci polimórficos de *Crassostrea gigas* triploide cultivado en el noroeste de México. Entre paréntesis se muestra la probabilidad de ajuste a la distribución de Hardy-Weinberg por locus.  $P_0$  es la probabilidad de ajuste por fenotipo. NS, no significativo.

Locus	Phenotype	Observed	Expected	$P_0$	Locus	Phenotype	Observed	Expected	$P_0$
<i>AAT-2*</i> (0.000)	100/100	9	8	NS	<i>IDH-2*</i> (0.000)	100/100	56	51	<0.001
	100/85	24	14	NS		100/110	7	15	<0.001
	63/100	0	8	<0.001		85/100	0	2	0.020
	85/85	0	6	0.030		110/110	5	1	<0.001
	63/85	12	6	NS		85/110	0	<1	NS
	63/63	4	2	NS		85/85	1	<1	0.007
<i>AKP*</i> (NS)	100/100	67	66	NS	<i>LAP*</i> (0.001)	100/100	13	16	NS
	100/113	10	11	NS		100/110	28	23	NS
	113/113	1	<1	NS		90/100	13	12	NS
				110/110		10	8	NS	
<i>EST-2*</i> (NS)	100/100	15	14	NS	90/110	0	9	0.000	
	100/106	7	11	NS	90/90	6	2	0.005	
	90/100	19	17	NS	<i>PEP-1*</i> (NS)	100/100	23	21	NS
	85/100	5	6	NS		78/100	16	20	NS
	106/106	3	2	NS		78/78	6	4	NS
	90/106	5	6	NS	<i>PEP-2*</i> (0.002)	100/100	11	17	<0.001
	85/106	5	2	0.050		82/100	20	13	<0.001
	90/90	5	5	NS		100/117	12	8	0.006
	85/90	3	4	NS		82/82	0	2	NS
85/85	0	1	NS	82/117		0	3	0.030	
<i>EST-3*</i> (0.002)	100/100	11	17	0.006	117/117	0	1	NS	
	90/100	29	24	NS	<i>PGM-1*</i> (0.000)	100/100	37	31	0.002
	100/110	17	10	0.003		95/100	19	28	0.010
	90/90	10	9	NS		100/110	3	7	0.020
	90/110	0	8	<0.001		95/95	12	6	0.001
	110/110	2	2	NS		95/110	0	3	0.020
<i>EST-4*</i> (0.002)	100/100	48	47	NS	110/110	4	<1	0.000	
	100/126	21	20	NS	<i>PGM-2*</i> (0.001)	100/100	43	40	0.004
	70/100	0	3	NS		85/100	9	16	0.004
	126/126	1	2	NS		85/85	5	2	0.004
	70/126	2	1	NS					
	70/70	1	<1	0.020					
<i>IDH-1*</i> (0.000)	100/100	46	36	0.000					
	100/105	9	15	0.020					
	95/100	4	18	0.000					
	105/105	6	1	<0.001					
	95/105	0	4	0.010					
	95/95	11	2	0.000					

**Table 5.** Observed and expected phenotype distributions at the polymorphic loci for diploid *Crassostrea corteziensis* cultured in northwestern Mexico. The probability of fit to the Hardy-Weinberg distribution per locus is shown in parentheses.  $P_0$ , probability of fit per phenotype. NS, not significant.

**Tabla 5.** Distribuciones fenotípicas observadas y esperadas en los loci polimórficos de *Crassostrea corteziensis* diploide cultivado en el noroeste de México. Entre paréntesis se muestra la probabilidad de ajuste a la distribución de Hardy-Weinberg por locus.  $P_0$  es la probabilidad de ajuste por fenotipo. NS, no significativo.

Locus	Phenotype	Observed	Expected	$P_0$	Locus	Phenotype	Observed	Expected	$P_0$
AAT-1* (0.000)	100/100	46	29	0.000	PEP-2* (0.000)	100/100	35	25	0.000
	100/105	1	18	0.000		100/105	1	12	0.000
	97/100	0	16	0.000		87/100	0	10	0.000
	105/105	14	3	0.000		105/105	6	1	<0.001
	97/105	0	5	0.002		87/105	4	2	NS
	97/97	13	2	0.000		87/87	5	1	<0.001
AAT-2* (0.000)	100/100	37	19	0.000	PGM-1* (0.000)	100/100	21	11	0.000
	67/100	1	27	0.000		95/100	8	17	0.002
	100/126	1	12	0.000		100/108	5	13	0.001
	67/67	26	9	0.000		100/112	0	1	NS
	67/126	1	8	<0.001		87/100	0	2	NS
	126/126	11	2	0.000		95/95	13	6	<0.001
EST-2* (0.000)	100/100	21	9	0.000		95/108	6	10	NS
	100/108	1	19	0.000		95/112	2	1	NS
	88/100	2	5	0.070		87/95	0	2	NS
	100/122	0	3	0.010		108/108	11	4	0.000
	108/108	21	9	0.000	108/112	0	1	NS	
	88/108	0	5	0.001	87/108	0	1	NS	
	108/122	2	3	NS	112/112	0	<1	NS	
	88/88	5	1	0.000	87/112	1	<1	NS	
	88/122	0	1	NS	87/87	2	<1	<0.001	
	122/122	3	<1	<0.001	PGM-2* (0.000)	100/100	65	63	0.040
LAP* (0.000)	100/100	61	58	<0.001		81/100	3	5	NS
	100/108	6	10	0.009		100/114	4	6	NS
	95/100	0	3	0.002		81/81	1	<1	NS
	108/108	2	<1	NS		81/114	0	<1	NS
	95/108	1	<1	NS	114/114	1	<1	NS	
	95/95	1	<1	0.020	PEP-1* (0.000)	100/100	34	23	0.000
PEP-1* (0.000)	97/100	2	13	0.000		97/100	2	13	0.000
	100/107	1	12	0.000		100/107	1	12	0.000
	97/97	8	2	0.000		97/97	8	2	0.000
	97/107	2	3	NS		97/107	2	3	NS
	107/107	8	2	0.000		107/107	8	2	0.000

(Smith *et al.* 1986, English *et al.* 2000, Appleyard and Ward 2006), but it is lower than the values (0.48 and 0.57) reported for triploid oysters from the USA (Wang *et al.* 2002). This suggests that the triploid oysters cultured in Sonora come from strains with a poor genetic background despite their interloid origin.

The genetic disequilibrium of *C. gigas* was caused by heterozygote deficiency in six loci and an excess in three loci. Because of its triploid condition, eight triple heterozygotes were found, but we expected to find more organisms of

una progenie de calidad. En los laboratorios de producción, en donde los factores ambientales están controlados, la pérdida de variabilidad genética depende del número de progenitores (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero 1988, Appleyard y Ward 2006), lo cual es un aspecto importante que no debe de ser minimizado para evitar la erosión genética.

Para la acuicultura, la relevancia de los ostiones triploides radica en su mayor tasa de crecimiento, su esterilidad y su mejor sabor comparado con los diploides en madurez



this kind with different allele combinations. Though the severe reduction of fecundity of triploids ensures that generational inbreeding does not accumulate, the heterozygote deficiency and the inbreeding values are possibly caused by the inbreeding associated with the diploid and tetraploid parents, but the verification of that hypothesis is beyond the scope of this study. To attribute the mortality events to a loss of genetic variability, a severe reduction in heterozygosity would have had to be found. Even though the heterozygosity for *C. gigas* is lower than that reported by Wang *et al.* (2002), our results do not indicate a drastic loss in variability because the values are higher than for diploid organisms.

The results for *C. corteziensis* are not surprising if we consider that the wild populations have been reduced because of overfishing and man-made modifications to estuaries (Chávez-Villalba *et al.* 2005). Unfortunately, the observed heterozygosity values reported here cannot be compared with the pioneering papers published in the 1980s because they only mentioned polymorphism (Hedgecock and Okazaki 1984, Rodríguez-Romero *et al.* 1988). Recently, Pérez-Enriquez *et al.* (2008) conducted an allozyme survey in several locations along the Mexican Pacific and analyzed five enzymatic systems, finding six loci of which four were polymorphic. Considering the differences in the number of gene products analyzed here and by Pérez-Enriquez *et al.* (2008), the mean observed heterozygosity is lower, the mean expected heterozygosity and polymorphism are higher, and

(Boudry *et al.* 1998, Hand *et al.* 2004). Además, el complemento de tres cromosomas implica una mayor heterocigosis (Ward *et al.* 2000) y es de esperarse más clases genotípicas, por lo que los triploides interploides tienen una variabilidad genética 19% mayor que la de los triploides químicos (Wang *et al.* 2002). En el presente estudio, la heterocigosis observada para los triploides de *C. gigas* fue de 0.309, similar a lo reportado para poblaciones ferales australianas, poblaciones silvestres japonesas y linajes de laboratorio de cuatro generaciones de edad (Smith *et al.* 1986, English *et al.* 2000, Appleyard y Ward 2006). Sin embargo, el valor es menor que los reportados (0.48 y 0.57) para triploides de los EUA (Wang *et al.* 2002). Esto sugiere que los ostiones triploides cultivados en Sonora provienen de linajes con un pobre antecedente genético a pesar de su origen interploide.

El desequilibrio genético de *C. gigas* fue causado por una deficiencia de heterocigosis en seis loci y por un exceso en tres loci. Debido a su condición triploide se encontraron ocho heterocigotos triples pero se esperaban encontrar más organismos de este tipo con diferentes combinaciones alélicas. Aunque la severa reducción en la fecundidad de los triploides asegura que la endogamia generacional no se acumula, la deficiencia de heterocigotos y los valores de *Fis* se pueden deber a la endogamia asociada a los progenitores diploides y tetraploides, pero la comprobación de tal hipótesis está fuera de nuestro alcance. Para atribuir los eventos de mortalidad a

**Table 6.** Heterozygote deficiency or excess (*D*), inbreeding coefficient (*Fis*), and  $\chi^2$  value for null hypothesis *Fis* = 0 in the polymorphic loci of triploid *Crassostrea gigas* and diploid *C. corteziensis*.

**Tabla 6.** Deficiencia o exceso de heterocigosis (*D*), coeficiente de endogamia (*Fis*) y valor de  $\chi^2$  para la hipótesis nula *Fis* = 0 en los loci polimórficos de *Crassostrea gigas* triploide y *Crassostrea corteziensis* diploide.

Locus	<i>Crassostrea corteziensis</i>			<i>Crassostrea gigas</i>		
	<i>D</i>	<i>Fis</i>	$\chi^2$	<i>D</i>	<i>Fis</i>	$\chi^2$
AAT-1*	-0.98	0.97 <sup>+++</sup>	140.69			
AAT-2*	-0.94	0.93 <sup>+++</sup>	134.92	0.30	-0.07	0.60
LAP*	-0.46	0.45 <sup>+++</sup>	29.40	-0.06	0.06	0.47
PEP-1*	-0.83	0.82 <sup>+++</sup>	74.87	-0.18	0.17	1.32
PEP-2*	-0.79	0.79 <sup>+++</sup>	63.82	0.38	-0.40	13.62
PGM-1*	-0.54	0.53 <sup>+++</sup>	79.89	-0.42	0.42 <sup>+++</sup>	26.08
PGM-2*	-0.33	0.33 <sup>++</sup>	15.73	-0.44	0.43 <sup>++</sup>	10.64
EST-2*	-0.86	0.86 <sup>+++</sup>	122.03	-0.04	0.03	0.19
EST-3*				0.09	-0.10	1.30
EST-4*				-0.05	0.04	0.22
IDH-1*				-0.64	0.64 <sup>+++</sup>	62.06
IDH-2*				-0.58	0.58 <sup>+++</sup>	46.26
AKP*				-0.10	0.10	0.73
Total		0.78 <sup>+++</sup>	661.34		0.13 <sup>+++</sup>	163.50

Significance for null hypothesis *Fis* = 0: ++ = 0.001 < *P* ≤ 0.01; +++ = *P* ≤ 0.001.

the number of alleles per locus is similar to that reported by Pérez-Enríquez *et al.* (2008).

Unlike this study, Pérez-Enríquez *et al.* (2008) did not find genetic disequilibrium in *C. corteziensis*; however, Cruz *et al.* (2007) reported that a sample from Sinaloa presented genetic disequilibrium in 30% of microsatellite polymorphic loci. These differences can be attributed to the resolution of the microsatellite analysis and in our case, to the fact that the parents of the analyzed organisms may have come from a population with high *Fis*. Considering that Pérez-Enríquez *et al.* (2008) did not find a genetic structure in *C. gigas* from the Mexican Pacific but only differences in *Fis*, then the best locations to select good broodstock would be those with low *Fis*, as in Nayarit.

Genetic disequilibrium has been reported for cultured bivalve molluscs (De la Rosa-Vélez and Rodríguez-Romero 1989, De la Rosa-Vélez *et al.* 1991, Correa *et al.* 2004), and has been attributed to (1) a strong selection against heterozygotes, (2) inbreeding, and (3) a Wahlund effect; however, inbreeding seems to be the only valid explanation (Murphy *et al.* 1990). In our case, it is possible that the diploid and tetraploid broodstock strains that originated the triploid *C. gigas* organisms underwent cumulative inbreeding that was reflected in the *Fis* value. Likewise, inbreeding and a low number of breeders are responsible for the poor genetic variability of *C. corteziensis*.

The consolidation of an oyster culture program in northwestern Mexico, including spat production, must be based on the production of interploidy triploids or meiosis I triploids from diploids with good genetic variability of both *C. gigas* and *C. corteziensis*, and hence, avoid dependence on spat dealers from abroad who offer *C. gigas* with unknown genetic variability. Considering that the spat commercialized by CREMES (imported or produced by them) is seeded in several locations of northwestern Mexico, their commitment to their client base, consisting of more than 50 oyster farmers, is clear in this respect.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Funding was provided by SAGARPA (Mexico) and the Aquaculture Institute of the State of Sonora. The first author acknowledges receipt of a scholarship from the Mexican Council for Science and Technology (CONACYT). We thank L Juárez-Romero and F Hoyos-Chairez (CREMES) for their help in obtaining the samples, and E Glazier for editing the English-language text.

## REFERENCES

- Abreu-Grobois A. 1983. Population genetics of *Artemia*. Ph.D. thesis, University College of Swansea, UK.
- Aebersold PB, Winans GA, Teel DJ, Miner GB, Utter FM. 1987. Manual for starch gel electrophoresis: A method for the detection of genetic variation. NOAA Technical Report. NMFS 61, 19 pp.

una pérdida de variabilidad genética tendría que haberse encontrado una severa reducción en la heterocigosis. Aun cuando la heterocigosis para *C. gigas* es más baja que la reportada por Wang *et al.* (2002), nuestros resultados no se pueden considerar como una drástica pérdida de variabilidad ya que los valores son mayores que los correspondientes a los organismos diploides.

Los resultados para *C. corteziensis* no son sorprendentes si consideramos que las poblaciones silvestres se han reducido por la sobrepesca y por las modificaciones antropogénicas de los estuarios (Chávez-Villalba *et al.* 2005). Desafortunadamente, la heterocigosis observada que se reporta en este trabajo no se puede comparar con los primeros trabajos publicados en la década de los ochenta debido a que sólo mencionan el polimorfismo (Hedgcock y Okazaki 1984, Rodríguez-Romero *et al.* 1988). Recientemente, Pérez-Enríquez *et al.* (2008) realizaron un estudio con alozimas en varias localidades del Pacífico mexicano y analizaron satisfactoriamente cinco sistemas enzimáticos, encontrando seis loci totales con cuatro de ellos polimórficos. A reserva de que hay diferencias en cuanto al número de productos genéticos analizados en el presente estudio y en el de Pérez-Enríquez *et al.* (2008), se puede decir que el valor promedio de la heterocigosis observada es menor, la heterocigosis esperada y el polimorfismo son mayores, y que el número de alelos por locus es similar a lo reportado por Pérez-Enríquez *et al.* (2008).

A diferencia del presente estudio, Pérez-Enríquez *et al.* (2008) no encontraron desequilibrio genético en *C. corteziensis*; sin embargo, Cruz *et al.* (2007) reportaron que una población de *C. corteziensis* de Sinaloa presentó un desequilibrio genético en 30% de los loci polimórficos microsatelitales. Las diferencias se pueden deber al grado de resolución de los microsatélites y que en nuestro caso los progenitores de los organismos analizados podrían provenir de una población con un elevado *Fis*. Si Pérez-Enríquez *et al.* (2008) determinaron que no hay una estructura genética de *C. corteziensis* en el Pacífico mexicano pero sí valores diferenciales en *Fis*, entonces las localidades óptimas para escoger buenos reproductores serán aquellas que presenten bajos valores de *Fis*, como lo sería Nayarit.

El desequilibrio genético se ha reportado en bivalvos cultivados (De la Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero 1989, De la Rosa-Vélez *et al.* 1991, Correa *et al.* 2004) y ha sido atribuido a (1) una fuerte selección en contra de los heterocigotos, (2) la endogamia y (3) un efecto Wahlund, pero la endogamia parece ser la única explicación válida (Murphy *et al.* 1990). En el presente estudio es posible que los linajes parentales diploides y tetraploides que originaron a los triploides de *C. gigas* tengan una endogamia acumulada que se vio reflejada en el valor de *Fis*. De la misma forma, la endogamia y un bajo número de reproductores pueden ser responsables de la pobre variabilidad genética de *C. corteziensis*.

- Álvarez-Jurado A. 1987. Genética y acuicultura. In: Espinosa de los Monteros J, Labarta U (eds.), Genética en Acuicultura. Industrias Gráficas España, Madrid, pp. 1–31.
- Appleyard SA, Ward RD. 2006. Genetic diversity and effective population size in mass selection lines of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture* 254: 148–159.
- Ayala FJ, Hedgecock D, Zummalt GS, Valentine JW. 1973. Genetic variation in *Tridacna maxima*, an ecological analog of some unsuccessful evolutionary lineages. *Evolution* 37: 177–191.
- Baqueiro E. 1991. Culture of *Crassostrea corteziensis* in Mexico. In: Mendel W (ed.), Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture. CRC Press, Florida, pp. 113–116.
- Benzie JAH, Williams ST. 1996. Limitations in the genetic variation of hatchery produced batches of the giant clam, *Tridacna gigas*. *Aquaculture* 139: 225–241.
- Boudry P, Barré M, Gérard A. 1998. Genetic improvement and selection in shellfish: A review based on oyster research and production. *Cah. Options Méditerran.* 34: 61–75.
- Buroker N, Hershberg HW, Chew K. 1975. Genetic variation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 32: 2471–2477.
- Buroker N, Hershberg HW, Chew K. 1979. Population genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Mar. Biol.* 54: 157–179.
- Chávez-Villalba J, López-Tapia M, Mazón-Suástegui J, Robles-Mungaray M. 2005. Growth of the oyster *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) in Sonora, Mexico. *Aquacult. Res.* 36: 1337–1344.
- CONAPESCA. 2005. Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca. SAGARPA. Mazatlán, Sinaloa, México. 220 p.
- Correa F, Collins E, Ocegüera A, Cordero B, Domínguez D. 2004. Allozymic variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from San Quintín Bay, Baja California, Mexico. *Cienc. Mar.* 30: 89–97.
- Cruz P, Yáñez-Jacome B, Ibarra AM, 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. *Mol. Ecol. Notes* 7: 448–450.
- De la Rosa-Vélez J, Rodríguez-Romero F. 1988. Applicability of genetic variability measurements to the fishery of the American oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin) in the Gulf of Mexico. *Cienc. Mar.* 14(4): 43–56.
- De la Rosa-Vélez J, Rodríguez-Romero F. 1989. Enfoque genético para el análisis de las poblaciones de recursos pesqueros: El caso de la población ostrícola de la Laguna de Términos, Campeche. In: De la Rosa-Vélez J, González-Farías F (eds.), Temas de Oceanografía Biológica en México. Universidad Autónoma de Baja California, México, pp. 255–284.
- De la Rosa-Vélez J, Gutiérrez-Wing MT, Radilla-Camacho R. 1991. Oyster culture in San Quintín Bay, BC, Mexico: Genetic aspects. *Cienc. Mar.* 17(3): 133–145.
- English LJ, Maguire GB, Ward RD. 2000. Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Australia. *Aquaculture* 187: 283–298.
- Grant WS, Teel DJ, Kobayashi T. 1984. Biochemical population genetics of the Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) and comparison with Atlantic halibut (*H. hippoglossus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 41: 1083–1088.
- Grijalva-Chon JM, De la Rosa-Vélez J, Sosa-Nishizaki O. 1996. Allozyme variability in two samples of swordfish, *Xiphias gladius*, in the North Pacific Ocean. *Fish. Bull.* 94: 589–594.
- Hand RE, Nell JA, Thompson PA. 2004. Studies on triploid oysters in Australia. XIII. Performance of diploid and triploid Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata* (Gould 1850), progeny from a third generation breeding line. *Aquaculture* 233: 93–107.
- Hedgecock D, Okasaki NB. 1984. Genetic diversity within and between populations of American oysters (*Crassostrea*). *Malacologia* 25: 535–544.
- Kalinowski ST. 2006. HW-QUICKCHECK: An easy-to-use computer program for checking genotypes for agreement with Hardy-Weinberg expectations. *Mol. Ecol. Notes* 6: 974–979.
- Li CC, Horvitz DG. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *Am. J. Hum. Genet.* 5: 107–117.
- May B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. In: Hoelzel AR (ed.), Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach. IRL Press, Oxford, pp. 1–27.
- Murphy RW, Sites JW, Buth DG, Hauffler CH. 1990. Proteins. In: Isosyme electrophoresis. In: Hillis DM, Moritz C (eds.), Molecular Systematics. Sinauer Associates Inc., Massachusetts, pp. 45–126.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590.
- Pérez-Enríquez R, Ávila S, Ibarra AM. 2008. Population genetics of the oyster *Crassostrea corteziensis* in the Gulf of California. *Cienc. Mar.* 34: 479–490.
- Ridway VM, Sherbune SW, Lewis RD. 1970. Polymorphisms in the esterases of Atlantic herring. *Trans. Am. Fish. Soc.* 99: 147–151.
- Rodríguez-Romero F, García-Saez C, Laguarda-Figueras A. 1988. Electrophoretic pattern variation in two oyster populations of *Crassostrea corteziensis* from the Mexican coast. *An. Centro Cienc. Mar. Limnol. Univ. Nac. Autón. Méx.* 15: 177–184.
- Schaal BA, Anderson WW. 1974. An outline of techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from the American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Technical Report Series, Georgia Marine Sciences Center, 74 pp.
- Shaklee JB, Allendorf FW, Morizot BC, Whitt GS. 1990. Gene nomenclature for protein-coding loci in fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 119: 2–15.

## AGRADECIMIENTOS

El financiamiento fue proporcionado por SAGARPA y el Instituto de Acuicultura del Estado de Sonora. El primer autor reconoce la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Se agradece a L Juárez-Romero y F Hoyos-Chairez (CREMES) la ayuda prestada para la obtención de las muestras y a E Glazier la edición del texto en inglés.

- Shaw CR, Koen AL. 1968. Starch gel zone electrophoresis of enzymes. In: Smith I (ed.), *Chromatography and Electrophoresis*. Interscience Publishers, New York, pp. 325–364.
- Shaw CR, Prasad R. 1970. Starch gel electrophoresis of enzymes. A compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 4: 297–320.
- Smith PJ, Ozaki H, Fujio Y. 1986. No evidence for reduced genetic variation in the accidentally introduced oyster *Crassostrea gigas* in New Zealand. *N.Z. J. Mar. Freshwat. Res.* 20: 562–574.
- Swofford D, Selander R. 1981. BIOSYS-1: A Fortran program for the comprehensive analysis of electrophoresis data in population genetic and systematics. *J. Hered.* 72: 281–283.
- Tracey ML, Nelson K, Hedgecock D, Shleser RA, Pressick ML. 1975. Biochemical genetics of lobster: Genetic variation and the structure of American lobster (*Homarus americanus*) populations. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 32: 2091–2101.
- Utter F, Abersold P, Winans G. 1988. Interpreting genetic variation detected by electrophoresis. In: Ryman N, Utter F (eds.), *Population Genetics and Fishery Management*. University of Washington Press, Seattle, pp. 21–45.
- Wang Z, Guo X, Allen SK, Wang R. 2002. Heterozygosity and body size in triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* Thunberg, produced from meiosis II inhibition and tetraploids. *Aquaculture* 204: 337–348.
- Ward RD, English LJ, McGoldrick DJ, Maguire GB, Nell JA, Thompson PA. 2000. Genetic improvement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Australia. *Aquacult. Res.* 31: 35–44.
- Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* 19: 395–420.

*Received May 2009;  
accepted August 2010.*