

Variación alozímica del ostión japonés *Crassostrea gigas* en Bahía San Quintín,
Baja California, México

Allozymic variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* from San Quintín Bay,
Baja California, Mexico

F. Correa^{1*}
E. Collins^{1,2}
A. Ocegüera³
B. Cordero²
D. Domínguez³

¹ Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Laboratorio de Genética, Ecología y Biología Molecular
Apartado postal 453
Ensenada, CP 22800, Baja California, México
*E-mail: correa@uabc.mx

² Departamento de Acuicultura
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada
Carr. Tijuana-Ensenada Km. 107
Ensenada, CP 22800, Baja California, México

³ Facultad de Ciencias. Biología
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453
Ensenada, CP 22800, Baja California, México

Recibido en julio de 2002; aceptado en agosto de 2003.

Resumen

Se analizó la variabilidad alozímica de ostiones adultos de *Crassostrea gigas* procedentes de las cosechas de 1999, 2000 y 2001 de Bahía San Quintín, Baja California, México, empleando la electroforesis en gel de almidón. El análisis comprendió 13 sistemas enzimáticos que revelaron un total de 25 loci, de los cuales 16 fueron monomórficos y 9 polimórficos. Los valores de heterocigosis observada oscilaron desde 0.01 hasta 0.04, mientras que, de acuerdo con la literatura, los valores en ostiones silvestres son de aproximadamente 0.20. Los resultados indican que no existen diferencias estadísticas significativas en la variabilidad alozímica entre las poblaciones anuales analizadas. Sin embargo, la prueba de χ^2 reveló que en los tres años, las poblaciones de ostión presentaron una desviación respecto al modelo teórico de Hardy-Weinberg. Se revela que las tres poblaciones presentaron una diversidad génica reducida debido a una deficiencia de heterocigosis la cual es explicada por el fenómeno de la endogamia y el efecto cuello de botella.

Palabras clave: *Crassostrea gigas*, ostión, endogamia, alozimas.

Abstract

Allozymic variability was analyzed in adult oysters *Crassostrea gigas* from the 1999, 2000 and 2001 crops of San Quintín Bay, Baja California, Mexico, using starch gel electrophoresis. The analysis included 13 enzymatic systems that revealed 25 loci, of which 16 were monomorphic and 9 were polymorphic. The values of observed heterozygosity ranged from 0.01 to 0.04, while according to the literature, the value for wild oysters is approximately 0.20. The results indicate that there are no statistical differences in the allozymic variability among the annual populations analyzed; however, the χ^2 test revealed that in the three years, the oyster populations did not present an equilibrium with regard to the Hardy-Weinberg theoretical model. The three populations showed a reduced genetic diversity due to inbreeding and the bottleneck effect.

Key words: *Crassostrea gigas*, oyster, inbreeding, allozymes.

Introducción

El ostión japonés *Crassostrea gigas* tiene su origen en el noreste de Asia, y ha sido introducido para su cultivo en Europa, América y Nueva Zelanda (FAO, 2001). Fue introducido en Bahía San Quintín, Baja California, México, en 1973, con semilla proveniente del estado de Washington, EUA (Gutiérrez-Wing, 1988).

La primera evaluación de la variabilidad genética en *C. gigas* fue realizada por Buroker *et al.* (1975) con poblaciones de Mud Bay, Washington, EUA, quienes analizaron 11 sistemas enzimáticos y obtuvieron valores de heterocigosis de 0.21. El segundo estudio de Buroker *et al.* (1979) se realizó para establecer similitudes y distancias genéticas entre tres poblaciones japonesas de *C. gigas* y *Saccostrea commercialis*. En ese trabajo se analizaron 18 sistemas enzimáticos para obtener 30 loci, reportando valores de heterocigosis observada de 0.20 a 0.22 en esas poblaciones y concluyendo en que *C. gigas* es la especie, entre los moluscos bivalvos, que presenta los mayores valores de heterocigosis, los cuales probablemente le confieren una mayor capacidad de adaptación a diversos ambientes (Buroker *et al.*, 1979).

De la Rosa-Vélez *et al.* (1991) analizaron siete loci génicos de ostión cultivado en San Quintín y sugirieron que el origen de la población analizada era de Miyagui, Japón, debido a que observaron niveles de variación genética similares a la japonesa. Sin embargo mencionaron que cuatro de siete loci presentaron deficiencia de heterocigotos, debido posiblemente a la selección natural, a la endogamia y al efecto Wahlund.

Durante 1997 y 1998 se suscitaron mortalidades masivas en los cultivos de ostión en Bahía San Quintín (García-Esquivel *et al.*, este volumen). Estos autores realizaron una evaluación de este fenómeno y señalan que tales mortalidades fueron inusualmente altas (> 70% en organismos mayores de 2 cm), pero el agente causal no fue identificado. Este problema se registró además en otras zonas geográficas, como las bahías de Sonora, México, y el norte de California, Oregon y Washington (Cheney *et al.*, 2001; García-Esquivel *et al.*, este volumen; P. Danigo, Sol Azul S.A. de C.V., La Paz, BCS, México, com. pers.; F. Fonseca, Taylor Shellfish Farms, Washington, EUA, com. pers.). Debido a lo anterior y dada la magnitud del problema se desarrolló el presente estudio, con el fin de conocer la diversidad genética de los ostiones cultivados durante tres años (1999–2001) en Bahía San Quintín.

Materiales y métodos

En octubre de 1999, 2000 y 2001, se recolectaron un mínimo de 40 organismos adultos de talla comercial de los sistemas de cultivo de la Empresa Integradora Acuacultores de San Quintín, S.A. de C.V. (30°24' N; 115°57' W). Los ostiones analizados provinieron de semilla importada de la compañía Taylor Shellfish Farms (Washington, EUA). Los organismos adultos recolectados fueron transportados vivos en hieleras a 10°C hasta el laboratorio en Ensenada, BC. Los ostiones se

Introduction

The Pacific oyster *Crassostrea gigas* originated in northeastern Asia and has been introduced for commercial culture to Europe, America and New Zealand (FAO, 2001). It was introduced into San Quintín Bay, Baja California, Mexico, in 1973, with seed from Washington State, USA (Gutiérrez-Wing, 1988).

The first evaluation of the genetic variability of *C. gigas* was made by Buroker *et al.* (1975) with populations from Mud Bay, Washington, who analyzed 11 enzymatic systems and obtained heterozygosity values of 0.21. Buroker *et al.* (1979) conducted a second study to establish genetic similarities and differences among three Japanese populations of *C. gigas* and *Saccostrea commercialis*; they analyzed 18 enzymatic systems, revealing 30 loci, and reported heterozygosity values of 0.20 to 0.22 for these populations. These authors concluded that, among bivalve molluscs, *C. gigas* is the species that presents the highest heterozygosity values and, consequently, is probably better able to adapt to diverse environments (Buroker *et al.*, 1979).

De la Rosa-Vélez *et al.* (1991) analyzed seven genic loci of oyster cultivated in San Quintín and suggested that the population studied originated in Miyagui, Japan, as they observed levels of genetic variation similar to those of Japanese oysters; however, they reported that four of the seven loci presented heterozygote deficiency, probably due to natural selection, inbreeding and the Wahlund effect.

In 1997 and 1998, mass mortalities occurred among the oysters cultured at San Quintín Bay (García-Esquivel *et al.*, this issue). These authors evaluated this phenomenon and indicate that these mortalities were unusually high (>70% of organisms greater than 2 cm), but the causal agent was not identified. This problem was also recorded in other areas, such as the bays of Sonora, Mexico, and northern California, Oregon and Washington (Cheney *et al.*, 2001; García-Esquivel *et al.*, this issue; P. Danigo, Sol Azul S.A. de C.V., La Paz, BCS, Mexico, pers. comm.; F. Fonseca, Taylor Shellfish Farms, Washington, USA, pers. comm.). Due to the magnitude of the problem, this study was carried out to determine the genetic diversity of the oysters cultured during three years (1999–2001) in San Quintín Bay.

Material and methods

In October 1999, 2000 and 2001, a minimum of 40 adult oysters of commercial size were collected from the cultures of the Empresa Integradora Acuacultores de San Quintín, S.A. de C.V. (30°24' N; 115°57' W). The specimens analyzed originated from seed obtained from the Taylor Shellfish Farms (Washington, USA). The organisms collected were transported live in ice chests (10°C) to the laboratory in Ensenada, Baja California, where they were cleaned to remove epibionts and frozen at –70°C until processing.

The frozen specimens were dissected to remove the digestive gland and adductor muscle. A fraction of the tissue

limpiaron para eliminar epibiontes y se congelaron a -70°C hasta su procesamiento.

Los organismos congelados fueron disectados para obtener la glándula digestiva y el músculo aductor. Una fracción del tejido fue homogenizada con una solución de Tris-HCl 0.2 M, pH 8.0 y 2 mg mL^{-1} de fenil metil sulfonyl fluoruro (PMSF). El homogenizado fue centrifugado a 7500 g durante 20 min a 4°C para obtener el sobrenadante con las enzimas, las cuales se analizaron posteriormente por electroforesis.

Para efectuar los análisis electroforéticos se utilizó el sistema horizontal en gel de almidón al 10% (Sigma, St. Louis Mo., lot. #18H0665), y los procedimientos técnicos fueron los descritos por de la Rosa-Vélez *et al.* (1991). El análisis comprendió un total de 13 sistemas enzimáticos: malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37); enzima málica (ME, EC 1.1.1.40); isocitrato deshidrogenasa (IDH, EC 1.1.1.42); glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (G6PDH, EC 1.1.1.49); gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GPD, EC 1.2.1.12); hexokinasa (HK, EC 2.7.1.1); carboxilesterasas (EST, EC 3.1.1.1); fosfatasa alcalina (ALP, EC 3.1.3.1); α -amilasa (AMY, EC 3.2.1.1); leucil aminopeptidasa (LAP, EC 3.4.11.1); citosol dipeptidasa (PEP, EC 3.4.13.18); manosa-6-fosfato isomerasa (MPI, EC 5.3.1.8); y fosfoglucomutasa (PGM, EC 5.4.2.2). Se revelaron un total de 25 loci para todas las poblaciones.

Los zimogramas fueron interpretados empleando la designación alélica A y B para describir al alelo que ha alcanzado la distancia mayor al ánodo desde el origen, esto con base en la opción 1 del programa Biosys-1 (Swofford y Selander, 1989). En el caso de sistemas que presentaron más de un locus en el zimograma, éstos fueron numerados en orden ascendente, desde los más anódicos hasta los más catódicos; se consideraron alelos raros aquellos cuya frecuencia fue menor a 0.01 (de la Rosa-Vélez, 1986). Se determinó la variación genética de cada población considerando el número promedio de alelos por locus, la proporción de individuos heterocigotos y la proporción de loci polimórficos ($\alpha = 0.05$). Para cada población anual de ostión se cuantificó la desviación con respecto al modelo de equilibrio teórico de Hardy-Weinberg con la prueba de χ^2 (Sokal y Rohlf, 1981), a la cual se le aplicó la corrección de Levene (1949) para muestras pequeñas (Trujillo, 1995, 2002). Para probar la independencia entre las poblaciones anuales de ostión y su composición génica, se llevó a cabo la prueba exacta de Fisher en tablas de contingencia $R \times C$, empleando el método en cadena de Markov con el programa Genepop 3.1 (Raymond y Rousset, 1995). La hipótesis nula fue la no independencia en la variación alélica de los loci polimórficos a nivel interpoplacional, donde un valor de $\alpha \leq 0.05$ indica el rechazo de la hipótesis nula.

Resultados

Se registraron 25 loci para las tres poblaciones anuales, de los cuales 9 fueron polimórficos (Mdh-1, Me-1, Hk-1, Est-3, Alp-2, Lap-1, Pep-1, Mpi-1 y Pgm-1), y los 16 loci restantes

was homogenized with a solution of Tris-HCl 0.2 M, pH 8.0 and 2 mg mL^{-1} of phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF). The homogenate was centrifuged at 7500 g for 20 min at 4°C to obtain the supernatant with the enzymes, which were then electrophoretically analyzed.

Electrophoresis was carried out using the horizontal starch gel system (10% starch, Sigma, St. Louis, Mo., #18H0665), following the technical procedures described in de la Rosa-Vélez *et al.* (1991). The analysis included 13 enzymatic systems: malate dehydrogenase (MDH, EC 1.1.1.37); malic enzyme (ME, EC 1.1.1.40); isocitrate dehydrogenase (IDH, EC 1.1.1.42); glucose-6-phosphate-1 dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD, EC 1.2.1.12); hexokinase (HK, EC 2.7.1.1); carboxylesterases (EST, EC 3.1.1.1); alkaline phosphatase (ALP, EC 3.1.3.1); α -amylase (AMY, EC 3.2.1.1); leucil aminopeptidase (LAP, EC 3.4.11.1); cytosol dipeptidase (PEP, EC 3.4.13.18); manose-6-phosphate isomerase (MPI, EC 5.3.1.8); and phosphoglucomutase (PGM, EC 5.4.2.2). A total of 25 loci were revealed for all the populations.

The zymograms were analyzed using the allelic designation A and B to describe the allele that moved the greatest distance from the origin to the anode, based on option 1 of the Biosys-1 program (Swofford and Selander, 1989). When systems presented more than one locus in the zymogram, these were numbered in ascending order, from the most anodic to the most cathodic; alleles whose frequency was less than 0.01 were considered rare (de la Rosa-Vélez, 1986). The genetic variation of each population was determined considering the average number of alleles per locus, the proportion of heterozygote individuals and the proportion of polymorphic loci ($\alpha = 0.05$). For each annual oyster population, the deviation was quantified relative to the Hardy-Weinberg equilibrium model with the χ^2 test (Sokal and Rohlf, 1981), to which Levene's (1949) correction for small samples was applied (Trujillo, 1995, 2002). To determine the independence between the annual oyster populations and their genic composition, Fisher's exact test in $R \times C$ contingency tables was carried out using the Markov chain method with the Genepop 3.1 program (Raymond and Rousset, 1995). The null hypothesis was the non-independence in the allelic variation of the polymorphic loci at the interpopulational level, where a value of $\alpha \leq 0.05$ indicates rejection of the null hypothesis.

Results

A total of 25 loci were recorded for the three annual populations, of which 9 were polymorphic (Mdh-1, Me-1, Hk-1, Est-3, Alp-2, Lap-1, Pep-1, Mpi-1 and Pgm-1), and 16 were monomorphic (Mdh-2, Idh-1, Idh-2, Me-2, G6pdh, Gpd, Est-1, Est-2, Est-D, Amy-1, Amy-2, Lap-2, Pep-2, Pep-3, Mpi-2 and Pgm-2). Alleles with a frequency of less than 0.1 occurred in the following cases: in the 1999 population, the frequencies recorded for allele B of Lap-1 and Mpi-1 were 0.056 and 0.028, respectively; in the 2000 population, the

fueron monomórficos (Mdh-2, Idh-1, Idh-2, Me-2, G6pdh, Gpd, Est-1, Est-2, Est-D, Amy-1, Amy-2, Lap-2, Pep-2, Pep-3, Mpi-2, Pgm-2). En algunos casos se presentaron alelos con una frecuencia menor a 0.1; tal es el caso de la población de 1999, donde el alelo B de Lap-1 y Mpi-1, presentaron frecuencias de 0.056 y 0.028, respectivamente (tabla 1). Para la población de 2000, en Pgm-1, Lap-1 y Mpi-1, el alelo B registró frecuencias de 0.028, 0.097 y 0.083, mientras que para los organismos de 2001, el mismo alelo en Mdh-1, Pgm-1, Est-3, Lap-1 y Mpi-1 observó valores de 0.071, 0.042, 0.042, 0.097 y 0.083, respectivamente (tabla 1).

En relación al número promedio de alelos por locus, éste varió de 1.2 ± 0.1 para la población de 1999, hasta 1.4 ± 0.1 para los de 2001 (tabla 2). Se presentó una tendencia similar en el porcentaje de loci polimórficos, donde el menor valor se registró en 1999 con 20% y el mayor se observó en 2001 con 28%. En relación con la heterocigosis observada, la población de 1999 presentó un valor promedio de 0.010 ± 0.004 , mientras que en los ostiones de 2001 éste fue de 0.047 ± 0.014 .

En la tabla 3 se muestran los resultados de la prueba de χ^2 empleada, con sus respectivos valores de P asociados, la cual determinó la desviación de cada población con respecto al equilibrio teórico de Hardy-Weinberg. Se encontró que con excepción de uno (1999), dos (2000) y tres loci (2001), el resto de los loci mostraron desviaciones significativas con respecto al equilibrio teórico ($P < 0.001$), así como valores mayores de heterocigocidad (tabla 3).

De acuerdo a los resultados de la prueba exacta de Fisher (tabla 4) se registraron diferencias significativas entre las poblaciones anuales de ostión al comparar las frecuencias génicas de Mdh-1 entre 1999 vs. 2000 ($P = 0.027$) y entre 1999 vs. 2001 ($P = 0.014$); del mismo modo, para Pep-1 entre 1999 vs. 2000 ($P = 0.008$). Para el resto de los loci no existieron diferencias significativas entre las poblaciones anuales de ostiones.

Discusión

A partir de los resultados encontrados, es evidente que las tres poblaciones presentaron una diversidad génica reducida. La población de 1999 registró el valor menor de heterocigosis y se advierte que existe una tendencia a incrementar el valor de este parámetro hacia 2001. Sin embargo, éstos son menores al valor de 0.20 reportado para diferentes poblaciones de ostión japonés (Buroker *et al.*, 1975; Fujio, 1982; Ozaki y Fujio, 1985; de la Rosa-Vélez *et al.*, 1991; English *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). De la Rosa-Vélez *et al.* (1991) presentaron algunas hipótesis (endogamia, selección por el medio ambiente y efecto Wahlund) para explicar la deficiencia de heterocigosis que encontraron al estudiar los ostiones cultivados de Bahía San Quintín.

En el caso del ostión cultivado en Bahía San Quintín, en los tres años que comprendió el presente estudio, los niveles de variabilidad genética y las deficiencias de heterocigosis podrían ser debidas a la endogamia y al fenómeno denominado cuello de botella. Al considerar que la endogamia se produce

frecuencias for allele B of Pgm-1, Lap-1 and Mpi-1 were 0.028, 0.097 and 0.083, respectively; and in the 2001 population, the frequencies for allele B of Mdh-1, Pgm-1, Est-3, Lap-1 and Mpi-1 were 0.071, 0.042, 0.042, 0.097 and 0.083, respectively (table 1).

The average number of alleles per locus ranged from 1.2 ± 0.1 , for the 1999 population, to 1.4 ± 0.1 , for the 2001 population (table 2). Similarly, the lowest value for the percentage of polymorphic loci was recorded in 1999, of 20%, and the highest in 2001, of 28%. Regarding the observed heterozygosity, the mean value for the 1999 oysters was 0.010 ± 0.004 and for the 2001 oysters, 0.047 ± 0.014 .

Table 3 shows the results of the χ^2 test used to determine each population's deviation in relation to the Hardy-Weinberg equilibrium, with the respective probability (P) values. Except for one (1999), two (2000) and three (2001) loci, the rest of the

Tabla 1. Frecuencias alélicas de los loci polimórficos presentes en adultos del ostión japonés *Crassostrea gigas* cosechados en 1999, 2000 y 2001; n: número de organismos analizados; A y B: alelos.

Table 1. Allelic frequencies of the polymorphic loci in adults of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* collected in 1999, 2000 and 2001; n: number of organisms analyzed; A and B: alleles.

Locus	Alelo	1999	2000	2001
Mdh-1	n	36	36	35
	A	1.000	1.000	0.929
	B	0.000	0.000	0.071
Me-1	n	36	36	36
	A	0.889	0.819	0.819
	B	0.111	0.181	0.181
Hk-1	n	35	35	36
	A	0.843	0.700	0.722
	B	0.157	0.300	0.278
Est-3	n	36	36	36
	A	1.000	1.000	0.958
	B	0.000	0.000	0.042
Alp-2	n	36	36	36
	A	0.792	0.681	0.667
	B	0.208	0.319	0.333
Lap-1	n	36	36	36
	A	0.944	0.903	0.903
	B	0.056	0.097	0.097
Pep-1	n	34	35	36
	A	0.221	0.485	0.264
	B	0.779	0.514	0.736
Mpi-1	n	36	36	36
	A	0.972	0.917	0.917
	B	0.028	0.083	0.083
Pgm-1	n	36	36	36
	A	1.000	0.972	0.958
	B	0.000	0.028	0.042

Tabla 2. Variación genética de las tres poblaciones del ostión japonés *Crassostrea gigas* cosechados en 1999, 2000 y 2001; Ho: heterocigosis observada; He(ss): heterocigosis esperada (sin sesgo); ns: no significativo.**Table 2.** Genetic variation of the three populations of Pacific oyster *Crassostrea gigas* collected in 1999, 2000 and 2001. Ho: heterozygosis observed; He(ss): heterozygosis expected (without bias); ns: not significant.

Población	Número promedio de alelos por locus	% de loci polimórficos (P _{0.95})	Heterocigocidad		χ^2
			Ho	He(ss)	
1999	1.2 ± 0.1	20.0	0.010 ± 0.004	0.053 ± 0.022	ns
2000	1.3 ± 0.1	24.0	0.027 ± 0.010	0.082 ± 0.032	ns
2001	1.4 ± 0.1	28.0	0.047 ± 0.014	0.087 ± 0.029	ns

en poblaciones pequeñas con una alta frecuencia de apareamientos consanguíneos, el resultado final es un desequilibrio genético que en lo particular consiste en un incremento en la frecuencia de los genotipos homocigotos y, por lo tanto, una disminución en la frecuencia de los heterocigotos (Falconer, 1981; Gillespie, 1998). Lo anterior es evidente para las tres poblaciones anuales que presentaron un desequilibrio genético que, en el caso de los ostiones de 1999, cinco de seis loci polimórficos muestran deficiencia de heterocigotos; en la de 2000, cinco de siete, y en el caso de los ostiones de 2001, seis de nueve exhiben tal deficiencia. De acuerdo con lo anterior, esto se debió a que la semilla que se introdujo y cultivó en Bahía San Quintín, se obtuvo a partir de un número reducido de reproductores con una baja variabilidad genética (Kittel, 1998; Ward *et al.*, 2000; K. Johnson y F. Fonseca, Taylor Shellfish Farms, Washington, EUA, com. pers.).

En relación con el efecto producido por un cuello de botella, el resultado inmediato en una población es la pérdida de la variación alélica y de la heterocigocidad a causa de las mortalidades y, por lo tanto, ocurre una disminución considerable de la diversidad genética en la población. Este fenómeno se ha reportado en los ostiones cultivados en el estado de Washington, los cuales fueron introducidos desde Tasmania (Kittel, 1998). De la misma forma, a partir de los resultados obtenidos en el presente estudio que indican niveles de variabilidad génica menores a los reportados por otros autores, se deduce la existencia del fenómeno de cuello de botella ocurrido en las poblaciones de ostión cultivado en San Quintín.

Referente a la hipótesis del efecto Wahlund propuesto por de la Rosa-Vélez *et al.* (1991), no es posible utilizarla como explicación para los niveles de variación génica. Esto se debe a que la Bahía San Quintín no forma parte de la distribución geográfica natural de *C. gigas*; por otro lado, a pesar de que se ha introducido como semilla desde 1973 para su cultivo, no se ha reportado hasta el momento el reclutamiento y la integración de esta especie en la fauna de la región. Lo anterior se refuerza debido a que las poblaciones analizadas fueron de semilla que procedió únicamente de un laboratorio comercial (H. González, Empresa Integradora Acuacultores de San Quintín, México, com. pers.) y de los mismos reproductores (F. Fonseca, Taylor Shellfish Farms, Washington, EUA, com. pers.).

loci showed significant deviations relative to the theoretical equilibrium ($P < 0.001$), as well as higher values of heterozygosity (table 3).

The results of the Fisher exact test conducted (table 4) indicate significant differences among the annual oyster populations for the genic frequencies of Mdh-1 in 1999 vs 2000 ($P = 0.027$) and 1999 vs 2001 ($P = 0.014$), and of Pep-1 in 1999 vs 2000 ($P = 0.008$). There were no significant differences among the annual populations for the rest of the loci.

Discussion

It is evident from the results that the three populations showed reduced genetic diversity. The lowest heterozygosity value was recorded for the 1999 population. The values tended to increase towards 2001, but are lower than the value of 0.20 reported for other populations of Pacific oyster (Buroker *et al.*, 1975; Fujio, 1982; Ozaki and Fujio, 1985; de la Rosa-Vélez *et al.*, 1991; English *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). De la Rosa-Vélez *et al.* (1991) proposed that inbreeding, environmental selection and the Wahlund effect could be responsible for the heterozygote deficiency found when they studied oysters from San Quintín.

During the three years covered by this study, the levels of genetic variability and heterozygote deficiencies in the oysters cultured at San Quintín Bay could be due to inbreeding or the bottleneck effect. Inbreeding occurs in small populations with a high frequency of consanguineous mating, resulting in a genetic disequilibrium because of an increase in the number of homozygotes and, consequently, a decrease in the number of heterozygotes (Falconer, 1981; Gillespie, 1998). The three populations studied clearly show a genetic disequilibrium: heterozygote deficiency was recorded for five of the six, five of the seven, and six of the nine polymorphic loci of the 1999, 2000 and 2001 populations, respectively. This occurred because the seed that was introduced and cultured in San Quintín was obtained from a small number of breeders with low genetic variability (Kittel, 1998; Ward *et al.*, 2000; K. Johnson and F. Fonseca, Taylor Shellfish Farms, Washington, USA, pers. comm., 2001).

Tabla 3. Prueba χ^2 para determinar la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg para los diferentes loci por clases de genotipos en cada población de *Crassostrea gigas*; g.l., grados de libertad; P, probabilidad < 0.05; D, deficiencia de heterocigosis.

Table 3. χ^2 test to determine the deviation of the Hardy-Weinberg equilibrium for the different loci per genotype class in each annual population of *Crassostrea gigas*; g.l., degrees of freedom; P, probability < 0.05; D, heterozygote deficiency.

Población	Locus	Clase	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	χ^2	g.l.	P	D
1999	Me-1	AA	31	28.4	21.2	1	<0.001	-0.723
		AB	2	7.2				
		BB	3	0.4				
	Hk-1	AA	29	24.8	30.3	1	<0.001	-0.894
		AB	1	9.4				
		BB	5	0.8				
	Alp-2	AA	28	23.0	32.1	1	<0.001	-0.917
		AB	1	12.0				
		BB	7	1.0				
	Lap-1	AA	33	32.1	10.8	1	<0.001	-0.478
		AB	2	3.8				
		BB	1	0.1				
	Pep-1	AA	7	1.6	30.2	1	<0.001	-0.916
		AB	1	12.0				
		BB	26	20.5				
	Mpi-1	AA	34	34.0	0.014	1	0.904	0.014
		AB	2	2.0				
		BB	0	0.0				
2000	Me-1	AA	26	24.0	4.7	1	0.029	-0.352
		AB	7	11.0				
		BB	3	1.0				
	Hk-1	AA	23	17.0	23.2	1	<0.001	-0.799
		AB	3	14.9				
		BB	9	3.1				
	Alp-2	AA	23	16.6	24.5	1	<0.001	-0.811
		AB	3	15.8				
		BB	10	3.6				
	Lap-1	AA	31	29.3	11.7	1	0.001	-0.532
		AB	3	6.4				
		BB	2	0.3				
	Pep-1	AA	16	8.1	28.3	1	<0.001	-0.887
		AB	2	17.8				
		BB	17	9.1				
	Mpi-1	AA	31	30.2	3.4	1	0.065	-0.283
		AB	4	5.6				
		BB	1	0.2				
	Pgm-1	AA	34	34.0	0.0	1	0.904	0.014
		AB	2	2.0				
		BB	0	0.0				

Tabla 3 (Cont.)

Población	Locus	Clase	Frecuencia observada	Frecuencia esperada	χ^2	g.l.	P	D
2001	Mdh-1	AA	31	30.1	5.6	1	0.017	-0.363
		AB	3	4.7				
		BB	1	0.2				
	Me-1	AA	26	24.1	4.7	1	0.029	-0.352
		AB	7	10.8				
		BB	3	1.1				
	Hk-1	AA	24	18.7	19.8	1	<0.001	-0.727
		AB	4	14.6				
		BB	8	2.7				
	Est-3	AA	33	33.0	0.0	1	0.832	0.029
		AB	3	2.9				
		BB	0	0.1				
	Alp-2	AA	21	15.9	14.8	1	<0.001	-0.630
		AB	6	16.2				
		BB	9	3.9				
	Lap-1	AA	29	29.3	0.3	1	0.552	0.092
		AB	7	6.4				
		BB	0	0.3				
	Pep-1	AA	7	2.4	15.7	1	<0.001	-0.647
		AB	5	14.2				
		BB	24	19.4				
	Mpi-1	AA	30	30.2	0.2	1	0.621	0.076
		AB	6	5.6				
		BB	0	0.2				
	Pgm-1	AA	34	33.0	22.9	1	<0.001	-0.657
		AB	1	3.0				
		BB	1	0.0				

En el presente estudio no se encontraron suficientes evidencias para aseverar la influencia del medio ambiente sobre la variabilidad génica de los ostiones de San Quintín. No obstante, existen antecedentes donde se vincula la influencia del medio ambiente y el cultivo de *C. gigas*. Liu *et al.* (1995) analizaron la variabilidad génica en nueve poblaciones de ostión cultivadas en Taiwán cuyos niveles de heterocigosis fluctuaron de 0.044 a 0.084; los autores mencionan que los

Regarding the bottleneck effect, the immediate result in a population is the loss of allelic variation and heterozygosis because of mortalities, which leads to a considerable decrease in the genetic diversity of the population. This phenomenon has been reported for oysters cultured in Washington State, which were introduced from Tasmania (Kittle, 1998). The results obtained herein indicate lower levels of genetic variability than those reported by other authors, and it is

Tabla 4. Valores de probabilidad (P) de pruebas pareadas de independencia de frecuencias génicas entre las poblaciones cultivadas de ostión mediante la prueba exacta de Fisher en tablas de contingencia usando el método en cadena de Markov. Valores de $\alpha < 0.05$ son significativos.

Table 4. Probability values from paired tests of independence of genic frequencies among the oyster populations based on Fisher's exact test in contingency tables using the Markov chain method. Values of $\alpha < 0.05$ are significant.

	Mdh-1	Me-1	Hk-1	Est-3	Alp-2	Lap-1	Pep-1	Mpi-1	Pgm-1
1999–2000	0.027	1.000	0.853	0.2471	1.000	1.000	0.008	1.000	1.000
1999–2001	0.014	0.424	1.000	0.000	0.7206	0.766	0.496	1.000	1.000
2000–2001	0.765	0.413	0.858	0.000	0.5872	0.763	0.077	1.000	1.000

factores ambientales posiblemente influyen, sin haberlo demostrado, en la sobrevivencia y selección de *C. gigas* en esa región.

Basándose en lo anteriormente expuesto, se concluye que el ostión japonés cultivado en 1999, 2000 y 2001, en Bahía San Quintín, mostró una diversidad genética menor a la reportada en la literatura, además de estar en desequilibrio genotípico y con deficiencias significativas de heterocigosis. Esta condición genética se deduce e interpreta como el resultado de la endogamia y el fenómeno denominado efecto cuello de botella.

Agradecimientos

A Héctor González de la Empresa Integradora Acuacultores de San Quintín, S.A. de C.V., por su invaluable apoyo en el trabajo de campo. El presente estudio fue financiado por el proyecto SIMAC-CONACYT #0107019 y el proyecto UABC-IIO #4054.

Referencias

- Buroker, N., Hershberg, W.K. and Chew, K. (1975). Genetic variation in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. J. Fish. Res. Board Can., 32: 2471–2477.
- Buroker, N., Hershberg, W.K. and Chew, K. (1979). Population genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. Mar. Biol., 54: 157–179.
- Cheney, D., Elstón, R., MacDonald, B., Kinnan, K. and Suhrbier, A. (2001). Summer mortality of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: Influences of culture methods, site conditions, and stock selection. Aquaculture 2001: Book of Abstracts, 118 pp.
- De la Rosa-Vélez, J. (1986). Variabilidad génica poblacional en ostiones de la especie *Crassostrea virginica* del Golfo de México. Tesis de doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México, 124 pp.
- De la Rosa-Vélez, J., Gutiérrez-Wing, M.T. y Radilla-Camacho, R. (1991). El ostricultivo de Bahía de San Quintín, BC, México: Aspectos genéticos. Cienc. Mar., 17(3): 133–145.
- English, L., Maguire, G. and Ward, R. (2000). Genetic variation of wild and hatchery populations of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Australia. Aquaculture, 187(3): 283–298.
- Falconer, D.S. (1981). Introduction to Quantitative Genetics. 2nd ed. Longman, London, 340 pp.
- FAO (2001). Planning and management for sustainable coastal aquaculture development. Rep. Stud. GESAMP, 68: 90 pp.
- Fujio, Y. (1982). A correlation of heterozygosity with growth rate in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Tohoku J. Agr. Res., 33(2): 66–75.
- García-Esquivel, Z., González-Gómez, M.A., Ley-Lou, F. y Mejía-Trejo, A. (2003). Potencial ostrícola del brazo oeste de Bahía San Quintín: Biomasa actual y estimación preliminar de la capacidad de carga. Cienc. Mar., 30(1A): 71–84.
- Gillespie, J.H. (1998). Population Genetics. A Concise Guide. Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, 174 pp.
- Gutiérrez-Wing, M.T. (1988). Utilización de productos en la alimentación de las larvas de ostión japonés *Crassostrea gigas* (Thunberg) en condiciones de laboratorio. Tesis de maestría, CICESE, México, 67 pp.
- Kittel, M. (1998). Comparative analysis of Tasmanian Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, after growout in Washington State. J. Shellfish Res., 17(1): 329.
- therefore inferred that this bottleneck effect occurred in the oyster populations cultured in San Quintín.
- With reference to the Wahlund effect proposed by de la Rosa-Vélez *et al.* (1991), it cannot be used as an explanation for the levels of genetic variation, because San Quintín Bay does not form part of the natural geographic distribution of *C. gigas*. Even though this species was introduced as seed in 1973 for its cultivation, its recruitment and integration to the region's fauna has not been reported to date. This is supported by the fact that the populations analyzed originated from seed from the same commercial laboratory (H. González, Empresa Integradora Acuacultores de San Quintín, Mexico, pers. comm., 2002) and the same breeders (F. Fonseca, Taylor Shellfish Farms, Washington, USA, pers. comm., 2001).
- Sufficient evidence was not found in this study to be able to verify the influence of the environment on the genetic variability of the oysters from San Quintín; however, there are reports associating environmental influence and the culture of *C. gigas*. Liu *et al.* (1995) analyzed genetic variability in nine oyster populations cultivated in Taiwan whose levels of heterozygosity ranged from 0.044 to 0.084, and mention that environmental factors possibly influence the survival and selection of *C. gigas* in that region, even though they do not demonstrate this.
- Based on the above, we conclude that the Pacific oyster cultivated in 1999, 2000 and 2001 at San Quintín Bay showed a lower genetic diversity than that reported in the literature, as well as genotypic disequilibrium and significant heterozygote deficiencies. We infer that this genetic condition is the result of inbreeding and the bottleneck effect.

Acknowledgements

We thank Héctor González of the Empresa Integradora Acuacultores de San Quintín, S.A. de C.V., for his valuable help with the field work. This work was financed by SIMAC-CONACYT (project No. 0107019) and UABC-IIO (project No. 4054).

English translation by Christine Harris.

- Levene, H. (1949). On a matching problem arising in genetics. Ann. Math. Stat., 20: 91–94.
- Liu, L., Soong, K. and Chen, C. (1995). Allozyme variation in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* along the coast of Taiwan. Zool. Stud., 34(3): 177–182.
- Ozaki, H. and Fujio, Y. (1985). Genetic differentiation in geographical populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around Japan. Tohoku J. Agr. Res., 36(1): 49–61.
- Raymond, M. and Rousset, F. (1995). Genepop (versión 3.1): Population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Heredity, 83: 239.
- Sokal, R. and Rohlf, J. (1981). Biometry. 2nd ed. W.H. Freeman, San Francisco, 859 pp.
- Swofford, D. and Selander, R. (1989). Biosys-1: A Fortran program for the comprehensive analysis for electrophoretic data in population genetics and systematics. J. Heredity, 72: 281–283.

- Trujillo, A., Burton, R., de la Rosa, J. y Correa, F. (1995). Variación genética en dos poblaciones del copépodo calanoideo marino *Acartia californiensis* Trinast. Ciencias Marinas, 21(1): 39–58.
- Trujillo-Ortiz, A. (2002). Caracterización Genética de Poblaciones de *Acartia californiensis* (Copepoda: Calanoidea) en la Costa Nororiental del Pacífico. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Baja California. 189 pp.
- Ward, R., English, L., McGoldrick, D., Maguire, G., Nell, J. and Thompson, P. (2000). Genetic improvement of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) in Australia. Aquacult. Res., 31(1): 35–44.
- Yang, R., Yu, Z., Chen, Z., Kong, X. and Dai, J. (2000). Allozyme variation within *Crassostrea plicatula* and *Crassostrea gigas* from Shandong coastal waters. J. Fish. China/Shuichan Xuebao, 24(2): 130–133.