

ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y DEL TAMAÑO EFECTIVO DE LA POBLACIÓN DE COQUINA *DONAX TRUNCULUS* DEL PARQUE NACIONAL DE DOÑANA Y SU CONTRIBUCIÓN A ÁREAS NO PROTEGIDAS

CIRO RICO¹, PILAR DRAKE², ENRIQUE MACPHERSON³, JOSÉ A. CUESTA⁴

RESUMEN

Se han estudiado ejemplares de coquina, *Donax trunculus* en 7 localidades distribuidas por las costas peninsulares atlánticas y mediterráneas españolas. Se ha hecho un análisis comparado de datos de tallas y densidad obtenidos en una localidad explotada (Isla Canela) y otra protegida (playa del Parque Nacional de Doñana), que muestran que la gestión llevada a cabo en el Parque Nacional Doñana es la correcta y permite una pesca sostenible. Se aislaron y caracterizaron 21 *loci* de microsatélites de los cuales 16 resultaron polimórficos y codominantes. De ellos al menos 12 presentan elevadas frecuencias de alelos nulos en todas las poblaciones, y el resto en la mayoría de poblaciones. Todas las muestras fueron genotipadas con estos 16 *loci* y se determinaron los índices de diversidad genética, pruebas de equilibrio, índices de fijación y las probabilidades de diferenciación entre localidades. También se determinaron las probabilidades de asignación a la localidad de muestreo. Se realizaron diversos análisis para determinar las causas potenciales de las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg y se demostró que se deben principalmente a alelos nulos. Se descubrió mediante el análisis del marcador ribosomal ITS que las poblaciones de coquina explotadas comercialmente en España bajo la denominación específica *Donax trunculus* son en realidad una mezcla de una especie híbrida y una no híbrida. El análisis de la estructura genética, tanto el realizado a todos los individuos como de forma separada para individuos híbridos y no-híbridos, demostró que existen cuatro poblaciones genéticamente distintas en el litoral español. La primera en el Mar Cantábrico, la segunda en el Golfo de Cádiz, la tercera entre el Estrecho de Gibraltar y el Cabo de Gata y la última entre el Cabo de Gata y el Golfo de Rosas.

Palabras clave: Coquina, *Donax trunculus*, Genética de poblaciones, híbridos, Doñana.

¹ University of South Pacific, Faculty of Science Technology and Environment, School of Marine Studies, Suva, Fiji. Tlf: +679 32 32933, Fax: 32 31526, e-mail: ciro.rico@usp.ac.fj.

² Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC). Avda. República Saharaui, 2, 11519 Puerto Real (Cádiz). Tlf: 956 832 612, Fax: 956 834 701, e-mail: pilar.drake@icman.csic.es.

³ Centro de Estudios Avanzados de Blanes (CEAB-CSIC), Carr. Acces Cala Sant Francesc 14, 17300 Blanes (Girona). Tlf. 972 336101, Fax: 972 337806, e-mail: macpherson@ceab.csic.es.

⁴ Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC). Avda. República Saharaui, 2, 11519 Puerto Real (Cádiz). Tlf: 956 832 612, Fax: 956 834 701, e-mail: jose.cuesta@icman.csic.es.

ESTIMATION OF THE GENETIC DIVERSITY AND EFFECTIVE SIZE OF THE POPULATION OF THE WEDGE CLAM *DONAX TRUNCULUS* OF THE DOÑANA NATIONAL PARK AND ITS CONTRIBUTION TO UNPROTECTED AREAS.

SUMMARY

We have studied seven populations of the wedge clam *Donax trunculus*, distributed through the Spanish Atlantic and Mediterranean coasts. A comparative analysis of size and density was performed from a sample obtained from a commercially exploited population from Isla Canela, and from another population which is managed under a strict plan using only artisanal hand dredging from the beach of the Doñana National Park showing that the management carried out in the Doñana National Park is correct and allows sustainable fisheries. Twenty one microsatellite loci were isolated and characterized in *D. trunculus* of which 16 were polymorphic and codominant. At least 12 of them have high frequencies of null alleles in all populations, and the rest in most populations. All collected samples were genotyped with these 16 loci and genetic diversity indices, tests of disequilibrium, fixation indices and probabilities of genetic differentiation among localities were determined. The odds of assignment to the sampling location were also determined. Several analyses were conducted to determine the potential causes for the deviations from Hardy-Weinberg equilibrium which shown that they were mainly due to the presence of null alleles. Furthermore, using the ribosomal internal transcribed spacer it was determined that the commercially exploited populations of the wedge clam under the specific name *Donax trunculus* are actually a mixture of a hybrid and non-hybrid species. The analysis of the genetic structure made both to all individuals and separately for hybrid and non-hybrid individuals showed four genetically distinct populations in the Spanish coast. The first in the Cantabric Sea, the second in the Gulf of Cadiz, the third from the Strait of Gibraltar to Cabo de Gata and the last one from the Cabo de Gata to the Gulf of Rosas.

Key words: Wedge clam, *Donax trunculus*, Population genetics, hybrids, Doñana.

INTRODUCCIÓN

La coquina, *Donax trunculus* Linnaeus, 1758, tiene una amplia distribución atlántico-mediterránea, estando presente en todo el litoral mediterráneo y desde Senegal hasta Gran Bretaña en el Atlántico, incluyendo las islas Canarias y Madeira. En el litoral andaluz existen importantes poblaciones sobre las que existe una actividad marisquera, como las de la provincia de Huelva, aunque se encuentra prácticamente presente en todo el litoral desde Isla Canela hasta Garrucha.

En cuanto a su hábitat, es una especie endobéntica, que vive enterrada en fondos de arena fina con contenidos en materia orgánica inferior a 0,05%. Es de hábitos alimenticios filtradores, alimentándose de la materia orgánica en suspensión gracias a sus largos sifones. Se localiza en el litoral, en playas con rompiente, pudiéndose encontrar desde 0 hasta 25 m. de profundidad, pero siendo más abundantes entre 0 y 4 m. (PÉREZ MARTÍN & RODRÍGUEZ DEL VALLE 2001; TIRADO *et al.* 2002). La coquina tiene, además, ciertas preferencias en cuanto a la pendiente y a la granulometría del substrato, parámetros que están condicionados por el hidrodinamismo del

litoral, por lo que las alteraciones de éste último pueden tener una influencia notable en sus poblaciones (DE LA HUZ *et al.* 2002; LASTRA *et al.* 2006).

En general, no existe demasiada información sobre los requerimientos ambientales de esta especie. ANSELL y LAGARDÉRE (1980) observaron que, de las especies del género *Donax* presentes en Europa, *D. trunculus* es la que tiene una tolerancia térmica mayor, de ahí su distribución en aguas poco profundas, siendo la temperatura superior letal de 33°C (ANSELL *et al.* 1980, en COMPTON *et al.* 2007). Con respecto a la eurihalinidad de la coquina, tampoco hay información disponible, si bien es muy improbable que sus poblaciones se vean sometidas a descensos pronunciados de salinidad dado que habitan en playas expuestas.

En el caso de la población de coquina presente en la zona marina del Parque Nacional de Doñana, donde la temperatura experimenta un considerable cambio estacional (12,5 °C en febrero a 23,0 °C en septiembre) y la proporción de sexos es próxima a 1:1 (COBOS GARCÍA *et al.* 2002), se ha observado que la especie tiene un comportamiento reproductivo sincrónico, con un periodo de activación gonadal amplio, en el que se produce una emisión continuada desde febrero hasta la segunda quincena de agosto. La talla de madurez sexual en esta población es de 15 mm de longitud de concha, si bien se han observado individuos con capacidad reproductora a partir de los 9 mm.

La actividad marisquera de la playa del Parque Nacional de Doñana está regulada desde 1996, siendo 160 el número máximo de mariscadores que pueden mariscar simultáneamente, debiéndolo hacer con rastros a pie, sólo de lunes a viernes, recogiendo solo ejemplares con tallas mayores de 25 mm y con una captura máxima de 25 kg. por mariscador y día. En general, el porcentaje que representan los ejemplares con talla superior a la talla de pesca permitida es muy bajo, lo que sugiere la existencia de una sobrepesca de la población de Doñana (COBOS GARCÍA *et al.* 2002).

La efectividad de las Reservas Marinas y Áreas Protegidas (RM y APs) puede ser medida en términos del impacto que los organismos protegidos tienen tanto dentro (autoreclutamiento) como fuera de la reserva (exportación), lo que puede ocasionar un enriquecimiento de reclutas en áreas adyacentes (PALUMBI 2003). Por lo tanto, el conocimiento de la conectividad de una RM y AP con el medio que la rodea es fundamental para maximizar su eficacia dentro y más allá de sus fronteras. En este sentido, dos tipos de conectividad deben ser diferenciados, la demográfica y la genética o evolutiva. La primera implica el movimiento de individuos que pasan al menos una parte de su ciclo de vida dentro de una RM y AP, pero no se reproducen dentro de la misma, mientras que el segundo se refiere al intercambio de genes entre poblaciones dentro y fuera de las áreas protegidas. La conectividad demográfica puede ser útil para evaluar la efectividad de una RM y AP en términos del movimiento de individuos hacia áreas no protegidas. Este movimiento puede ser de adultos o de juveniles que se dispersan activamente o mediante el transporte pasivo de huevos y larvas (PALUMBI 2004). Sin embargo, el movimiento individual hacia poblaciones vecinas no puede ser asumido como un indicador de flujo génico que será mantenido a largo plazo mediante este intercambio demográfico. Por lo tanto, para asegurar la sostenibilidad de un recurso explotado o la protección de la biodiversidad, los procesos demográficos que afectan las RM y APs deben ser evaluados desde una perspectiva genética.

El desarrollo de técnicas de genética molecular se ha convertido en una herramienta complementaria y esencial en la gestión efectiva de recursos marinos en las últimas décadas (HAUSER *et al.* 2008). Mediante esta metodología, se puede obtener una estimación del grado de conectividad entre poblaciones a través del flujo génico. Además permite la evaluación de la distribución espacial de la diversidad genética, o paisaje genético marino, dentro y entre áreas geográficas donde nuevas RM y APs pueden ser potencialmente establecidas. Esta información permite a los gestores responsables distinguir poblaciones panmicticas de aquellas aisladas o fragmentadas, cuya identificación es esencial para su conserva-

ción y manejo (GRANT *et al.* 1999). Además, los métodos genéticos son también esenciales para estimar parámetros poblacionales tales como el tamaño efectivo (N_e = Número real de individuos que se reproducen con éxito por generación) de las poblaciones reproductivamente aisladas, así como calcular la pérdida de diversidad genética debida a la sobreexplotación, a causas naturales o a otros efectos antropogénicos como la contaminación y destrucción de hábitats.

La estimación del N_e utilizando la diversidad genética presente en microsatélites es considerada adecuada (HOARAU *et al.* 2005; WAPLES & DO 2008), y puede proporcionar una eficiente forma de estimar tales parámetros cuando se cuenta con un número de muestras temporales adecuado. Recientemente se han desarrollado una gama de herramientas analíticas basadas en la teoría de coalescencia o en inferencia bayesiana. Estas herramientas han mejorado el poder de resolución para describir la historia evolutiva y demográfica que se puede obtener tanto con secuencias del genoma mitocondrial, como con frecuencias alélicas de marcadores nucleares como los microsatélites (OVENDEN *et al.* 2007; WAPLES & DO 2008). Tales herramientas permiten la estimación de parámetros demográficos, como el tamaño efectivo de las poblaciones, las tasas de migración, y su escala temporal (KUHNER *et al.* 1995,1998; KUHNER *et al.* 2000). Estos métodos han sido utilizados para documentar las tendencias demográficas tanto de especies marinas como de agua dulce (LAVERY *et al.* 1996; FAUVELOT *et al.* 2003; ARNASON 2004; SAILLANT *et al.* 2004; ZARDOYA *et al.* 2004; ZANE *et al.* 2006).

El propósito general de este estudio es desarrollar una metodología adecuada para evaluar la integridad y viabilidad de las poblaciones de la coquina *Donax trunculus* en el litoral andaluz, con especial referencia al Parque Nacional de Doñana, mediante la combinación de la genética molecular y el conocimiento actual de la biología y ecología de esta especie. Para ello, estudiaremos la diversidad y estructura genética, la conectividad entre poblaciones y como ésta se ve afectada por las barreras oceanográficas, el tamaño efectivo de las mismas y su estabilidad temporal. Esto, permitiría moni-

torar con bases más sólidas el tamaño de sus poblaciones y su evolución. Asimismo, se podrá analizar el grado de exportación desde el Parque Nacional de Doñana a las zonas adyacentes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

Para la obtención de ejemplares de *D. trunculus* para los estudios genéticos se muestrearon poblaciones de coquinas en diferentes puntos de las costas atlánticas y mediterráneas de la Península Ibérica, en concreto: Rosas (Gerona), San Carlos de la Rápita (Tarragona), Gandía (Valencia), Cabo de Gata (Almería), y Oyambre (Santander), y de una forma más intensiva dos poblaciones del Golfo de Cádiz, las playas de Isla Canela y del Parque Nacional de Doñana, donde además de obtener ejemplares para su estudio genético se hicieron muestreos más intensivos con los que conseguir datos de talla, peso y densidad, para estudiar los posibles efectos del modelo sostenible que se sigue en Doñana, donde sólo está autorizado el marisqueo a pie, mientras que en Isla Canela además del marisqueo a pie (más incontrolado que el de Doñana) también está autorizado el marisqueo desde barco con rastro remolcado.

Periodo de estudio

Los muestreos se realizaron en dos ocasiones en diferentes épocas del año, en cada una de las poblaciones seleccionadas, entre los años 2011-2014, y en el caso de Isla Canela y Doñana para el estudio de la variabilidad interanual se realizaron muestreos en el mes de julio de los años 2011, 2012 y 2014.

Métodos de muestreo

Las coquinas se colectaron de diferentes formas, tanto manualmente como por medio de rastros tradicionales (por mariscadores contratados a tal efecto), o mediante compras en lonjas y mercados cuando no era posible la obtención mediante muestreo directo. Una vez obtenidas, las coquinas era congeladas a -20°C y posteriormente, una vez

descongeladas, eran abiertas y conservadas en etanol absoluto.

En el caso de las poblaciones de Isla Canela y Doñana, las muestras se tomaron en el intermareal a dos profundidades distintas (50 y 120 cm), en 3 puntos diferentes de cada playa (Figura 1) por medio de rastro tradicional, a pie. En cada lance se arrastraban 50 metros, el total de la muestra obtenida era pesada para obtener los datos de densidad y una submuestra de 100 individuos eran medidos y pesados individualmente.

Métodos moleculares

Determinación de la diversidad genética. Este estudio se hizo por medio de análisis de microsatélites. Se implementó un protocolo de enriquecimiento y piro-secuenciación masiva utilizando la plataforma 454 Life Sciences/Roche GS-FLX Genome Sequence System (Roche Applied Science). ADN de alto peso molecular de la especie, extraído utilizando el DNeasy Blood & Tissue Kit de QIAGEN, fue utilizado para el enriquecimiento de microsatélites a partir del ADN genómico con el método ISSR-PCR. Las secuencias de ADN obtenidas fueron ensambladas utilizando el programa bioinformático ContigExpress componente del Vector NTI software package (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Todas las secuencias menores de 100 pares de bases fueron descartadas ya que estas pueden complicar el diseño posterior de cebadores.

Para la detección de microsatélites se utilizó el programa bioinformático Msatfinder (www.genomics.ceh.ac.uk/msatfinder). Los resultados fueron exportados a una hoja de cálculo de Excel. Para el diseño de cebadores, se eligieron únicamente aquellas secuencias de di- y tri-nucleótidos con 10 o más repeticiones continuas. Estas fueron analizadas utilizando el programa bioinformático online Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) seleccionando entre corchetes la secuencia del microsatélite para obtener cebadores adyacentes a ambos lados de la misma.

Posteriormente se sintetizaron 40 pares de cebadores, incorporando el cebador universal de M13 en la terminal 5' del cebador directo para su análisis posterior con fluorescencia. Inicialmente se utilizaron 8 individuos para las amplificaciones de PCR que se llevaron a cabo en reacciones estándar a una temperatura de acoplamiento entre 56 y 58°C incorporando directamente el cebador 5'6FAM™M131. Los amplicones fueron analizados en el ABI 3130x Genetic Analyzer (<http://www.appliedbiosystems.com/>) utilizando el marcador de peso molecular 600 LIZ® Size Standard v2.0. De esta manera se identificaron 21 loci de microsatélites polimorfos (Tabla 1) utilizando el programa bioinformático GeneMapper® Software Version 4.0 (<http://www.appliedbiosystems.com/>). Posteriormente se analizaron 48 individuos para determinar el rango de tamaño de los alelos de cada locus y se definieron las combinaciones de loci para su amplificación en reacciones de PCR en multiplex. Finalmente se sintetizaron los cebadores directos de



Figura 1. Puntos de muestreo de coquinas en el Golfo de Cádiz. A) playa del Parque Nacional de Doñana; B) playa de Isla Canela.
Figure 1. Wedge clams' sampling points in the Gulf of Cadiz. A) Doñana National Park beach; B) Isla Canela beach.

locus ID	Flouro	Nº P	Cebador directo	Cebador inverso	SSR	[C]	NA	Rango	H _o	H _e	CIP	FAN	GenBank
<i>D.tnu2</i>	6-FAM	4	AITCTCCTACGGAGGGGCTA	GGGATGATTTCTCCGTA	(ACA)	3.0	15	97-148	0.621	0.846	0.827	0.144	HG792255.1
<i>D.tnu4</i>	6-FAM	3	TGCACTATAATAACCGGAAG	CTTCCAGCAACACCCGTC	(TG)	3.5	12	151-177	0.436	0.841	0.707	0.153	HG792256.1
<i>D.tnu6</i>	PET	3	GTTTTCTCACAGCGTTTCG	GCAAGTATAGGGTTAAGTATTG	(CA)	3.5	23	55-119	0.647	0.908	0.171	0.163	HG792257.1
<i>D.tnu8</i>	PET	4	AATAATTCAGGCTGGTAGG	TAAATTTGCCATCGTGCGAG	(ATC)	3.0	11	127-157	0.570	0.796	0.766	0.163	HG792258.1
<i>D.tnu11</i>	6-FAM	2	AGAACCTGATGCTGTGGA	CACGTTAGTACAAGACCTTCC	(GT)	1.0	19	109-145	0.533	0.756	0.739	0.184	HG792259.1
<i>D.tnu14</i>	NED	4	TTTTTGTTCTTGAATGTCAA	TGCGCACTTTTGTGTGT	(CAA)	3.0	11	75-129	0.156	0.546	0.517	0.570	HG792260.1
<i>D.tnu15</i>	6-FAM	1	TGTCACTAAIACAGGATTTCTACG	AATAGCATCTCACACAGACACA	(AC)	5.0	26	219-279	0.596	0.931	0.924	0.217	HG792261.1
<i>D.tnu16</i>	VIC	3	TGCTCTTATCAITTCATTTG	TCCAAACCATCTCTGTGTT	(AC)	4.5	21	70-116	0.841	0.901	0.889	0.033	HG792262.1
<i>D.tnu19</i>	VIC	1	AACACCCATAGCGACGAAA	GATGACCTGTGAATACATGAAGGA	(AC)	1.5	20	126-166	0.739	0.936	0.929	0.116	HG792263.1
<i>D.tnu22</i>	PET	1	TGAAGACATGGCAAAATCCA	TGAGCAATTTCTCTTCGTAGG	(TTG)	3.0	8	218-245	0.243	0.696	0.642	0.482	HG792264.1
<i>D.tnu23</i>	NED	1	CAAGCAGTTAGACAAAGTCC	ACCTGATGTGTTGTGGACGA	(AC)	1.0	24	105-167	0.686	0.834	0.820	0.103	HG792265.1
<i>D.tnu26</i>	NED	2	TGAGGTAATTAGATGGTCCAG	ACCTGGCATGTTCTCTAT	(AG)	0.8	23	55-119	0.651	0.916	0.907	0.167	HG792266.1
<i>D.tnu29</i>	VIC	2	TGAATTTAGTAGTGGCAAAGCTA	ACGGTGGCATCAAACTTGA	(TGT)	4.0	19	262-322	0.304	0.887	0.873	0.492	HG792268.1
<i>D.tnu32</i>	VIC	4	CCGAATGCCCHTTTGTGT	TGGGTCTGGAGGGTAAAT	(TTG)	3.0	15	211-278	0.285	0.690	0.668	0.425	HG792271.1
<i>D.tnu40</i>	PET	1	GACATTAAGGAGTGGTGGGTA	CATCAACCGAAAACCTATAAACTG	(TG)	1.0	17	119-157	0.582	0.880	0.867	0.201	HG792273.1
<i>D.tnu49</i>	NED	4	GAGTATTTCAACGGTCTCAAGTTAT	GCATTTACTTATGCTGTTGTC	(CA)	3.0	10	148-176	0.197	0.778	0.741	0.598	HG792275.1

los *loci* polimorfos añadiendo en la terminal 5' los marcadores fluorescentes 6FAM™, VIC®, NED™ y PET® para el análisis de frecuencias alélicas en las diferentes poblaciones.

Una vez optimizadas las condiciones de multiplex, se amplificaron un total 86 individuos de Isla Canela y de Doñana para establecer la variación en los 21 *loci* microsatélites polimórficos seleccionados. Varios pasos se tomaron para garantizar la coherencia y exactitud del análisis en el genotipado. El tamaño inicial de los alelos, obtenido a partir de los genotipos de las 48 muestras utilizadas en las amplificaciones de PCR simplex para cada locus, fue determinado y anotado en una primera tabla de genotipos. Esta tabla consistió en determinar los intervalos de tamaño observados para cada alelo y en cada locus utilizando el software GeneMapper®. La tabla se refinó con el mismo conjunto de muestras pero la segunda vez utilizando el genotipo obtenido en reacciones múltiplex y posteriormente determinando manualmente el tamaño de cada muestra de acuerdo con el rango de la puntuación original. Posteriormente, cualquier muestra con un valor de tamaño, en pares de bases, más allá del rango establecido se volvió a analizar. Con el fin de asegurar la calibración del genotipado para cada conjunto de muestras analizadas, se incluyeron siempre los 6 mismos individuos en cada placa como patrones de referencia. Una primera estimación de la tasa de error se obtuvo contando los desajustes sobre la base de los seis controles positivos repetidos 4 veces en cada panel multiplex, dando lugar a 24 repeticiones. Una segunda estimación de la tasa de error se obtuvo comparando las puntuaciones de ambos anotadores. Para cada marcador, el número total

Tabla 1. Características de los 16 marcadores microsatélites desarrollados y optimizados para múltiplex. Se utilizaron 150 individuos en este análisis. Identidad del Locus, tipo de tinte de fluorescencia en el cebador directo, (NºP) los números del panel indican *loci* que comparten un multiplex en la reacción de PCR, secuencias de cebador, (SSR) motivo de repetición, [C] concentraciones de cebador (µM) en la mezcla de cebadores, (NA) número de alelos encontrados, (Rango) gama de tamaños de los alelos, (H_o) heterocigosidades observadas y (H_e) heterocigosidades esperadas, (CIP) contenido de información polimórfica, (FAN) Frecuencia de alelos nulos, y números de acceso en GenBank. Las temperaturas de alineamiento para cada grupo fueron: Kit 5= 61°C, Kit 3= 60°C, Kits 1, 2, 4 y 7= 58°C, Kits 6 y 8= 54°C.

de alelos (NA), la heterocigosidad observada (Ho) y esperada (HE), el contenido de información de polimorfismo (PIC) y la frecuencia de alelos nulos (NAF) se determinaron utilizando el programa CERVUS 3,0 3. Se efectuaron también las pruebas de equilibrio de ligamiento y de Hardy-Weinberg por el método de la cadena de Markov utilizando 100.000 pasos de memorización (Tabla 2). Los resultados mostraron un déficit de heterocigotos importante en todos los loci analizados.

Análisis morfométrico de las conchas

Se ha examinado la morfometría de las valvas para tratar de establecer si existen diferencias morfológicas entre las conchas de los individuos puros de *D. trunculus* y de aquellos que posiblemente son híbridos de esta especie con *D. variegatus* y/o *D. vittatus*. Para ello, con ayuda de un calibre digital (TesaCal IP65) se les hicieron diferentes medidas (representadas en la Figura 2) a las conchas de los individuos caracterizados genéticamente de 3 de las localidades estudiadas, dos del Golfo de Cádiz (Isla Canela y Doñana) y una del Mediterráneo (Cabo de Gata).

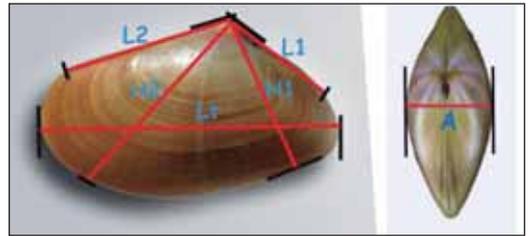


Figura 2. Representación de las diferentes medidas tomadas a las coquinas para su estudio morfométrico. A, anchura máxima existente entre ambas valvas. Lt, distancia anteroposterior máxima de las valvas. L1, distancia entre el umbo y el inicio del truncamiento del borde posterodorsal. L2, distancia entre el umbo y el inicio de la zona curvada anterior del borde dorsal de la concha. H1, distancia entre el umbo y el margen ventral, medida en ángulo recto con una hipotética línea paralela al borde anterodorsal de las valvas. H2, distancia entre el umbo y el margen ventral, medida en ángulo recto con una hipotética línea paralela al borde posterodorsal de las valvas.

Figure 2. Representation of the different measurements taken in the wedge clams for the morphometric study. A maximum width between both valves. Lt, maximum anteroposterior distance of the valves. L1, distance between the umbo and the initial part of the posterodorsal edge truncation. L2, distance between umbo and the initial part of the anterior curved portion of the dorsal edge of the shell. H1, distance between the umbo and the ventral edge, measured as right angle respect to a hypothetical line parallel to anterodorsal edge of the valves. H2, distance between the umbo and the ventral edge, measured as right angle respect to a hypothetical line parallel to posterodorsal edge of the valves.

a)					b)				
Locus	N	H _O	H _E	P	Locus	N	H _O	H _E	P
<i>D.tru2</i>	85	0.68235	0.82443	0.00000	<i>D.tru2</i>	86	0.59302	0.86890	0.00000
<i>D.tru4</i>	83	0.75904	0.70675	0.59591	<i>D.tru4</i>	84	0.85714	0.75264	0.03710
<i>D.tru6</i>	85	0.55294	0.91124	0.00000	<i>D.tru6</i>	86	0.69767	0.91867	0.00000
<i>D.tru8</i>	85	0.55294	0.79478	0.00000	<i>D.tru8</i>	80	0.56250	0.78176	0.00000
<i>D.tru11</i>	86	0.53488	0.75439	0.00000	<i>D.tru11</i>	86	0.52326	0.77832	0.00000
<i>D.tru14</i>	86	0.32558	0.68380	0.00000	<i>D.tru14</i>	86	0.10465	0.46110	0.00000
<i>D.tru15</i>	86	0.56977	0.92928	0.00000	<i>D.tru15</i>	85	0.60000	0.93254	0.00000
<i>D.tru16</i>	85	0.83529	0.91458	0.00350	<i>D.tru16</i>	85	0.85882	0.89878	0.00598
<i>D.tru19</i>	86	0.72093	0.93615	0.00000	<i>D.tru19</i>	86	0.73256	0.93200	0.00000
<i>D.tru22</i>	86	0.30233	0.72719	0.00000	<i>D.tru22</i>	86	0.20930	0.63627	0.00000
<i>D.tru23</i>	86	0.68605	0.83286	0.00071	<i>D.tru23</i>	86	0.72093	0.85278	0.00710
<i>D.tru26</i>	86	0.55814	0.91106	0.00000	<i>D.tru26</i>	85	0.70588	0.91793	0.00000
<i>D.tru29</i>	86	0.27907	0.88467	0.00000	<i>D.tru29</i>	86	0.36047	0.90058	0.00000
<i>D.tru32</i>	84	0.34524	0.73318	0.00000	<i>D.tru32</i>	84	0.26190	0.59160	0.00000
<i>D.tru40</i>	86	0.46512	0.87019	0.00000	<i>D.tru40</i>	86	0.68605	0.87780	0.00000
<i>D.tru49</i>	86	0.20930	0.76901	0.00000	<i>D.tru49</i>	86	0.22093	0.76771	0.00000

Tabla 2. Heterocigosidad observada (H_O) y esperada (H_E) y (P) probabilidad de desviación de equilibrio de Hardy-Weinberg para las muestras colectadas (N = número de individuos genotipados) en: a) Playa del Parque Nacional de Doñana y b) playa de Isla Canela.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estimación del tamaño poblacional de coquinas de 2 localidades del Golfo de Cádiz

A fin de estimar la variabilidad interanual de las poblaciones de *Donax trunculus* se obtuvieron muestras de dos localidades (Isla Canela y Doñana) en los mismos 3 puntos en los meses de julio de 2011, 2012 y 2014 (Figura 1).

Con las muestras de 2011 de Isla Canela y Doñana se estimaron densidades, y se tomaron datos de tallas y pesos, en los 3 puntos de cada una de las localidades. Aunque con diferencias según los puntos, las densidades medias son similares: Isla Canela, 26,52 indiv./m² (rango: 0,23-65,36) y Doñana, 24,68 indiv./m² (rango: 11,55-38,32). Sin embargo se observaron grandes diferencias en los pesos medios, siendo los ejemplares de Doñana significativamente mayores: Isla Canela 1,15 g./indiv. (rango: 0,83-1,34) y Doñana 1,83 g./indiv. (rango: 1,44-2,60). Esto permite ver unas primeras diferencias entre ambas poblaciones (Figuras 3 y 4), probablemente en función del grado de explotación de las mismas.

En 2012, se volvieron a estimar la densidad y tamaño de los ejemplares en los mismos tres puntos de muestreo en las playas de Isla Canela y Doñana. En esta ocasión, la densidad promedio de *D. trunculus* fue ligeramente superior en Doñana 15,1 individuos/m² (11,8-20,1) que en Isla Canela 9,9 indiv./m² (0,4-20,7), siendo ambas inferiores a las estimadas en el verano de 2011 (24,7 y 26,5 indiv./m², respectivamente). De igual forma, la talla media de las coquinas en Doñana (26,1 mm, rango: 23,9-27,2 mm) fue superior a las de Isla Canela (22,7 mm, rango: 21,5-25,5 mm), siendo globalmente el 64% de las coquinas recolectadas en Doñana de tamaño comercial y solo el 22 % en Isla Canela.

En el año 2014 se recolectaron de nuevo ejemplares de *Donax trunculus* en los mismos 3 puntos de la playa de Doñana y de Isla Canela. En este caso se mantenían las diferencias entre las dos playas, pero de nuevo con una bajada, ahora más fuerte, de la densidad promedio, siendo de 9,5 indiv./m² en Doñana y de tan solo 1,7 indiv./m² en Isla Canela. Sin embargo, frente a estos valores mínimos de densidad se han registrado en esta ocasión los mayores de pesos y tallas, de todo el periodo estudiado. El peso medio en Isla Canela fue de 1,96 g./indiv. y de 2,44 g./indiv. en Doñana, y las ta-

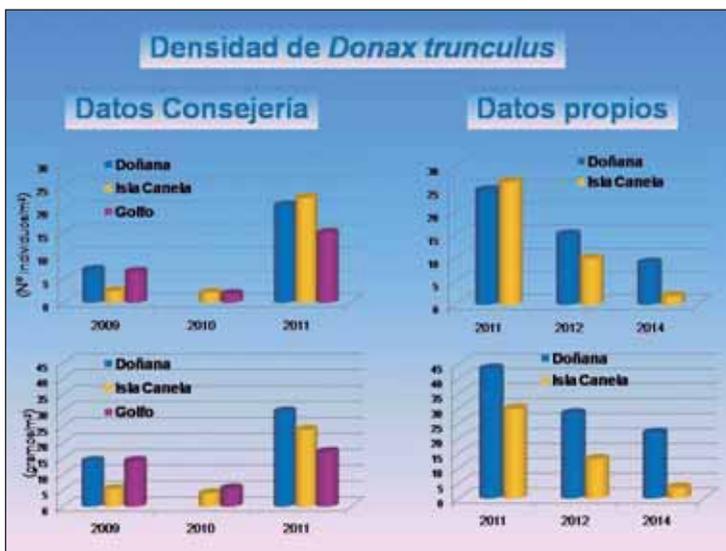


Figura 3. Densidades de coquinas en Doñana, Isla Canela y Golfo de Cádiz en N° de individuos por m² (superior) y en gramos por m² (inferior), en el periodo 2009-2014.

Figure 3. Densities of wedge clams in Doñana, Isla Canela and Gulf of Cadiz. As number of individuals per m² (upper), and grams per m² (bottom), in the period 2009-2014.

llas de 24,5 mm (rango: 15,48-31,87 m) y 26,2 mm (rango: 18,9-36,73 mm) en Isla Canela y Doñana, respectivamente.

Es decir, al igual que pasaba en 2012, se observa una mayor densidad, y mayores tallas y pesos en la playa de Doñana, donde solo se permite la explotación de la especie de una forma sostenible, mariscando con rastro a pie en la playa, y con un límite en el número de kilos por mariscador y día.

Es interesante destacar que un estudio reciente en Australia sobre las diferencias entre las poblaciones de otra especie de coquina, *Donax deltoides* Lamarck, 1818, de playas donde son pescadas y otras donde no se pescan, sólo mostraron diferencias en densidad (menor en la playa explotada), pero no en la talla (GRAY, 2016).

En general se observa, en el periodo de estudio (2011-2014), una tendencia hacía una menor densidad de coquinas, con un fuerte descenso de estos valores, desde una densidad media en 2011 de 26,52 indiv./m² hasta los 5,6 indiv./m² del año 2014. Aún siendo preocupante, se puede observar que este dato es muy variable, y que justamente antes del año 2011 se había

registrado un periodo (2009-2010) en el que también los valores de densidad fueron muy bajos (Figura 3).

Es también de destacar las mayores tallas registradas en el año 2014, claramente superiores a las de años precedentes. Una posible explicación podría estar en el hecho de que antes del muestreo de julio de 2014 en la playa de Doñana estuvo prohibido el marisqueo durante 4-5 meses (por la presencia en los análisis de algas tóxicas), y quizás ese largo periodo en el que no se estuvo mariscando permitió un mayor crecimiento de los ejemplares, sin sufrir los efectos de la pesca que se concentra en extraer las mayores tallas (las comerciales, por encima de los 25 mm).

Gracias a un acuerdo con la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, se tuvo acceso a sus datos de estimaciones de densidad de población y tamaños, colectados en la misma zona pero utilizando rastros operados desde embarcaciones comerciales. El objetivo era comparar las densidades y tamaños obtenidos con diferentes métodos de muestreo en la misma zona. Los resultados no mostraron diferencias entre ambos métodos en el año 2011 que es para el que se tienen datos por las dos vías (Figura 3).

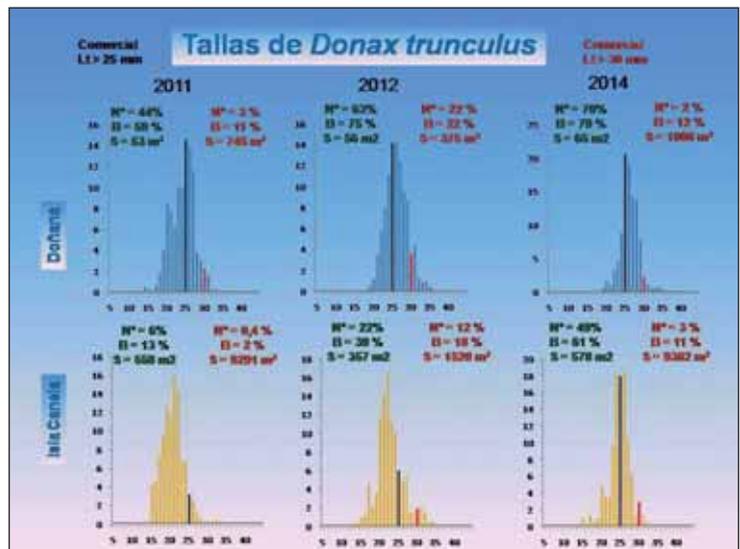


Figura 4. Tamaño medio (en mm) de las coquinas colectadas en Doñana y en Isla Canela en los meses de julio de los años 2011, 2012 y 2014.

Figure 4. Average size (in mm) of wedge clams collected in Doñana and Isla Canela in July of 2011, 2012 and 2014.

Determinación de la diversidad genética de la población de coquinas del Golfo de Cádiz

De los 21 *loci* inicialmente identificados y caracterizados para esta especie solamente 16 resultaron ser diploides y co-dominantes y por lo tanto informativos en este estudio. Los *loci* D.tru 28, 30, 31, 39 y 46 se encuentran en copias múltiples en el genoma de la especie ya que los amplicones que se obtienen representan en la mayoría de los individuos más de dos alelos por lo que estos cinco *loci* tendrán que ser eliminados del análisis posterior. No obstante se lograron optimizar un total de 16 *loci* polimórficos. Posteriormente se procedió al genotipado de las muestras colectadas en Doñana e Isla Canela en 2011 con estos *loci* y se determinó el índice de fijación entre ambas poblaciones usando el programa Arlequín V 3,54. El análisis demostró que no existe diferenciación genética entre ambas localidades ($F_{ST}=0.00231$) por lo que las muestras colectadas en estos sitios fueron consideradas una sola población en análisis posteriores.

Los análisis iniciales mostraron un elevado déficit de heterocigotos para todas las poblaciones y todos los *loci* y algunos individuos no amplificaron en absoluto para uno o varios *loci*. Este resultado podría deberse simplemente a problemas técnicos, como la eficiencia de amplificación por PCR de la muestra debido a la integridad del ADN o a alelos nulos (Tabla 2).

Determinación de la diversidad, estructura y conectividad genética de las poblaciones de coquina de las costas españolas

Se procedió al análisis de un total de 514 individuos colectados en las 7 localidades muestreadas a lo largo del litoral Atlántico y Mediterráneo español con los 16 *loci* codominantes. Los análisis mostraron una vez más, un elevado déficit de heterocigotos en 15 de 16 *loci*.

Las desviaciones de equilibrio de Hardy-Weinberg en bivalvos, incluyendo *D. trunculus*, se ha reportado en varios estudios (LAUNEY *et al.* 2002; ARIAS-PÉREZ *et al.* 2012; NANTON *et al.* 2014). En este caso puede deberse a más de una causa, por un lado la presencia de alelos nulos en los *loci* de microsatélites desarrollados para esta especie, y por otro el efecto de Wahlund.

Los alelos nulos son causados por mutaciones en el sitio de hibridación del cebador lo que impide la amplificación por PCR de los alelos afectados por lo que se diseñaron cebadores nuevos en 5 *loci* donde la secuencia adyacente al microsatélite lo permitió. La presencia de alelos nulos crea falsos homocigotos y aumenta los niveles estimados de homocigosidad. La presencia de alelos nulos es muy común en bivalvos y recientemente se reportó en 10 de 19 *loci* de microsatélites en *D. trunculus* (NANTON *et al.* 2014). En cualquier

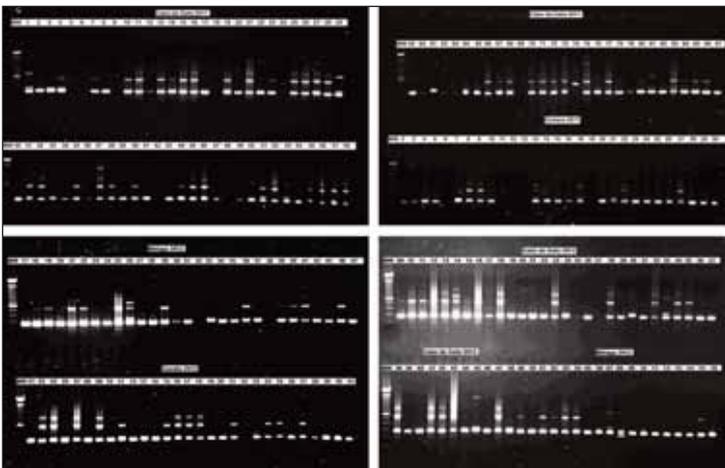


Figura 5. Electrogramas de los fragmentos de ADN amplificados con el marcador ITS 5S rADN en muestras de coquina de Cabo de Gata, Doñana, Caleta de Vélez (Málaga) y Gandía tanto de 2011 como de 2012.

Figure 5. Electropherograms of the DNA fragments amplified with the 5S rDNA ITS marker of wedge clams samples from Cabo de Gata, Doñana, Caleta de Vélez (Málaga) and Gandía, both 2011 and 2012 years.

caso, ni los alelos nulos ni los problemas de amplificación explican por sí solos los déficits de heterocigotos encontrados. Por ello, en un siguiente paso, se utilizó otro marcador genético que permitiera confirmar la identidad de los ejemplares que se estaban estudiando, dado que en la misma zona de estudio se podían encontrar otras especies congénéricas no siempre fáciles de diferenciar en base a su morfología, como *D. semistriatus*, *D. vittatus* y *D. variegatus*. Se optó por un marcador nuclear, el "internal transcribed spacer" ITS 5S rADN, que de acuerdo con PEREIRA *et al.* (2012) permite distinguir *D. trunculus* de las otras especies ya que el ITS de *D. trunculus* es de 275-300 pares de bases aproximadamente, mientras que el de *D. variegatus* es de aproximadamente 450 pb y los de otras dos especies es cercano a los a 500 pb.

Con el fin de determinar si las muestras de coquinas colectadas consistían en una mezcla de individuos de más de una especie, lo cual explicaría sin lugar a dudas los niveles de heterocigotos encontrados, se amplificó la totalidad de muestras

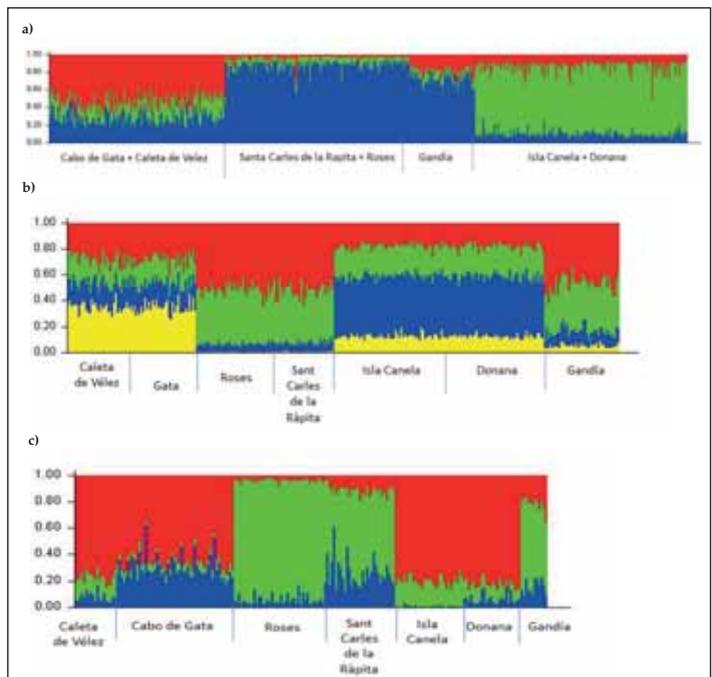
utilizando el marcador molecular desarrollado por PEREIRA *et al.* (2012). Los resultados mostraron un hallazgo completamente inesperado y nunca antes reportado en la literatura científica para el género *Donax*. La especie de coquina *Donax trunculus*, tal y como se comercializa en España, bajo ese nombre, es en realidad una mezcla de un especie híbrida, con al menos *D. variegatus* y posiblemente también con *D. vittatus* (Figura 5), y de individuos puros de *D. trunculus*.

Como se puede apreciar con claridad en la Figura 5 hay una proporción importante de individuos que amplifican simultáneamente el ITS de *D. trunculus* y al menos el de *D. variegatus* aunque en algunos casos se puede identificar un fragmento adicional cuyo origen y secuencia queda aún por determinar. El porcentaje de individuos puros de un año a otro es muy similar en cada localidad pero existe una gran variación entre localidades.

Una vez demostrada la presencia de poblaciones genéticamente distintas en cada localidad, en este caso de individuos puros e híbridos, se debe

Figura 6. Análisis de agrupación de la estructura genética entre las poblaciones del Golfo de Cádiz y el Mediterráneo español teniendo en cuenta la información sobre la población de origen. Los individuos se representan en forma de barras verticales, donde la cantidad de cada color indica la proporción de cada grupo inferido. **a)** representa el análisis de todos los individuos, **b)** el de los no híbridos y **c)** el de los híbridos.

Figure 6. Cluster analysis of the genetic structure between populations of the Gulf of Cadiz and Spanish Mediterranean, taking into account information from the source population. Individuals are represented as vertical bars, where the amount of each color indicates the proportion of each inferred group. **a)** analysis of all individuals, **b)** only of non-hybrids, and **c)** only of the hybrids.



probar la hipótesis del efecto Whalund (reducción de heterocigosidad en una población causado por la estructura de la subpoblación) utilizando para ello el modelo de mezcla de poblaciones del programa bioinformático STRUCTURE (EVANNO *et al.* 2005), población por población en Doñana, Málaga e Isla Canela. A saber, si dos o más subpoblaciones tienen diferentes frecuencias alélicas y son colectadas simultáneamente, entonces la heterocigosidad total se reduce, aunque las subpoblaciones estén en Equilibrio de Hardy-Weinberg y su presencia es revelada mediante el análisis de *admixture*. Realizamos diez simulaciones independientes de $K = 1$ a 3 y el resultado fue invariablemente un escenario en el cual es más probable que nos encontremos ante dos poblaciones ($K=2$) confirmando así la presencia de especies híbridas.

Pese a la presencia de especies híbridas en las muestras se analizó la estructura genética detectada por los microsatélites desarrollados en este estudio mediante la prueba de hipótesis biogeográficas establecidas a partir de estudios anteriores. Varios estudios han determinado para un gran número de organismos marinos que el estrecho de Gibraltar, el frente Almería-Oran y el Frente Balear representan auténticas barreras al flujo génico de especies litorales (PATARNELLO *et al.* 2007; GALARZA *et al.* 2009). Por lo tanto, es de esperar que las muestras de coquina analizadas en este estudio se encuentren divididas en tres zonas biogeográficas bien definidas. Una suratlántica (Doñana-Isla Canela), otra mediterránea al este de Gibraltar (Caleta de Vélez-Cabo de Gata) y una última al noreste del frente Almería-Oran (Gandía-San Carlos de la Rápita-Rosas). El análisis efectuado con el programa bioinformático STRUCTURE demostró de forma concluyente que pese a los déficits de heterocigotos observados a causa de la hibridación de especies de coquinas, los microsatélites desarrollados en este estudio tienen el poder de resolución suficiente para diferenciar claramente las zonas biogeográficas reconocidas en la literatura para muchas otras especies marinas (Figura 6).

La estructura genética de estas poblaciones indica por tanto un cierto grado de aislamiento entre las

3 zonas biogeográficas ya señaladas. Considerando el estado en que se encuentran muchas de estas poblaciones, y que incluso hay zonas donde ya no se pescan (por ejemplo en la zona de Almería), se podrían plantear planes de repoblación. En dicho caso estas repoblaciones deberían realizarse con ejemplares de la misma unidad poblacional. Los resultados de este estudio muestran claramente la delimitación de zonas biogeográficas, con lo cual todo esfuerzo de repoblación debería tomar en cuenta estos datos.

Desafortunadamente ha sido imposible obtener resultados fiables sobre el tamaño efectivo (N_e) de las poblaciones debido a los problemas técnicos causados tanto por alelos nulos como por la presencia de individuos híbridos. Los alelos nulos tienden a aumentar artificialmente diferenciación genética y por lo tanto disminuir las estimaciones del tamaño efectivo de la población. Además los alelos nulos también tienden a disminuir artificialmente el desequilibrio de ligación y por lo tanto a disminuir la estimación del tamaño efectivo de la población basada en el método de "linkage disequilibrium" implementado en los diferentes programas utilizados para realizar este cálculo. En consecuencia, no es recomendable estimar dicho parámetro ya que difícilmente se corresponderá con la realidad.

Análisis morfométrico de las conchas

Los valores de las medidas realizadas en las tres poblaciones consideradas (Isla Canela, Doñana y Cabo de Gata) fueron utilizados para realizar análisis discriminantes a fin de establecer si existe un conjunto de variables que permita discriminar por la morfologías las conchas de los individuos de unas y otras poblaciones (morfología ligada al hábitat) y si, dentro de cada población, hay variables que permiten separar los individuos de *Donax trunculus* de aquellos que, de acuerdo con el análisis genético, parecen ser híbridos de *D. trunculus* x *D. variegatus* y/o *D. vittatus*.

Para evitar que el tamaño de los ejemplares sea un componente de la discriminación, las variables

utilizadas en el análisis discriminante son el cociente entre cada variable y la longitud total de las valvas. Es decir, A/Lt, L1/Lt, L2/Lt, H1/Lt y H2/Lt.

Cuando se analizan el total de los individuos de las tres localidades, se obtuvieron como resultado funciones discriminantes estadísticamente significativas ($P < 0,01$) que incluían las variables A/Lt, L1/Lt y H2/Lt:

$$F1: 0,240 A/Lt + 0,178 L1/Lt + 0,892 H2/Lt$$

$$F2: 0,604 A/Lt + 0,725 L1/Lt - 0,469 H2/Lt$$

Estas funciones clasifican en conjunto correctamente al 72% de los individuos de acuerdo con el reparto por localidades que se muestra en la Tabla 3.

En el caso de los individuos de cada población se encontró una única función de discriminación significativa ($P < 0,05$) entre individuos puros e híbridos que en el caso de Isla Canela incluye sólo a la variable L2/Lt (clasifica al 62%), en el de Doñana a las variables L1/Lt y H1/Lt (clasifica al 72%) y en el de Cabo de Gata a la variable L1/Lt (clasifica al 62%); para cada caso el reparto por tipos se muestra en la Tabla 4.

Estos resultados sugieren la existencia de ciertos cambios morfológicos en las cochas de los ejemplares examinados de *Donax trunculus*, tanto en relación a la localidad en que han sido capturados como a que se trate de individuos puros o híbridos (según los análisis genéticos). Sin embargo, el grado de discriminación es moderado/bajo y, desde el punto de vista práctico, no permite una separación eficiente de los individuos.

	Actual	Predicho		
Localidad	Nº indiv.	Cabo Gata	Doñana	Isla Canela
Cabo Gata	79	59 (75%)	8 (10%)	12 (15%)
Doñana	68	3 (4%)	50 (74%)	15 (22%)
Isla Canela	69	17 (24%)	6 (9%)	46 (67%)

Tabla 3. Identificación de los individuos por localidades según los correspondientes análisis discriminantes.

	Actual	Predicho	
Tipo		Híbridos	D. trunculus
Isla Canela			
Híbridos	25	17 (68%)	8 (32%)
D. trunculus	44	18 (41%)	26 (59%)
Doñana			
Híbridos	26	19 (73%)	7 (27%)
D. trunculus	42	12 (29%)	30 (71%)
Cabo de Gata			
Híbridos	54	34 (63%)	20 (37%)
D. trunculus	23	9 (39%)	14 (61%)

Tabla 4. Identificación de los individuos puros e híbridos, por cada localidad, según los correspondientes análisis discriminantes.

CONCLUSIONES

La gestión de la actividad marisquera en la playa del Parque Nacional de Doñana es la adecuada y permite una pesca sostenible del recurso. Las poblaciones de coquina explotadas comercialmente en España, bajo la denominación de la especie *Donax trunculus*, están formadas en realidad por una mezcla de *D. trunculus* e híbridos con otras especies. La hibridación ocurre con, al menos *D. variegatus* y posiblemente también con *D. vittatus*. La diversidad genética encontrada tanto en individuos puros como híbridos sugiere que no ha habido ningún cuello de botella reciente en ninguna de las localidades muestreadas. Las localidades de las costas de Doñana y zonas adyacentes (sur-Atlántico español) pertenecen a una sola población genéticamente homogénea y diferenciada de las existentes en el resto de la costa española. Es decir, es una población que recibirá pocos individuos de las poblaciones adyacentes y debe gestionarse con suma cautela. En este estudio se han detectado 4 poblaciones, con un reducido flujo genético entre ellas: (1) Atlántico Norte (Cantábrico), (2) Atlántico Sur (Doñana-Isla Canela), (3) costa del Mar de Alborán,

entre Gibraltar y Cabo de Gata (Caleta de Vélez-Cabo de Gata) y (4) entre Cabo de Gata y Golfo de Rosas (Gandía-San Carlos de la Rápita-Rosas). Dado el aislamiento genético entre dichas poblaciones es recomendable gestionarlas de forma independiente.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer en primer lugar al Organismo Autónomo Parques Nacionales por la concesión del proyecto que permitió el presente estudio. A la oficina de coordinación del Parque Nacional de Doñana por las facilidades prestadas para los muestreos en la playa de Doñana. Nuestro agradecimiento también a Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía por compartir sus datos sobre la densidad de coquinas en el Golfo de Cádiz y facilitar los permisos de pesca en los diferentes puntos de Andalucía. Y como no, gracias también a los mariscadores y pescadores de Sanlúcar de Barrameda (Cádiz) y de Cabo de Gata (Almería) que nos acompañaron en los diferentes muestreos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSELL, A.D. & LAGARDÉRE, F. 1980. Observations on the biology of *Donax trunculus* and *D. vittatus* at Ile d'Oléron (French Atlantic coast). *Marine Biology* 57: 241-337.
- ARIAS-PEREZ, A., FERNANDEZ-TAJES, J., GASPAS, M. B. & MENDEZ, J. 2012. Isolation of microsatellite markers and analysis of genetic diversity among East Atlantic populations of the sword razor shell *Ensis siliqua*: A tool for population management. *Biochemical Genetics* 50: 397-415.
- ARNASON, E. 2004. Mitochondrial cytochrome b DNA variation in the high-fecundity Atlantic cod: Trans-atlantic clines and shallow gene genealogy. *Genetics* 166: 1871-1885.
- COBOS GARCÍA, D., AGUILAR PEREA, M & MARCO MIRALLAS, J. 2002. Estudio de la incidencia del marisqueo en la playa del Parque Nacional de Doñana. Propuestas para la regulación del aprovechamiento. Empresa Pública para el Desarrollo Agrario y Pesquero de Andalucía S.A. (DAP). Informe Técnico.
- COMPTON, T.J., RIJKENBERG, M.J.A., DRENT, J. & PIERSMA, T. 2007. Thermal tolerance ranges and climate variability: A comparison between bivalves from differing climates. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352: 200-211.
- DE LA HUZ, R., LASTRA, M. & LÓPEZ, J. 2002. The influence of sediment grain size on borrowing, growth and metabolism of *Donax trunculus* L. (Bivalvia, Donacinae). *Journal of Sea Research* 47: 85-95.
- EVANNO, G., REGNAUT, S. & GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.

- FAUVELO, C., BERNARDI, G. & PLANES, S. 2003. Reductions in the mitochondrial DNA diversity of coral reef fish provide evidence of population bottlenecks resulting from Holocene sea-level change. *Evolution* 57: 1571-1583.
- GALARZA, J.A., CARRERAS-CARBONELL, J., MACPHERSON, E., PASCUAL, M., ROQUES, S., TURNER, G. & RICO, C. 2009. The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 1473-1478.
- GRANT, W.S., GARCIA-MARIN, J.L. & UTTER, F. 1999. Biological Units in Fisheries Management. En: Mustafa S. (ed.) *Genetics in Sustainable Fisheries Management*, pp. 25-27. Fishing News Books, Oxford.
- GRAY, C.A. 2016. Assessment of spatial fishing closures on beach clams. *Global Ecology and Conservation* 5: 108-117.
- HAUSER, L., WAPLES, R.S. & CARVALHO, G.R. 2008. Special Issue: Advances in Marine Fish and Fisheries Genetics. *Fish and Fisheries* 9: 331-332.
- HOARAU, G., BOON, E., JONGMA, D.N., FERBER, S., PALSSON, J., VAN DER VEER, H.W., RIJNSDORP, A.D., STAM, W.T. & OLSEN, J.L. 2005. Low effective population size and evidence for inbreeding in an overexploited flatfish, plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272: 497-503.
- KUHNER, M.K., BEERLI, P., YAMATO, J. & FELSENSTEIN, J. 2000. Usefulness of single nucleotide polymorphism data for estimating population parameters. *Genetics* 156: 439-447.
- KUHNER, M.K., YAMATO, J. & FELSENSTEIN, J. 1995. Estimating effective population-size and mutation-rate from sequence data using Metropolis-Hastings sampling. *Genetics* 140: 1421-1430.
- KUHNER, M.K., YAMATO, J. & FELSENSTEIN, J. 1998. Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. *Genetics* 149: 429-434.
- LASTRA, M., DE LA HUZ, R., SÁNCHEZ-MATA, A.G., RODIL, I.F., AERTS, K., BELOSO, S. & LÓPEZ, J. 2006. Ecology of exposed sandy beaches in northern Spain: Environmental factors controlling macrofauna communities. *Journal of Sea Research* 55: 128-140.
- LAUNEY, S., LEDU, C., BOUDRY, P., BONHOMME, F. & NACIRI-GRAVEN, Y. 2002. Geographic structure in the European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) as revealed by microsatellite polymorphism. *Journal of Heredity* 93: 331-338.
- LAVERY, S., MORITZ, C. & FIELDER, D.R. 1996. Genetic patterns suggest exponential population growth in a declining species. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1106-1113.
- NANTON, A., ARIAS-PEREZ, A., MENDEZ, J. & FREIRE, R. 2014. Characterization of nineteen microsatellite markers and development of multiplex PCRs for the wedge clam *Donax trunculus* (Mollusca: Bivalvia). *Molecular Biology Reports* 41: 5351-5357.
- OVENDEN, J.R., PEEL, D., STREET, R., COURTNEY, A.J., HOYLE, S.D., PEEL, S.L. & PODLICH, H. 2007. The genetic effective and adult census size of an Australian population of tiger prawns (*Penaeus esculentus*). *Molecular Ecology* 16: 127-138.
- PALUMBI, S.R. 2003. Population genetics, demographic connectivity and the design of marine protected areas. *Ecological Applications* 13: 146-158.
- PALUMBI, S.R. 2004. Marine reserves and ocean neighborhoods: The spatial scale of marine populations and their management. *Annual Review of Environment and Resources* 29: 31-68.
- PATARNELLO, T., VOLCKAERT, F.A.M.J. & CASTILHO, R. 2007. Pillars of Hercules: is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology* 16: 4426-4444.
- PEREIRA, A.M., FERNANDEZ-TAJES, J., GASPAS, M.B. & MENDEZ, J. 2012. Identification of the wedge clam *Donax trunculus* by a simple PCR technique. *Food Control* 23: 268-270.
- PÉREZ MARTÍN, M. & RODRÍGUEZ DEL VALLE, F. 2001. Especies de interés pesquero en el litoral de Andalucía. Vol. II Invertebrados. *Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía*.
- SAILLANT, E., PATTON, J.C., ROSS, K.E. & GOLD, J.R. 2004. Conservation genetics and demographic history of the endangered Cape Fear shiner (*Notropis mekistocholas*). *Molecular Ecology* 13: 2947-2958.

- TIRADO, C., RODRÍGUEZ, A., BRUZÓN, M.A., LÓPEZ, J.I., SALAS, C. & MÁRQUEZ, I. 2002. La reproducción de bivalvos y gasterópodos de interés pesquero en Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca (ed.): 43-47. Junta de Andalucía.
- WAPLES, R.S. & DO, C. 2008. LDNE: A program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8: 753-756.
- ZANE, L., MARCATO, S., BARGELLONI, L., BORTOLOTTO, E., PAPETTI, C., SIMONATO, M., VAROTTO, V. & PATARNELLO, T. 2006. Demographic history and population structure of the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum*. *Molecular Ecology* 15: 4499-4511.
- ZARDOYA, R., CASTILHO, R., GRANDE, C, R., FAVRE-KREY, L., CAETANO, S., MARCATO, S., KREY, G. & PATARNELLO, T. 2004. Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and the chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. *Molecular Ecology* 13: 1785-1798.