

Facultade de Ciencias

Departamento de Bioloxía Molecular e Celular

Área de Xenética

Análisis genética del molusco bivalvo *Donax trunculus* mediante marcadores moleculares

Análise xenética do molusco bivalvo *Donax trunculus* mediante marcadores moleculares

Genetic analysis of the bivalve mollusc *Donax trunculus* using molecular markers

Silvia Piñeiro Rodríguez

Trabaja Fin de Grado

Fecha de defensa: 21 de septiembre de 2015

Dirigido por:

Dra. Josefina Méndez Felpeto

Ana Nantón Varela

RESUMEN

El presente trabajo aborda el estudio de la diversidad genética y la estructura poblacional de individuos de coquina *D. trunculus* de tres localidades, dos gallegas y una portuguesa. Para ello se ha utilizado un marcador mitocondrial del gen 16S. Debido a que en la coquina se presenta el fenómeno de Doble Herencia Uniparental (DUI) ha sido necesario el análisis de cada tipo de ADN mitocondrial (F y M).

Los resultados muestran los haplotipos presentes en las tres localidades y revelan la ausencia de diferencias significativas entre los individuos de las tres localidades analizadas; mostrando, además, que se encuentran en un proceso de expansión típico tras haber sufrido una reducción drástica del tamaño poblacional, como ocurre en la coquina sometida actualmente a un gran declive en su explotación.

RESUMO

O presente traballo aborda o estudo da diversidade xenética e da estrutura poboacional de individuos de coquina *D. trunculus* de tres localidades, dúas galegas e unha portuguesa. Para isto utilizouse un marcador mitocndrial do xen 16S. Debido a que na coquina presentase o fenómeno de Doble Herdanza Uniparental (DUI) foi necesaria a análise de cada tipo de ADN mitocondrial (F e M).

Os resultados mostran os haplotipos presentes nas tres localidades e revelan a ausencia de diferenzas significativas entre os individuos das tres localidades analizadas; mostrando, ademais, que se encontran nun proceso de expansión típico tras sufrir unha redución drástica do tamaño poboacional, como ocorre na coquina sometida actualmente a unha grande declive na súa explotación.

ABSTRACT

This paper aims to address the study of the genetic diversity and the population structure of *D. Trunculus* coquina wedge clam individuals from three locations, two in Galicia and one in Portugal. To do so, a mitochondrial marker for the 16S gen was employed. Since wedge clams are affected by the Double Uniparental Inheritance (DUI) phenomenon, the analysis of both mitochondrial DNA types was required (F and M).

The results showcase the haplotypes present in the three locations and reveal the absence of significant differences among the individuals from the three analysed locations. Furthermore, the results show that they are immersed in an expansion process that usually occurs after a drastic population size reduction, as currently happens to the wedge clam due to the decline of its exploitation.

ÍNDICE

Introducción	1
Objetivos	6
Material y métodos	7
Material de estudio	7
Extracción de ADN genómico	7
Amplificación por PCR y secuenciación	8
Análisis de diversidad genética y diferenciación poblacional	8
Resultados	10
Análisis de secuencias	10
Relaciones entre haplotipos	12
Análisis de diversidad genética	13
Análisis de diferenciación poblacional	14
Discusión	16
Conclusiones / Conclusións / Conclusions	18
Referencias bibliográficas	20

INTRODUCCIÓN

Donax trunculus (Linné, 1758) es un molusco bivalvo conocido vulgarmente como coquina. Pertenece a la familia Donacidae y está, por lo tanto, incluida dentro de la superfamilia Tellinacea. Morfológicamente, se caracteriza por poseer una concha sólida, con las valvas casi simétricas, de forma triangular y superficie exterior lisa. La coloración de la concha es variable y presenta bandas concéntricas y radiales más oscuras, el interior de la concha presenta también coloración variable (Figura 1).

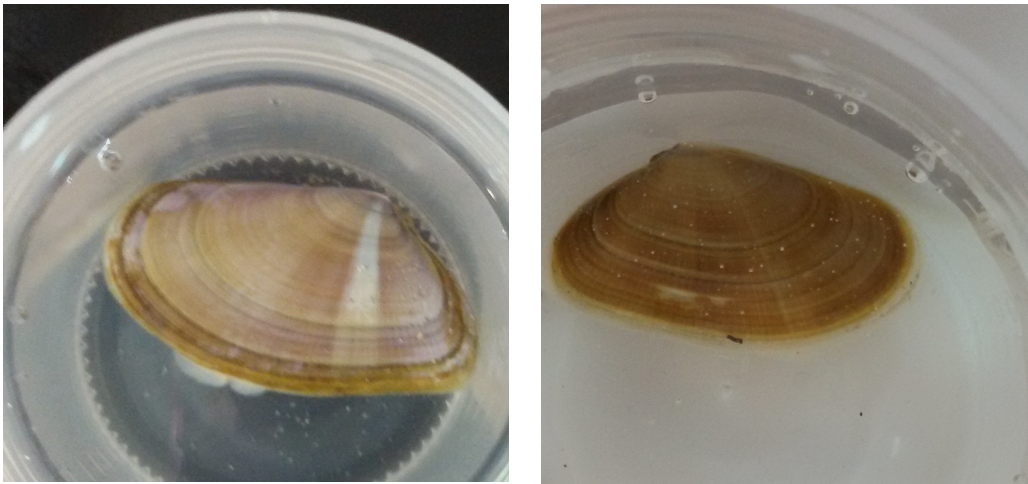


Figura 1. Ejemplares utilizados en este trabajo de *Donax trunculus*.

Esta especie presenta una amplia distribución Atlántico-Mediterránea. En las costas atlánticas se puede encontrar desde Senegal hasta Francia (Tebble, 1966), y en el mar Mediterráneo aparece por toda su costa, incluyendo también el Mar Negro (Bayed & Guillou, 1985). En la zona atlántica *D. trunculus* se pueden encontrar formando bancos en fondos arenosos y fangosos de playas expuestas al oleaje. Son excelentes excavadores, lo que hace que estén muy bien adaptados para la vida en las zonas de batida (Gaspar *et al.*, 1999). Por el contrario, en el mar Mediterráneo, donde no hay grandes mareas, su distribución se limita a playas poco expuestas y con arena fina (Mazé & Laborda, 1988).

La coquina representa un recurso marino muy importante para el sector marisquero de Galicia, sin embargo, hoy en día los bancos naturales están en regresión, bien por fenómenos de sobreexplotación o debido a mortalidades importantes cuyas causas son desconocidas. En la Figura 2 se muestra la producción de coquina en los últimos 10 años. Tras un repunte en la producción de coquina en los años 2007 y 2008, se produjo un descenso muy acusado, llegando a niveles de producción de 7737,6 kg en el año 2014, 8266,36 kg menos respecto al año 2008. El notable descenso que han sufrido los bancos naturales de esta especie ha hecho que en la actualidad estén restringidos a zonas muy concretas de la costa norte gallega, como es la zona de Cedeira-Vilarrube.

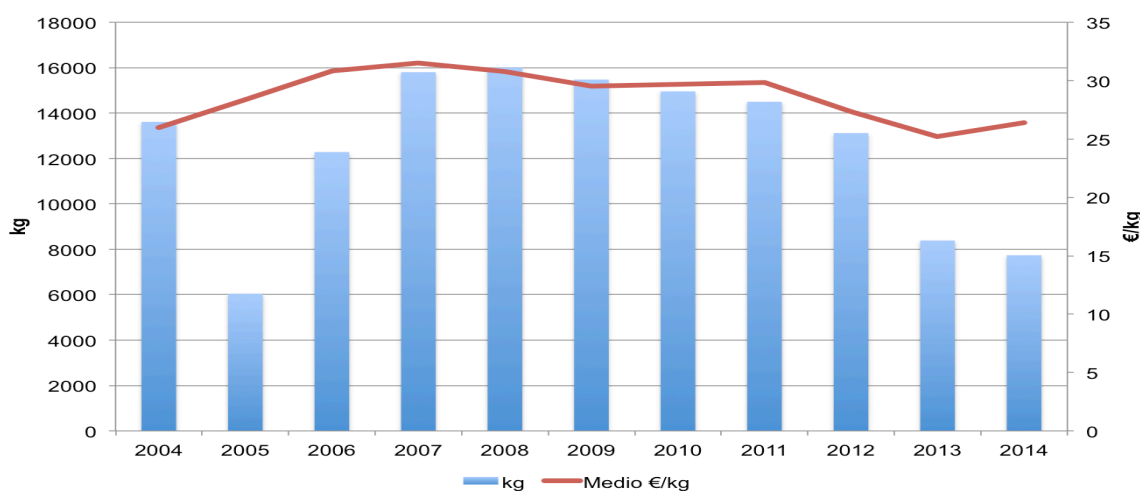


Figura 2. Evolución de la producción comercial en kg de coquina y de su precio (€/kg) en los últimos diez años. Datos obtenidos del Servicio de Estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia.

Debido a su alto valor comercial (26,4 €/kg en 2014), hace que la recuperación y conservación de los bancos naturales de esta especie sea de gran interés para el sector marisquero ya que le puede reportar importantes beneficios económicos.

Tabla 1. Nivel de capturas (kg) y valor económico (€) de moluscos bivalvos descargados en las lonjas gallegas durante el año 2014. Los datos pertenecientes al Servicio de Estadística de la Consellería do Mar, Xunta de Galicia.

Especie	kg	Importe €	Medio €/Kg
Ameixa babosa	1.009.731,99	13.429.468,57	13,3
Ameixa bicuda	5.498,07	21.448,12	3,9
Ameixa fina	657.371,02	13.528.144,79	20,58
Ameixa rubia	434.098,39	3.273.003,73	7,54
Ameixa xaponesa	1.608.330,01	10.335.775,61	6,43
Ameixón	312.78,25	31.270,1	1
Berberecho	1.268.232,62	7.872.367,73	6,21
Birollo	10.186,4	25.174,89	2,47
Coquina	7.737,6	204.234,13	26,4
Carneiro	71.072,95	282.507,14	3,97
Cornicha	1.264,8	4.637,59	3,67
Longueirón	22.120,62	140.842,62	6,37
Longueirón vello	33.308,28	115.268,52	3,46
Navalla	433.247	2.992.474,89	6,91
Ostra plana	64.118,14	290.382,61	4,53
Ostra rizada	23.609,11	23.881,99	1,01
Rabioso	1.869	1.467,7	0,79
Reló	14	25,4	1,81
Vieira	113.270,37	365.411,49	3,23
Volandeira	141.905,55	341.830,23	2,41
Zamburiña	4.575,45	26.548,99	5,8
TOTAL	5.942.839,62	53.306.166,84	

Para la gestión adecuada y conservación de estos bancos naturales es necesario conocer las características génicas de los individuos que componen las diferentes poblaciones. Sin embargo, los escasos estudios genéticos realizados en esta especie se centran en la descripción del cariotipo (Cornet & Soulard, 1990; González-Tizón *et al.*, 1998) y algunos trabajos del genoma de esta especie como son el estudio de elementos móviles y secuencias de ADN satélite (Plohl & Cornudella, 1996, 1997; Plohl *et al.*, 2002; Petrovic & Plohl, 2005; Petrovic *et al.*, 2009; Satovic & Plohl, 2013). Recientemente se han desarrollado estudios genético poblacionales como los del presente trabajo, que aportan estimas iniciales de la composición genética de las poblaciones de coquina en los bancos naturales de Galicia.

Los marcadores moleculares son las herramientas más útiles para desvelar y cuantificar la variación genética. Existe gran variedad de marcadores moleculares, entre los cuales destaca el ADN mitocondrial (ADNmt), por ser el marcador de diversidad molecular más usado durante décadas para el estudio de los organismos marinos. En general, la molécula de ADNmt codifica para 37 genes dos de los cuales lo hacen para ARNs ribosómicos (ARNr 12S y 16S), 22 para ARNs transferentes (ARNt) y 13 para proteínas, que en su mayoría son subunidades de diferentes complejos multienzimáticos implicados en la cadena de transporte electrónico y en fosforilación oxidativa, como son la NADH deshidrogenasa (subunidades 1-6 y la 4L), la citocromo c oxidasa (subunidades I-III), la ATP sintetasa (ATPasa subunidades 6 y 8) y el citocromo b (Wolstenholme *et al.*, 1987; Hoffman *et al.*, 1992).

El genoma mitocondrial presenta numerosas características que lo convierten en un marcador molecular altamente conveniente para el estudio de la composición genética de las poblaciones. La existencia de múltiples copias del mismo en la célula y de regiones variables flanqueadas por regiones altamente conservadas, facilitan enormemente la amplificación de este ADN por PCR, ya que se pueden diseñar cebadores para las regiones altamente conservadas. Además, la elevada conservación de los genes mitocondriales en animales, con muy pocas duplicaciones, sin intrones y con regiones intragénicas muy cortas posibilitan el diseño de cebadores incluso para organismos no modelo, donde el conocimiento de la secuencia de ADNmt es nula o insuficiente para el diseño de cebadores (Gissi *et al.*, 2008). Por ello, los marcadores mitocondriales representan una herramienta molecular sencilla y relativamente barata que permite obtener una primera aproximación de la estructura génica de las especies objeto de estudio (Galtier *et al.*, 2009). Por otro lado, este genoma es haploide y de herencia mayoritariamente uniparental, por lo que su tamaño es 4 veces menor al ADN nuclear. Esto conlleva a la mayor sensibilidad de ADNmt a la deriva génica y una mayor resolución del mismo a la hora de detectar cambios poblacionales respecto a los marcadores nucleares (Ferguson *et al.*, 1995; Ballard & Whitlock, 2004; Zink & Barrowclough, 2008).

En el presente trabajo se ha considerado como marcador mitocondrial el gen 16S, ya que ha sido ampliamente utilizado en los estudios de genética poblacional tanto en especies de bivalvos (Ladoukakis *et al.*, 2002; Kong & Li, 2009; Yuan, Kong & Li, 2013) como en estudios con otros grupos de animales marinos (Boissin *et al.*, 2008; Sotelo *et al.*, 2009; Ahrens *et al.*, 2013; Schuchert, 2014).

Una de las características más destacables de este genoma es su modo de herencia. Normalmente en animales, el ADNmt tiene una herencia generalmente materna (SMI), y por lo tanto clonal (Birky, 2001), lo que significa que todo el genoma se comporta como uno solo y todas las regiones comparten una genealogía común. El ADN paterno se elimina antes (como en los cangrejos de río, Moses, 1961), durante (como en *Ascidia*, Ursprung & Schabtach, 1965) o después (como en el ratón, Sutovsky, 1999) de la fertilización (véase Xu *et al.*, 2005; White *et al.*, 2008). Sin embargo, esta regla no se cumple en todas especies, se ha observado una forma atípica de la transmisión de genoma mitocondrial en moluscos bivalvos marinos y de agua dulce (Skibinski *et al.*, 1994a, b; Zouros *et al.*, 1994a, b; Hoeh *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996). Estas especies se caracterizan por presentar dos tipos de ADNmt, uno transmitido vía materna y otro vía paterna. Este sistema de transmisión de ADNmt se conoce como Doble Herencia Uniparental (DUI) (Zouros *et al.*, 1994). En este tipo de herencia, el ADN mitocondrial materno (genoma tipo F) se transmite a la descendencia través de los óvulos, tanto a descendientes machos como hembras, y el paterno (genoma tipo M) se transmite a través del esperma, solo a los descendientes machos. Las hembras adultas presentan solo el tipo F tanto en los tejidos somáticos como en las gónadas (homoplásmicas), mientras que en machos adultos el tipo F predomina en los tejidos somáticos y el tipo M en las gónadas (heteroplásmicos), es decir, los machos, reciben ambos tipos de ADNmt aunque solo transmiten el genotipo paterno (Zouros *et al.*, 1994, Ladoukakis *et al.*, 2002).

La doble herencia uniparental está presente en al menos varias superfamilias (4) y en 6 de las familias de bivalvos: Hyriidae, Margaritiferidae, Mytilidae (Fisher & Skibinski, 1990; Skibinski *et al.*, 1994 a, b; Zouros *et al.*, 1994 a, b), Solenidae, Unionidae (Liu *et al.*, 1996; Hoeh *et al.*, 2002) y Veneridae (Passamonti & Scali, 2001; Breton *et al.*, 2007). En *D. trunculus* se ha demostrado también la presencia de este tipo de herencia (Theologidis *et al.*, 2008).

Por lo tanto, es necesario tener en cuenta este modo de herencia, ya que puede interferir en el análisis de los datos poblacionales a la hora de interpretar los resultados obtenidos. En concreto, en el mejillón *Mytilus galloprovincialis* se ha demostrado que los dos tipos de ADNmt (F y M) aportan diferente información respecto al grado de variación y distancia genética entre poblaciones; el genoma F muestra mayor diversidad dentro de las poblaciones mientras que el genoma M revela mayor diferenciación entre las poblaciones (Ladoukakis *et al.*, 2002). Además, la divergencia de los dos tipos de ADNmt dentro de una especie es generalmente alta, algunas veces superior al 50%, lo que es comparable a las distancias de ADNmt entre las clases de vertebrados (Kumazawa *et al.*, 2004). El hecho de que las hembras reciban sólo ADNmt de sus progenitoras y, que los machos, transmitan a sus descendientes sólo el tipo de ADNmt que heredaron de su progenitor, explica el alto grado de divergencia entre los tipos de ADNmt masculinos y femeninos (Hoeh *et al.*, 1991; Fisher *et al.*, 1990; Zouros *et al.*, 1992). Una consecuencia a nivel experimental es que los cebadores universales puedan no reconocer ninguno de los genomas o puedan reconocer sólo uno (Theologidis *et al.*, 2008). Por ello lo adecuado es el uso de cebadores diferentes para el reconocimiento de cada uno de los ADNmt.

Como hemos indicado previamente, para abordar cualquier problema de conservación y recuperación de bancos naturales, es necesario llevar a cabo estudios genéticos con los que obtener una aproximación tanto de la estructura como de la variación genética que presentan (Joaquim *et al.*, 2010). Con estos estudios se pueden conocer las características de los individuos presentes y, así, tomar decisiones que contribuyan a la realización de una gestión sostenible del recurso. Los análisis de diversidad y diferenciación genética son utilizados en muchos casos, sobre todo cuando una población presenta un descenso continuado y se considera la posibilidad de realizar repoblaciones con individuos de otras localidades. En estos casos, si se encontrase diferenciación genética en las localidades analizadas, ésta debería considerarse tanto en los planes de extracción como de repoblación, ya que estas tareas pueden tener efectos deletéreos en la composición génica de las poblaciones naturales, como la pérdida de variabilidad o de adaptación a condiciones locales (Ward, 2006).

Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto de investigación “Estudo dos bancos naturais de coquina: problemática da súa desaparición en Galicia (PGIDIT-CIMA 13/08)” financiado por la Consellería do Medio Rural e do Mar de la Xunta de Galicia y realizado por el grupo de investigación XENOMAR (Xenética de Organismos Mariños) de la Universidade da Coruña.

OBJETIVOS

Dada la importancia comercial de *D. trunculus* y la escasez de estudios genéticos poblacionales en esta especie, el presente trabajo tiene como objetivo el análisis de la diversidad genética y la estructura poblacional de *D. trunculus* en tres localidades de la Península Ibérica mediante el uso del marcador mitocondrial 16S.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de estudio

Para la realización de este trabajo, se emplearon muestras de coquina *D. trunculus* procedentes de bancos naturales de tres localidades de la Península Ibérica: Vilarrube y Corme-Laxe de A Coruña, y Monte Gordo de Portugal (Figura 3). Una vez en el laboratorio, los individuos se diseccionaron y se conservaron en etanol al 96%.



Figura 3. Situación geográfica de las localidades estudiadas de *D. trunculus*. VIL: Vilarrube, CL: Corme- Laxe, MG: Montegordo.

Todos los individuos fueron sexados mediante observación al microscopio óptico de preparaciones de tejido gonadal.

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico total se realizó a partir de tejido muscular y/o gonadal siguiendo el método descrito por Walsh *et al* (1991) que emplea la resina Chelex 100™ (Sigma-Aldrich). Para ello, se extrajo una porción del tejido correspondiente de aproximadamente 1 mm³ y se introdujo en 100 µl de Chelex 100™ al 10% (g/ml) en agua milliQ estéril. Se incubaron durante 20 min a 100 °C y, tras esto, fueron centrifugados 1 min a 13000 rpm. La cuantificación del ADN extraído se realizó mediante el uso de un espectoforómetro NanoDrop ND-1000 (Technologies, Inc.).

Amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) y secuenciación

La amplificación del gen 16S tipo F se llevó a cabo empleando el cebador universal descrito por Kocher *et al.* (1989) (16SAR: -5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3'-) y el

cebador específico descrito por Theologidis *et al.* (2008) (DT16S-R395: -5' CYYTAATYCAACATCGAGGTC) a partir de ADN extraído de tejido muscular. El fragmento 16S tipo M se amplificó con una pareja de cebadores descrita por Fernández-Pérez *et al.* (en revisión), a partir de ADN extraído de tejido gonadal.

Las mezclas de reacción se realizaron en un volumen final de 25 µl, conteniendo 100 ng de ADN, 0,75 U de *Taq* ADN polimerasa, tampón de la polimerasa 1x, 0,25 mM de dNTPs, 0,6 µM de cada primer, agua milliQ estéril y 1,5 mM de MgCl₂ para el gen 16S tipo F y 2 mM para el tipo M.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler™ (Bio-Rad). El programa de amplificación utilizado en ambos casos consistió en una desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguida de 35 ciclos a 94 °C durante 1 min, 60°C durante 1 min y 20 s y 72°C durante 1 min, y una extensión final a 72 °C durante 5 min.

El análisis de los productos de PCR se efectuó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2% en tampón 1xTAE aplicando 5 µl de producto de PCR y 1 µl de tampón de carga, que incluía el colorante azul de bromofenol y xileno cianol, lo que permitió visualizar el progreso de la migración de la electroforesis. Como marcador de peso molecular se usó el *DNA Molecular Weight Marker XIII* (Roche Applied Science) para determinar la longitud de los fragmentos de ADN en comparación con el mismo. Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó por inmersión en bromuro de etidio (0,5 µg/ml en 1xTAE) durante 30 min y se visualizó en un transiluminador Gel Doc XR System (Bio-Rad).

La secuenciación de los productos de PCR elaboró en un secuenciador automático ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems) en los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidad de la Coruña empleando el cebador *forward* correspondiente en cada caso.

Análisis de diversidad genética y diferenciación poblacional

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999), para eliminar los extremos de las secuencias, donde la lectura no era fiable. Posteriormente, se sometieron las secuencias editadas a un análisis BLAST (*Basic Local Aligment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997) para verificar su identidad y se alinearon con Clustal W (Thompson *et al.*, 1994).

La heterogeneidad genética dentro de las localidades se estimó como diversidad haplotípica (*h*) y diversidad nucleotídica (π). Se entiende por diversidad haplotípica (*h*) la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una localidad sean distintos y se calcula a partir de la siguiente ecuación (Nei, 1987):

$$h = n(1 - \sum x_i^2)/(n - 1)$$

donde *n* es el número de secuencias examinadas y *x_i* es la frecuencia de la secuencia *i* en la localidad X.

La diversidad nucleotídica (π) indica la probabilidad de que dos nucleótidos con posiciones homólogas tomados al azar sean diferentes, es decir, el número medio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias. Para calcularla se emplea la siguiente ecuación (Nei, 1987):

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} x_i x_j \pi_{ij}$$

donde n es el número de secuencias examinadas, x_i y x_j son las frecuencias de las secuencias i y j , y π_{ij} es la proporción de nucleótidos diferentes entre los tipos i y j .

Estos dos índices, así como la reconstrucción de los haplotipos, se calcularon con el programa DnaSP versión 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2009). Además, se empleó el programa Arlequín versión 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) para el cálculo de las frecuencias haplotípicas.

Para analizar los cambios demográficos dentro de las poblaciones se utilizó el test F_S de Fu (Fu, 1997) implementado en el DnaSP versión 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2009). Este estadístico se calcula a partir de la probabilidad (S') de tener una muestra aleatoria con un número de alelos mayor o igual que el observado dado el nivel de diversidad estimado.

$$F_S = \ln \left(\frac{S'}{1 - S'} \right)$$

Un valor negativo de F_S evidencia un exceso de haplotipos, esperable en una situación de expansión poblacional reciente o selección purificadora. Un valor positivo evidencia un déficit de haplotipos, esperable en una situación de cuello de botella reciente, o sobredominancia. La significación del estadístico se obtuvo por simulación coalescente (1000 réplicas).

Por otro lado se utilizó el programa Network versión 4.6.1.3 (Fluxus Technology Ltd.) para establecer las relaciones filogenéticas entre los haplotipos, describiéndolos mediante un árbol de redes. Para ello se aplicó el algoritmo *Median-joining* (Bandelt *et al.*, 1999), que establece las redes de haplotipos a partir de todos los árboles filogenéticos posibles más parsimoniosos.

Las estimas de diferenciación poblacional se calcularon a través de un Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) (Excoffier & Lischer, 2010) empleando el programa Arlequín versión 3.5.1.2. Este programa también se utilizó para estimar los valores F_{ST} por pares de localidades en base a las frecuencias haplotípicas. La distribución de los F_{ST} 's se obtuvo por *bootstrapping* (1000 réplicas).

RESULTADOS

Análisis de secuencias

A partir de ADN genómico de coquina, y tras la amplificación por PCR del gen 16S tipo F, se secuenció un fragmento de 447 pb en un total de 93 individuos, 47 hembras y 46 machos. Después de eliminar la secuencia de los cebadores y las regiones de alineamiento dudoso, el fragmento resultó de 357 pb. Este alineamiento permitió identificar 21 haplotipos definidos por 20 sustituciones nucleotídicas o sitios variables (Tabla 2).

Tabla 2. Sitios variables localizados en los 21 haplotipos definidos para el gen 16S tipos F. Todos los haplotipos son comparados con el haplotipos 1. *n*: número de cada haplotipos en la muestra total.

Haplotipos			1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	
	2	3	0	1	8	9	9	9	2	2	3	4	5	6	6	8	2	2	2	2	<i>n</i>
	3	8	4	0	5	3	5	8	7	8	8	1	5	1	2	1	0	2	4	6	
1	G	A	G	T	G	C	G	C	A	C	T	G	C	C	T	A	T	C	C	G	3
2	.	.	T	.	.	.	A	G	1
3	A	G	58
4	A	T	.	.	G	3
5	A	T	G	1
6	T	.	.	C	8
7	A	G	G	2
8	.	T	A	G	1
9	A	G	.	.	.	T	.	1
10	A	.	.	T	G	1
11	.	.	.	C	.	.	A	G	1
12	A	G	.	T	.	.	.	1
13	T	G	.	C	1
14	A	.	A	G	2
15	A	T	.	.	C	3
16	A	T	G	1
17	A	A	G	1
18	T	A	G	1
19	T	.	.	C	A	1
20	C	.	.	.	1
21	T	1

En la Tabla 3 se muestran todos los haplotipos correspondientes a las tres localidades analizadas. El haplotipo 3 fue el más abundante (62,37%), estando presente en todas las localidades, y en un total de 58 individuos. La localidades con más haplotipos fueron Vilarrube y Corme-Laxe, con un total de 11 cada una, siendo la localidad de Monte Gordo la que presentó un menor número de haplotipos con 7. Las tres localidades presentaron 2 haplotipos compartidos entre ellas (haplotipos 3 y 6), Vilarrube y Corme-Laxe mostraron 2 haplotipos compartidos entre ambas (haplotipos 1 y 4) y Vilarrube y Monte Gordo, por su parte, otros 2 (haplotipos 14 y 15). Los haplotipos restantes fueron privados o característicos

de una determinada localidad, generalmente, presentes solo en 1 (haplotipos únicos) o 2 individuos (haplotipos únicos). Las localidades que presentaron mayor número de haplotipos privados fueron Vilarrube y Corme-Laxe, con 6 haplotipos cada una, y la que menos Monte Gordo, con 3.

Tabla 3. Frecuencia absoluta de los 21 haplotipos del gen 16S tipo F en las tres localidades analizadas.

Haplotipos	Vilarrube	Corme-Laxe	Monte Gordo	TOTAL	%
Hap_1	1	2		3	3,23
Hap_2		1		1	1,08
Hap_3	24	13	21	58	62,37
Hap_4	2	1		3	3,23
Hap_5		1		1	1,08
Hap_6	3	2	3	8	8,6
Hap_7		2		2	2,15
Hap_8		1		1	1,08
Hap_9		1		1	1,08
Hap_10		1		1	1,08
Hap_11		1		1	1,08
Hap_12	1			1	1,08
Hap_13	1			1	1,08
Hap_14	1		1	2	2,15
Hap_15	2		1	3	3,23
Hap_16	1			1	1,08
Hap_17	1			1	1,08
Hap_18	1			1	1,08
Hap_19			1	1	1,08
Hap_20			1	1	1,08
Hap_21			1	1	1,08
TOTAL	38	26	29	93	100

Para el gen 16S tipo M se amplificó y secuenció un fragmento de 413pb. En este caso, los fragmentos procedían de 42 individuos. Tras eliminar la secuencia de los cebadores y las regiones de alineamiento dudoso, el tamaño del fragmento se redujo a 352pb. Con este alineamiento se pudieron identificar 4 haplotipos definidos por 4 sitios variables (Tabla 4).

Tabla 4. Sitios variables localizados en los 4 haplotipos definidos para el gen 16S tipo M. Todos los haplotipos son comparados con el haplotipos 1. *n*: número de cada haplotipo en la muestra total. -: gaps.

H	1	2	3	4	<i>n</i>
A	1	2	3	4	
P	1	1	4	8	
1	A	A	C	T	32
2	-	-	.	.	8
3	.	.	.	C	1
4	.	.	T	.	1

Para este tipo de ADNmt el haplotipo más abundante fue el 1 (76,19 %), apareciendo en todas las localidades y en un total de 32 individuos. Solo este haplotipo y el 2 aparecen en las tres localidades. Los haplotipos 3 y 4 son haplotipos privados, estando únicamente presentes en Monte Gordo. (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencia absoluta de los 4 haplotipos del gen 16S tipo M en las tres localidades examinadas.

H	Vilarrube	Corme-Laxe	Monte Gordo	TOTAL	%
A					
P					
Hap_1	13	9	10	32	76,19
Hap_2	1	5	2	8	19,05
Hap_3			1	1	2,38
Hap_4			1	1	2,38
TOTAL	14	14	14	42	100

Relaciones entre haplotipos

Las relaciones entre los haplotipos identificados se analizaron a través de las redes de haplotipos (Figuras 4 y 5), mediante el programa Network versión 4.6.1.3 (Fluxus Tenchnology Ltd.). Tanto para el gen 16S tipo F como para el tipo M, las redes de haplotipos construidas muestran una estructura estrellada con todos los haplotipos fuertemente relacionados con el más frecuente. Este tipo de morfología es característica de procesos de expansión poblacional. Además, para el tipo F, la red se caracteriza por la gran presencia de haplotipos privados los cuales, en su mayoría, están relacionados con el haplotipo más abundante. Este haplotipo más abundante correspondería al haplotipo ancestral, es decir, el haplotipo a partir del cual habrían derivado el resto. Para el tipo M, solo los individuos de la localidad de Monte Gordo muestran haplotipos privados. En ambos casos, el número de cambios nucleotídicos es bajo, con solo 1 o 2 cambios.

Las redes de haplotipos elaboradas no mostraron en ningún caso evidencias de diferenciación poblacional; la mayoría de los haplotipos privados se encontraron en 2-7 individuos de cada una de las localidades y los haplotipos más frecuentes se encontraron distribuidos en todas las localidades.

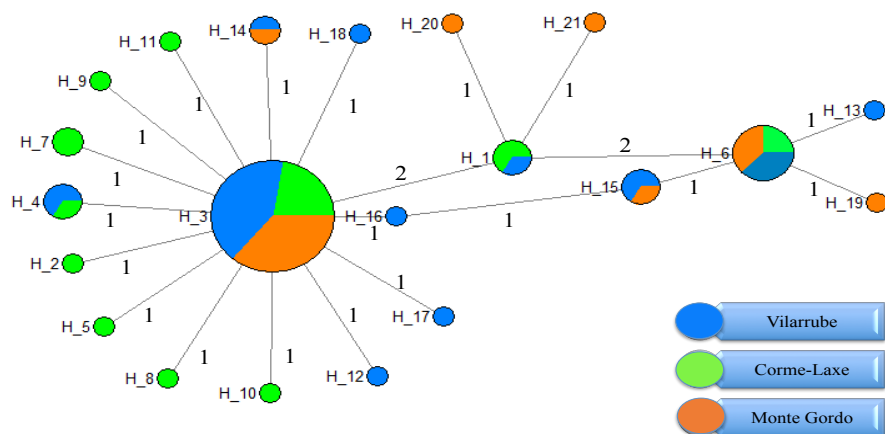


Figura 4. Árbol de redes con las relaciones inferidas entre los haplotipos del gen 16S para el tipo F. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia relativa del haplotipos y los colores representan el aporte de cada localidad al haplotipo. Los números representados en las ramas indican el número de cambios que dieron lugar al haplotipo.

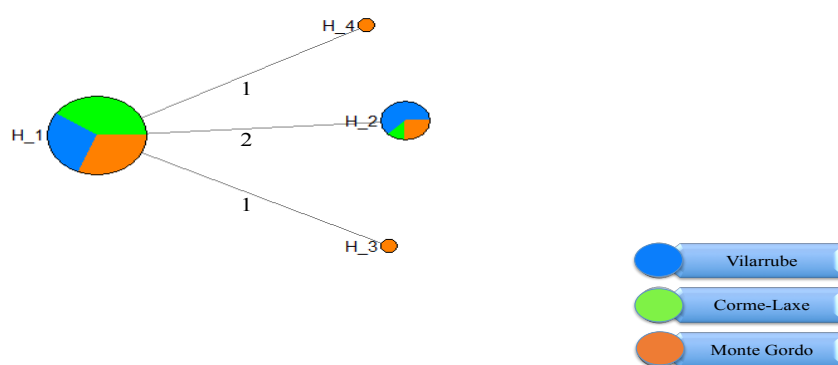


Figura 5. Árbol de redes con las relaciones inferidas entre los haplotipos del gen 16S para el tipo M. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia relativa del haplotipos y los colores representan el aporte de cada localidad al haplotipo. Los números representados en las ramas indican el número de cambios que dieron lugar al haplotipo.

Análisis de la diversidad genética

El nivel de variación en cada una de las localidades analizadas medido a través de la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) se muestra en las Tabla 6. Los valores más altos de diversidad haplotípica para el tipo F se encuentran en la localidad de Corme-Laxe (0,750) y los más bajos en Vilarrube (0,475). La diversidad nucleotídica para este tipo de ADNmt es idéntica en todas las localidades (0,004). Para el tipo M, la mayor diversidad haplotípica se presenta en las localidades de Corme-Laxe y Monte Gordo (0,495). En cuanto a diversidad nucleotídica, Monte Gordo muestra los valores más altos (0,001) y Corme-Laxe y Vilarrube los valores más bajos, ya que ambas localidades presentan un valor cero de diversidad. Éste valor cero es debido a que las muestras dentro de la población sólo se diferencian en la presencia o ausencia de ciertos gaps en sus secuencias, que el programa no considera como diferencias nucleotídicas.

Tabla 6. Estimaciones de diversidad genética en las secuencias F y M del gen 16S.

Localidad	16S tipo F				16S tipo M			
	<i>n</i>	Nh	<i>h</i>	π	<i>n</i>	Nh	<i>h</i>	π
Vilarrube	38	11	0,475	0,004	14	2	0,161	0,00
Corme-Laxe	26	11	0,750	0,004	14	2	0,495	0,00
Monte Gordo	29	7	0,600	0,004	14	4	0,495	0,001
TOTAL	93	21	0,605	0,004	42	4	0,391	0,000

n: número de individuos analizados; Nh: número de haplotipos encontrados; *h*: diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica.

La Tabla 7 muestra los valores obtenidos para el estadístico F_S de F_u para los tipos F y M. Los valores obtenidos fueron significativos en la mayoría de los casos, indicando posibles eventos de expansión poblacional. En las localidades de Vilarrube y Corme-Laxe para el tipo M, no se ha podido realizar el test. Esto se debe a que estas localidades solo se diferencian, como ya hemos indicado anteriormente, en la presencia o ausencia de gaps establecidos en algunas posiciones de sus secuencias, algo que el programa no considera como diversidad nucleotídica y, por ello, no aporta valores que apoyen los posibles eventos de expansión poblacional.

Tabla 7. Test F_S de F_u para el gen 16S tipo F y M.

Localidad	16S tipo F	16S tipo M
Vilarrube	-5,129*	-
Corme-Laxe	-6,435*	-
Monte Gordo	-1,236	-1,475
TOTAL	-15,890*	-2,795

*Diferenciación significativa ($P < 0,05$).

Análisis de la diferenciación poblacional

La estructura genética de las localidades fue analizada mediante el análisis AMOVA (Tablas 8 y 9). Para los dos tipos de ADNmt se observa que el mayor porcentaje de variación se encuentra dentro de las localidades (99,69% para el tipo F y 94,81% para el tipo M). Además, podemos observar que el porcentaje de variación es mayor en el tipo F que en el M.

Los valores de índice de fijación F_{ST} obtenidos a partir de los haplotipos del gen 16S fueron 0.00314 para el tipo F y 0.05194 para el tipo M, ninguno de ellos significativamente distintos de cero.

Tabla 8. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) para el gen 16 S tipo F.

Gen 16S tipo F				
Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% variación
Entre localidades	2	0,661	0,00095	0,31
Dentro de localidades	90	27,145	0,30161	99,69
TOTAL	92	27,806	0,30256	

Índice de fijación (F_{ST}) 0.00314

Tabla 9. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) para el gen 16S tipo M.

Gen 16S tipo M				
Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	% variación
Entre localidades	2	0,665	0,01033	5,19
Dentro de localidades	39	7,357	0,18864	94,81
TOTAL	41	8,024	0,19898	

Índice de fijación (F_{ST}) 0.0519

El cálculo del índice F_{ST} por pares de localidades se refleja en la Tabla 10. Los valores obtenidos no revelaron la existencia de diferencias significativas entre las comparaciones realizadas.

Tabla 10. Valores F_{ST} por pares de localidades en 16S tipo F (diagonal superior) y 16S tipo M (diagonal inferior).

Localidad	Vilarrube	Corme-Laxe	Monte Gordo
Vilarrube	-	-0,00077	-0,01220
Corme-Laxe	0,15593	-	0,02804
Monte Gordo	-0,00962	0,02404	-

DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó la diversidad genética y diferenciación poblacional de *D. trunculus* en dos localidades gallegas y una portuguesa, empleando para ello un fragmento del gen 16S como marcador molecular. Esta región es un marcador mitocondrial ampliamente usado en estudios poblacionales tanto de moluscos bivalvos (Ladoukakis *et al.*, 2002; Kong & Li, 2009; Yuan, Kong & Li, 2013) como de otros organismos marinos (Boissin *et al.*, 2008; Sotelo *et al.*, 2009; Ahrens *et al.*, 2013; Schuchert, 2014), pero es la primera vez que se analiza con este fin en *D. trunculus*.

La presencia de DUI en *D. trunculus* es un factor importante que debe tenerse en cuenta ya que puede interferir en la interpretación de estudios poblacionales (Ladoukakis *et al.*, 2002). Esto hizo necesario el empleo de cebadores específicos para la amplificación de ambos tipos mitocondriales (F y M).

El fragmento analizado del gen 16S tipo F resultó ser polimórfico para las tres localidades estudiadas en este trabajo, y mostró valores medios de diversidad haplotípica y nucleotídica. En 93 individuos examinados existen 21 haplotipos distintos, mientras que, para el fragmento 16S tipo M, se estudiaron 42 individuos encontrándose tan sólo 4 haplotipos. Este elevado número de haplotipos para el tipo F y bajo para el tipo M concuerda con los resultados obtenidos en otros análisis de diversidad genética de moluscos bivalvos como el realizado en el mejillón *M. galloprovincialis* (Ladoukakis *et al.*, 2002).

Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica para los tipos F y M fueron de 0,605 y 0,004, y 0,391 y 0,000, respectivamente. La mayor diversidad haplotípica y nucleotídica observada en el tipo F concuerda con los datos obtenidos en *M. galloprovincialis* (Ladoukakis *et al.*, 2002). Estos autores sugieren que la mayor variabilidad del ADNmt tipo F se debe a que presenta un tamaño efectivo de la población mayor, puesto que aparece en ambos sexos, mientras que el tipo M, está restringido sólo a machos. Teóricamente la variabilidad presente en una población está correlacionada positivamente con el tamaño efectivo de la misma (Fuji & Nishida, 1997). Debemos resaltar que la baja diversidad nucleotídica obtenida para el tipo M es, en parte, debida a que en las localidades de Villarube y Corme-Laxe el programa utilizado no considera diferencias nucleotídicas entre ellas, al diferenciarse únicamente en la presencia o ausencia de ciertos gaps en sus secuencias.

Los resultados obtenidos con el test F_s de Fu para el tipo F son significativos para las localidades de Villarube y Corme-Laxe lo que sugiere la existencia de eventos de expansión poblacional. Estos resultados no pueden ser confirmados con los valores del tipo M, ya que no se pudo realizar el test para las localidades de Villarube y Corme-Laxe.

La red de haplotipos construida para cada uno de los tipos de ADNmt muestra en ambos casos una estructura estrellada con todos los haplotipos estrechamente relacionados con el más frecuente. Esta estructura también es característica de poblaciones en expansión tras un cuello de botella (Slatkin & Hudson, 1991), lo que apoya los resultados obtenidos en

el test F_s de Fu para el tipo F. Por otro lado, todas las localidades presentan el haplotipo más abundante para cada tipo de ADNmt, que correspondería con el haplotipo ancestral del que derivaron el resto. Así mismo, la presencia de los haplotipos más frecuentes en todas las localidades, unido a un elevado número de haplotipos únicos, es un patrón característico de organismos marinos cuyas poblaciones han sufrido regresión durante las glaciaciones de Pleistoceno (Baker *et al.*, 2008; Sotelo *et al.*, 2009). Además, este patrón, es indicativo de que las poblaciones han evolucionado a partir de una población ancestral de pequeño tamaño efectivo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el AMOVA y en los análisis de F_{ST} , el gen 16 S no presenta diferencias significativas en ambos tipos de ADNmt en las tres localidades estudiadas. Estos resultados indican la ausencia de diferenciación genética entre las localidades, lo que sugiere la existencia de intercambio genético entre las mismas. La ausencia de variaciones genéticas entre poblaciones es un patrón muy común en estudios genéticos de poblaciones marinas de especies con desarrollo larvario pelágico, donde las altas capacidades dispersivas y la mezcla oceánica actúan como agentes homogeneizantes de las poblaciones, dando lugar a que entre ellas no exista variabilidad genética (Reichow & Smith, 2001; Rivera *et al.*, 2004). Así mismo, el análisis AMOVA reveló una mayor diferenciación dentro de las localidades, siendo este porcentaje superior en el tipo F, aunque en ninguno de los casos resultaron significativos. Estos resultados coinciden con los observados en *M. galloprovincialis*, donde el genoma F muestra mayor diversidad dentro de las poblaciones (Ladoukakis *et al.*, 2002).

La ausencia de diferenciación observada en las localidades estudiadas de *D. trunculus* podría relacionarse con el desarrollo larvario que, como ocurre en general en moluscos, conlleva un período variable de tiempo como parte del plancton, el cual puede estar pasivamente dirigido por las corrientes de agua a distancias considerables (Seed, 1969). Por ello, este comportamiento de las larvas promueve la conectividad de las poblaciones de adultos locales de acuerdo con los patrones hidrográficos. La costa atlántica ibérica está bajo la influencia de la Corriente Ibérica Polar (IPC). Esta corriente va principalmente hacia el norte de Galicia desde el sur de Portugal, pasando por el Cabo de Finisterre y dirigiéndose después hacia el este, a lo largo de la costa cantábrica y hacia el norte de la Bahía de Vizcaya. Además, rasgos de mesoescala tales como la topografía costera, afloramientos estacionales, giros y remolinos también gobiernan los movimientos del agua a lo largo de este rango (Quinteiro *et al.*, 2007), lo que facilita la homogeneización genética. Esta homogeneización a lo largo de la costa gallega y portuguesa aparece en diversos estudios, como por ejemplo el llevado a cabo en *Necora puber* (Sotelo *et al.*, 2009). Además de las corrientes oceánicas, la ausencia de diferenciación genética observada también podría estar relacionada con procesos de expansión poblacional, detectados con el test F_s de Fu y en las redes de haplotipos.

CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer tras la realización del presente trabajo son las siguientes:

1. El número de haplotipos encontrados para el fragmento 16S tipo F fueron 21 mientras que para el tipo M fueron 4. Los haplotipos más abundantes son el haplotipo 3 en el caso del tipo F y el 1 para el tipo M. Estos haplotipos son comunes en las tres localidades y, además, son haplotipos ancestrales a partir de los cuales han derivado el resto.
2. Los resultados obtenidos tras la realización del test F_S de Fu y la red de haplotipos muestran la presencia de eventos de expansión poblacional después de que la población inicial se viese reducida de forma drástica.
3. Los análisis AMOVA y F_{ST} revelan la ausencia de diferencias significativas en las localidades estudiadas, lo que supone que estas localidades presentan un gran intercambio genético entre ellas.

CONCLUSIÓNS

As conclusións que se poden extraer tras a realización do presente traballo son as seguintes:

1. O número de haplotipos atopados para o fragmento 16S foron 21 mentres que para o tipo M foron 4. Os haplotipos máis abundantes son o haplotipos 3 no caso do tipo F e o 1 para o tipo M. Estes haplotipos son comúns nas 3 localidades e, ademais, son haplotipos ancestrais a partir dos cales derivaron o resto.
2. Os resultados obtidos tras a realización do test F_S de Fu e da rede de haplotipos mostran a presenza de eventos de expansión poboacional e despois de que a poboación inicial se vise reducida de forma drástica.
3. As análises AMOVA e F_{ST} de Fu revelan a ausencia de diferenzas significativas nas localidades estudiadas, o que supón que estas localidades presentan un gran intercambio xenético entre elas.

CONCLUSIONS

After the finalization of this research, the following conclusions were attained:

1. 21 haplotypes were found for the F type 16S fragment and 4 haplotypes were found for the M type. The most abundant haplotypes are the haplotype 3 for the F type and the haplotype 1 for the M type. These are common in the 3 locations and, in addition, they are ancestral haplotypes from which the other ones derived.
2. The results of the Fu's F_S test and the haplotype network show population expansion events that happened after the drastic reduction of the initial population.
3. The AMOVA and F_{ST} test reveal the absence of significant differences among the analysed locations, showing a great genetic exchange.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahrens J.B., Borda E., Barroso R., Paiva P.C., Campbell A.M., Wolf A., Nugues M.M., Rouse G.W. & Schulze A. (2013). The curious case of *Hermodice carunculata* (Annelida: Amphinomidae): evidence for genetic homogeneity throughout the Atlantic Ocean and adjacent basins. *Molecular Ecology*. 22: 2280-2291.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1997). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.
- Baker P., Austin J.D., Bowen B.W. & Baker S.M. (2008). Range-wide population structure and history of the northern quahog (*Merceneria merceneria*) inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Journal of Marine Science*. 65: 155-163.
- Ballard J.W.O & Whitlock M.C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*. 13: 729-744.
- Bandelt H.J., Forster P. & Rohl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37-48.
- Bayed A. & Guillou J. (1985). Contribution a l'étude des populations du genre *Donax*: la population de *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia) de Mehdia (Maroc). *Annales de l'Institut Oceanographique*. 61: 139-147.
- Birky Jr CW. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics*. 35: 125-1248.
- Breton S., Doucet-Beaupré H., Stewart D.T., Hoeh W.R. & Blier P.U. (2007). The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough?. *Trends in Genetics*. 23: 465-474.
- Boissin E., Féral J.P. & Chenuil A. (2008). Defining reproductively isolated units in a cryptic and syntopic species complex using mitochondrial and nuclear markers: the brooding brittle star, *Amphipholis squamata* (Ophiuroidea). *Molecular Ecology*. 17: 1732-1744.
- Cornet M. & Soulard C. (1990). Chromosome number and karyotype of *Donax trunculus* L. (Mollusca, Bivalvia, Tellinacea). *Genetica*. 82: 93-97.
- Excoffier L. & Lischer H.E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Ferguson A., Taggart J.B., Prodöhl P.A., McMeel O., Thompson C., Stone C., McGinnity P. & Hynes R.A., (1995) The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*. 47: 103-126.

- Fisher C. & Skibinski D.O.F. (1990). Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus*. *Proceedings of The Royal Society of London B*. 242: 149-156.
- Fu Y.X. (1997). Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*. 147: 915-925.
- Fuji T. & Nishida M. (1997). High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*. 63: 906-910.
- Galtier N., Nabholz B., Glémin S. & Hurst G.D.D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*. 18: 4541-455.
- Gaspar M.B., Ferreira R. & Monteiro C.C. (1999). Growth and reproductive cycle of *Donax trunculus* L., (Mollusca: Bivalvia) off Faro, southern Portugal. *Fisheries Research*. 41: 309-316.
- Gissi C., Iannelli F. & Pesole G. (2008). Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*. 101: 301-320.
- González-Tizón A., Martínez-Lage A., Marinas L., Freire R., Cornudella L. & Méndez Y. (1998). Cytogenetic characterization of *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia). *Cytogenetics and Cell Genetics*. 81: 109-109.
- Hall T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hoeh W.R., Blakley K.H. & Brown W.M. (1991). Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial-DNA. *Science*. 251: 1488-1490.
- Hoeh W.R., Stewart D.T., Sutherland B.W., Zouros E. (1996). Cytochrome c oxidase sequence comparisons suggest an unusually high rate of mitochondrial DNA evolution in *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia). *Molecular Biology and Evolution*. 13: 418-421.
- Hoeh W.R., Stewart D.T. & Guttman S.I. (2002). High fidelity of mitochondrial genome transmission under the doubly uniparental mode of inheritance in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoidea). *Evolution*. 56: 2252-2261.
- Hoffman R.J., Boore J.L. & Brown W.M. (1992). A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics*. 131: 397-412.
- Joaquim S., Pereira J., Leitão A., Matias D., Chaves R., Guedes-Pinto H., Chícharo L. & Gaspar M. (2010). Genetic diversity of two Portuguese populations of the pullet carpet shell *Venerupis senegalensis*, based on RAPD markers: contribution to a sustainable restocking program. *Helgoland Marine Research*. 64: 289-29.
- Kocher T.D., Thomas W.K., Meyer A., Edwards S.V., Pääbo S., Villablanca F.X., & Wilson sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 86:6196-6200.

- Kong L. & Li Q. (2009). Genetic evidence for the existence of cryptic species in an endangered clam *Coelomactra antiquata*. *Marine Biology*. 156: 1507-1515.
- Kumazawa Y., Azuma Y. & Nishida M. (2004). Tempo of mitochondrial gene evolution: can mitochondrial DNA be used to date old divergence?. *Endocytobiosis Cell Res*. 15: 136–142.
- Moses M.J. (1961). Spermiogenesis in the crayfish (*Procambarus clarkii*) II. Description of stages. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*. 10: 301–333.
- Ladoukakis E.D., Saavedra C., Magoulas A. & Zouros E. (2002). Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. *Molecular Ecology*. 11: 755-769.
- Liu H-P, Mitton J.B. & Wu S-K. (1996). Paternal mitochondrial DNA differentiation far exceeds maternal mitochondrial DNA and allozyme differentiation in the freshwater mussel *Anodonta grandis grandis*. *Evolution*. 50: 952-957.
- Mazé R. A. & Laborda A. J. (1988). Aspectos de la dinámica de población de *Donax trunculus* L. (Bivalvia: Donacidae) en la ría de El Barquero (Lugo, NW España). *Investigación Pesquera Barcelona*. 52 (3): 299–312.
- Nei M. (1987). Molecular evolutionary genetics. *Columbia University Press, New York*.
- Passamonti M. & Scali V. (2001). Gender-associated mitochondrial DNA heteroplasmy in the venerid clam *Tapes philippinarum* (Mollusca Bivalvia). *Current Genetics*. 39: 117-124.
- Petrovic V. & Plohl M. (2005). Sequence divergence and conservation in organizationally distinct subfamilies of *Donax trunculus* satellite DNA. *Gene*. 362: 37-43.
- Petrovic V., Pérez-García C., Pasantes J.J., Satovic E., Prats E. & Plohl M. (2009). A GC-rich satellite DNA and karyology of the bivalve mollusk *Donax trunculus*: a dominance of GC-rich heterochromatin. *Cytogenetic and Genome Research*. 124: 63-71.
- Plohl M. & Cornudella L. (1996). Characterization of a complex satellite DNA in the mollusc *Donax trunculus*: Analysis of sequence variations and divergence. *Gene*. 169: 157-164.
- Plohl M. & Cornudella L. (1997). Characterization of interrelated sequence motifs in four satellite DNAs and their distribution in the genome of the mollusc *Donax trunculus*. *Journal of Molecular Evolution*. 44: 189-198.
- Plohl M., Prats E., Martínez-Lage A., González-Tizón A., Méndez J. & Cornudella L. (2002). Telomeric localization of the vertebrate-type hexamer repeat, (TTAGGG)(n), in the wedgeshell clam *Donax trunculus* and other marine invertebrate genomes. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 19839-19846.
- Quinteiro J., Rodríguez-Castro J. & Rey-Méndez M. (2007). Population genetic structure of the stalked barnacle *Pollicipes pollicipes* in the northeastern Atlantic: influence of coastal

- currents and mesoscale hydrographic structures. *Marine Biology*. 153:47–60.
- Reichow D. & Smith MJ. (2001). Microsatellites reveal high levels of gene flow among populations of the California squid *Loligo opalescens*. *Molecular Ecology*. 10: 1101–1109.
- Rice W.R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43: 223-225.
- Rivera M.A.J., Kelley C.D. & Roderick G.K. (2004). Subtle population genetic structure in the Hawaiian grouper, *Epinephelus quernus* (Serranidae) as revealed by mitochondrial DNA analysis. *Biological Journal of the Linnean Society*. 81: 449–468.
- Rozas J. (2009). DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. Pp. 337-350. In Posada, D. (ed.) *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series*. Vol. 537. Humana Press, NJ, USA.
- Satovic E. & Plohl M. (2013). Tandem Repeat-Containing MITEs in the Clam *Donax trunculus*. *Genome Biology and Evolution*. 5: 2549-2559.
- Schuchert P. (2014). High genetic diversity in the hydroid *Plumularia setacea*: a multitude of cryptic species or extensive population subdivision?. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 76:1-9.
- Seed R. (1969). The ecology of *Mytilus edulis* L. (Lameli-brabchiata) on exposed rocky shores. Breeding and settlement. *Oecologia*. 3: 277–316.
- Skibinski D.O.F., Gallagher C. & Beynon C.M. (1994a). Mitochondrial DNA inheritance. *Nature*. 386: 817-818.
- Skibinski D.O.F., Gallagher C. & Beynon C.M. (1994b). Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the mussel *Mytilus edulis*. *Genetics*. 138: 801-809.
- Slatkin M. & Hudson R.R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*. 129: 555-562.
- Sotelo G., Posada D. & Moran P. (2009). Low-mitochondrial diversity and lack of structure in the velvet swimming crab *Necora puber* along the Galician coast. *Marine Biology*. 159: 1039-1048.
- Sutovsky P., Moreno R.D., Ramalho-Santos J., Dominko T., Simerly C. & Schatten G. (1999) Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*. 402: 371–372.
- Tebble N. (1966). British bivalve shells. A Handbook for Identification. *London: The British Museum (Natural History)*.
- Theologidis I., Fodelianakis S., Gaspar M.B. & Zouros E. (2008). Doubly uniparental inheritance (DUI) of mitochondrial DNA in *Donax trunculus* (Bivalvia: Donacidae) and the problema of its sporadic detection in Bivalvia. *Evolution*. 62: 959-970.

Thompson J.D., Higgins D. & Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.

Ursprung H. & Schabtach E. (1965). Fertilization in tunicates: loss of the paternal mitochondrion prior to sperm entry. *Journal of Experimental Zoology*. 159: 379-383.

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

Ward R.D. (2006). The importance of identifying spatial population structure in restocking and stock enhancement programmes. *Fisheries Research*. 80: 9-18.

White D.J., Wolff J.N., Pierson M. & Gemmell N.J. (2008). Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Molecular Ecology*. 17: 4925-4942.

Wolstenholme D.R., Macfarlane J.L., Okimoto R., Clary D.O. & Wahleithner J.A. (1987). Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 84: 1324-1328.

Yuan Y., Kong L. & Li Q. (2013). Mitogenome evidence for the existence of cryptic species in *Coelomactra antiquata*. *Genes Genom*. 35: 693-701.

Xu, J. (2005). The inheritance of organelle genes and genomes: patterns and mechanisms. *Genome*. 48:951-958.

Zink R.M. & Barrowclough G.F. (2008). Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*. 17: 2107-2121.

Zouros E., Freeman K.R., Ball A.O. & Pogson G.H. (1992). Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature*. 359: 412-414.

Zouros E., Ball A.O., Saavedra C. & Freeman K.R. (1994a). Mitochondrial DNA inheritance. *Nature*. 386: 818.

Zouros E., Ball A.O., Saavedra C. & Freeman K.R. (1994b). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 7463-7467.

REFERENCIAS WEB

Consellería do Medio Rural e do Mar, Xunta De Galicia. (s.f.). *Plataforma tecnolóxica da pesca*. Recuperado en Junio de 2015, de <http://www.pescadegalicia.com> .