

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***APLICACIÓN DE UNA BATERÍA DE MARCADORES
MICROSATÉLITE PARA EVALUAR LA DIVERSIDAD GENÉTICA,
ESTRUCTURA POBLACIONAL Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL,
EN MYTILUS CHILENSIS DEL SUR DE CHILE***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado académico de Magister en Alimentos mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos por:

JORGE ANTONIO RUIZ SANDOVAL

Director de tesis: Dra. María Angélica Larraín Barth

Santiago-CHILE

Mayo 2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

JORGE ANTONIO RUIZ SANDOVAL

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Alimentos mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dra. Maria Angélica Larraín Barth

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Elie Poulin

Dr. Federico Winkler

Dr. Nelson Díaz

AGRADECIMIENTOS

El motor de nuestros trabajos no se alimenta sólo del egoísmo humano que nos lleva a satisfacer nuestras propias metas y ambiciones intelectuales; su principal combustible es el apoyo incondicional de quienes nos aman mas allá de un título, posición o nivel, de los que se alegran cuando triunfas y te levantan cuando fracasas, ellos son nuestras familias, amigos, hermanos de la vida y compañeros fieles a prueba de todo.

Agradezco a mis padres por todos los valores entregados en mi crecimiento personal, por todas las atenciones que me dedicaron, por su amor incondicional, por sus esfuerzos sobre humanos por hacer de mí un profesional, por alegrarse de mis triunfos y acompañarme en mis penas y fracasos, por sus palabras de aliento en los momentos precisos.

A mis hermanas Paula y Pamela que siempre han estado conmigo sin su amor y apoyo mi vida no sería la misma, porque siempre han creído en mí, porque me hicieron una buena persona, consecuente con lo que pienso y siento.

A mis sobrinos Florencia, Fernanda y Franco, mis verdaderos amores, esta etapa se las dedico a ellos, y espero que un día en el futuro se sientan orgulloso de su Toto.

Agradezco a Rodrigo que desde que inicie esta etapa ha estado conmigo, independiente de las cosas que han pasado, hasta el día de hoy he tenido su apoyo y me ha animado cada instante para que termine.

A mi directora de tesis María Angélica Larraín por confiar en mis capacidades. Por alentarme a rendir más y a superar las barreras, por su preocupación y sus palabras de aliento en los momentos que más lo necesite.

A mis amigos mas cercanos y cada una de las personas que estuvieron en alguna etapa de la elaboración de esta tesis, muchas gracias de verdad.

Muchas veces quise tirar la toalla y dije “No puedo más, estoy más que aburrido y chato de esto”, pero si no tuviera el apoyo de cada una de estas personas la historia sería distinta y les agradezco de todo corazón.

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	ix
SUMMARY	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 MITILICULTURA EN CHILE	1
1.2 MITILIDOS	3
1.3 CALIDAD DE ALIMENTOS: TRAZABILIDAD	7
1.4 ANALISIS DE ADN, MARCADORES MOLECULARES	10
1.5 MARCADORES MICROSATELITES (SSR)	11
1.6 DIVERDIDAD GENETICA, ESTRUCTURA POBLACIONAL Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL	13
1.7 ASIGNACION DE INDIVIDUOS A LOCALIDADES	16
2. HIPOTESIS, OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS	18
2.1 HIPOTESIS	18
2.2. OBJETIVO GENERAL	18
2.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 OBTENCION, EXTRACCION E IDENTIFICACION DE ESPECIES	19
3.1.1 OBTENCON Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS	19
3.1.2 EXTRACCION, CUANTIFICACION Y CALIDAD DEL ADN	21
3.1.3 AMPLIFICACION Y SEPARACION DE LOS FRAGMENTOS	22
3.1.4 IDENTIFICACION DE LA ESPECIE	22
3.2 SELECCIÓN, ESTANDARIZACION Y GENOTIPADO DE SSR	23
3.2.1 SELECCIÓN, ESTANDARIZACION DE LOCI SRR	23
3.2.2 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	25
3.2.3 ERROR DE GENOTIPADO	26
3.3 EVALUACION DE LA DIVERSIDAD GENETICA Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL	26
3.3.1 DIVERSIDAD GENETICA Y PARENTESCO	26
3.4 EVALUACION DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL	27
3.4.1 ESTRUCTURA POBLACIONAL	27
3.5 DESEMPEÑO DE LOS MARCADORES SSR	29
3.5.1 ASIGNACION DE INDIVIDUOS A LOCALIDADES	29
3.5.2 RANKING DE MARCADORES SEGÚN SU GRADO DE INFORMACION	30
4. RESULTADOS	31
4.1 OBTENCION, EXTRACCION E IDENTIFICACION DE ESPECIES	31
4.1.1 EXTRACCION DE ADN	31
4.1.2 IDENTIFICACION DE ESPECIE	31
4.2 SELECCIÓN, ESTANDARIZACION Y GENOTIPADO DE SSR	32
4.2.1 SELECCIÓN Y ESTANDARIZACION DE LOCI SSR	32
4.2.2 TAMAÑO DE LOS ALELOS	33

4.2.3 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	34
4.2.4 ERROR DE GENOTIPADO	34
4.3 EVALUACION DE LA DIVERDIDAD GENETICA Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL	36
4.3.1 DIVERSIDAD GENETICA Y PARENTESCO	36
4.4 EVALUACION DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL	43
4.4.1 ESTRUCTURA POBLACIONAL	43
4.5 DESEMPEÑO DE LOS MARCADORES SSR UTILIZADOS	50
4.5.1 ASIGNACION DE INDIVIDUOS A LOCALIDADES	50
4.5.2 RANKING DE MARCADORES SEGÚN SU GRADO DE INFORMACION	52
5. DISCUSION	56
5.1 OBTENCION , EXTRACCION E IDENTIFICACION DE ESPECIES	56
5.1.1 IDENTIFICACION DE ESPECIE	56
5.2 SELECCIÓN, ESTANDARIZACION Y GENOTIPADO DE SSR	60
5.2.1 SELECCIÓN Y ESTANDARIZACION DE LOCI SSR	60
5.2.2 TAMAÑO Y NUMERO DE ALELOS	60
5.2.3 ERROR DE GENOTIPADO	61
5.3 EVALUACION DE LA DIVERSIDAD GENETICA Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL	63
5.3.1 DIVERSIDAD GENETICA Y PARENTESCO	63
5.4 EVALUACION DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL	66
5.4.1 ESTRUCTURA POBLACIONAL	66
5.5 DESEMPEÑO DE LOS MARCADORES SSR	69
5.5.1 ASIGNACION DE INDIVIDUOS A LOCALIDADES	69
5.5.2 RANKING DE MARCADORES SEGÚN SU GRADO DE INFORMACION	72
6. CONCLUSIONES	74
7. BIBLIOGRAFIA	75
8. ANEXOS	I

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Ubicación de los lugares muestreados en el sur de Chile; Zona Reloncaví: 1QI: Quillaipe, 1PI: Pichicolo, 1LA: Caleta La Arena, 1CN: Canutillar; Zona Chiloé: 2CB: Canal Coldita–Piedra Blanca; Zona Magallanes: 3IP: Isla Peel.	20
Figura 4.1 Análisis de correspondencia factorial (AFC) en a) 2009, b) 2013 y c) analizando en conjunto ambos años.	44
Figura 4.2 Diagrama de dispersión de valores F_{ST} entre pares de localidades de 2009 y 2013, no hay correlación significativa (test de Mantel $p>0,05$).	46
Figura 4.3 Dendrograma no enraizado, construido a partir de la matriz de la distancia genética de Reynolds, en las localidades de a) 2009 y b) 2013.	47
Figura 4.4 Grupo identificación por el software STRUCTURE harvester (K= 1-6)	47
Figura 4.5 Pertenencia proporcional (Q) de cada individuo en las 6 localidades o grupos identificados por STRUCTURE 3.3.4 en las localidades de a) 2009 y b) 2013, considerando la información de localidad de origen.	48
Figura 4.6 Resultados de los grupos identificados por el software AWClust (K=1-6), indicado por el estadístico gap en las localidades de a) 2009 y b) 2013.	49
Figura 4.7 Loci seleccionados al graficar en un diagrama de Venn los cuatro criterios utilizados tanto para 2009 y 2013	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Sitios y fechas de recolección de <i>Mytilus</i> spp del sur de Chile, origen, etapa de desarrollo, localización y código de asignacion.	21
Tabla 4.1. Número de individuos de cada genotipo <i>M. chilensis</i> e híbridos aparentes encontrados en las muestras (n=50) de las 6 localidades de 2009 y 2013, con sus respectivos <i>p-value</i> de la prueba exacta de Fischer.	32
Tabla 4.2 Numero de GenBank, Motivo de repetición, tamaño esperado y observado, fluorescencia y Tm de los 14 loci SSR	33
Tabla 4.3 Diferencias encontradas al comparar 858 genotipos de 33 individuos en 13 loci	35
Tabla 4.4 Numero de alelos por locus encontrados en 2009 y 2013	37
Tabla 4.5 Estimadores de diversidad genética en <i>M. chilensis</i> en 6 localidades en el sur de chile, en los años 2009 y 2013.	38
Tabla 4.6 Estimadores de diversidad genética global de <i>M. chilensis</i> (n=600)	41
Tabla 4.7 Promedio de p-value al comparar la frecuencia de cada alelo entre los años 2009 y 2013 por localidad y por locus.	42
Tabla 4.8 Valor promedio de parentesco (r_{XY}) entre pares de individuos resultante al comparar localidades 2009 y 2013 basado en 14 loci SRR	43
Tabla 4.9 Valores de F_{ST} pareados entre poblaciones de <i>Mytilus</i> spp del sur de Chile, basado en 14 loci SSR. Poblaciones 2009 por arriba de la diagonal, poblaciones 2013 abajo de la diagonal.	46
Tabla 4.10 Proporción de individuos de cada una de las localidades de 2009 y 2013 predefinida en los dos grupos establecidos por el software STRUCTURE 3.3.4, considerando la información de localidad de origen.	49
Tabla 4.11 AMOVA jerárquico espacio-temporal entre los años 2009 y 2013	50
Tabla 4.12 Reasignación de individuos de las localidades 2009 basado en método bayesiano (Rannala & Mountain, 1997) implementado en el software GeneClass2.	51
Tabla 4.13 Reasignación de individuos de las localidades 2013 basado en metodobayesiano (Rannala & Mountain, 1997) implementado en el software GeneClass2.	51
Tabla 4.14 Número y porcentaje de individuos correctamente reasignados a localidades en 2009 y 2013, sensibilidad, especificidad, probabilidad total de asignación y razón de verosimilitud usando algoritmo bayesiano en el software GeneClass2 (Piry <i>et al.</i> , 2004)	52

Tabla 4.15 individuos correctamente asignados a localidades y a zonas por año con paneles de loci según ranking y criterios

54

RESUMEN

Chile es el segundo productor y el primer exportador de mundial de mejillones del género *Mytilus*. El comercio internacional de alimentos requiere de sistemas de trazabilidad “del mar a la mesa” que permitan asegurar su calidad, inocuidad y autenticidad. Para verificar los sistemas de trazabilidad administrativos, se han utilizado métodos basados en el análisis de ADN, estudiando la diversidad genética, estructura poblacional y su estabilidad temporal. Esta línea base permite la aplicación de algoritmos para asignar individuos a su localidad de origen, verificando la información contenida en el etiquetado. Nuestro objetivo fue evaluar la diversidad genética, estructura poblacional y su estabilidad temporal de *Mytilus chilensis* en 6 localidades del sur de Chile, entre los años 2009 y 2013, usando 14 loci SSR. Los 14 loci analizados fueron polimórficos y en promedio se encontraron 13,49 y 13,64 alelos por locus en 2009 y 2013 respectivamente. Se observaron desviaciones significativas del HWE en 133 de los 165 test realizados. Se encontró estructuración poblacional leve, los valores de índice de fijación (F_{ST}) globales en 2009 y 2013 fueron bajos (0,014 y 0,009, respectivamente) pero significativamente distintos de cero ($P < 0,01$) y la diferenciación genética (F_{ST}) entre pares de localidades fué significativa en 11 de las 15 comparaciones realizadas en 2009 y en 7 de las 15 comparaciones realizadas en 2013. El análisis AMOVA jerárquico espacio-temporal mostró que no hubo diferencia entre los años, pero la mayor variación de las frecuencias alélicas se encuentra dentro de las localidades (97,77% en 2009 y 98,37% en 2009), el resto de variación fue debida a diferencias entre las localidades. El panel total de 14 loci asignó correctamente sobre el 61% de los individuos a zonas, mientras que a localidades fue solo el 36%. Aunque el porcentaje de asignación correcta fue más del doble a lo esperado por azar, no es suficiente para fines de trazabilidad, por lo que se recomienda mejorar el panel de marcadores con loci con mayor poder de asignación o con marcadores tipo SNPs.

SUMMARY

Chile is the second producer and the world's leading exporter of mussels of the genus *Mytilus*. The international food trade requires traceability systems "from the sea to the table" to ensure its quality, safety and authenticity. To verify the administrative traceability systems, methods based on DNA analysis have been used, studying the genetic diversity, population structure and its temporal stability. This baseline allows the application of algorithms to assign individuals to their place of origin, verifying the information contained in the labeling. Our objective was to evaluate the genetic diversity, population structure and temporal stability of *Mytilus chilensis* in 6 localities of southern Chile, between 2009 and 2013, using 14 SSR loci. The 14 loci analyzed were polymorphic and on average 13.49 and 13.64 alleles were found per locus in 2009 and 2013 respectively. Significant deviations from the HWE were observed in 133 of the 165 tests performed. Slight population structure was found, the global fixation index (FST) values in 2009 and 2013 were low (0.014 and 0.009, respectively) but significantly different from zero ($P < 0.01$) and genetic differentiation (FST) between pairs of localities was significant in 11 of the 15 comparisons made in 2009 and in 7 of the 15 comparisons made in 2013. The hierarchical space-time AMOVA analysis showed that there was no difference between the years, but the greatest variation of allele frequencies is found within the localities (97.77% in 2009 and 98.37% in 2009), the rest of the variation was due to differences between the localities. The total panel of 14 loci correctly assigned over 61% of the individuals to zones, while to locations it was only 36%. Although the correct allocation percentage was more than double that expected by chance, it is not sufficient for traceability purposes, so it is recommended to improve the marker panel with loci with greater allocation power or with SNP-type markers.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MITILICULTURA EN CHILE

Las extensas costas de Chile y las excelentes condiciones naturales, hacen propicio el desarrollo de la acuicultura. La industria acuícola nacional está sustentada principalmente sobre la base del cultivo de especies salmonídeas (dominante tanto en volumen de cosecha como en los volúmenes y valores de exportación) y moluscos bivalvos, siendo las principales especies producidas en Chile las almejas, ostiones y mitílidos (Jerez & Figueroa, 2008). Dentro de estas especies de moluscos, la que presentan mayores proyecciones hacia nuevos mercados en el mediano plazo son los mitílidos, principalmente los denominados “chorito” comercializados con el nombre de mejillón (Mundo Acuícola Pesquero, 2013).

La mitilicultura es el nombre que recibe la actividad de cultivo de mitílidos. El concepto de mitilicultura proviene del hecho de que estas especies han sido clasificadas por los científicos dentro de la familia Mytilidae. En Chile esta actividad consiste en captar, a través de mallas colectoras, grandes volúmenes de juveniles (semillas) desde bancos naturales o centros de captación de semillas ubicados en la Región de los Lagos, para luego trasladar estas semillas a centros de engorda hasta que crezcan a la talla comercial, para luego procesarlos en plantas, principalmente como productos congelados y enlatados (Guerrero, 2006).

En nuestro país los mitílidos han sido explotados y comercializados aproximadamente desde los años 30. Los principales bancos naturales estaban desde Valdivia hasta las zonas de Puerto Montt y Contao al Sur. En 1960 se agotaron estos bancos naturales, lo que motivó al estado para comenzar un programa de investigación sobre el desarrollo de cultivos, por intermedio de la CORFO, IFOP y la División de Pesca y Caza del SAG. Fueron establecidos

centros de cultivo estatales, como Putemún, Talcán, Tubildad, Puluqui e Isletilla, entre otros, localizados principalmente en Calbuco y la Isla de Chiloé. A mediados de los años 70, el Estado los traspasó a otras instituciones y universidades para fines de investigación. A inicios de la década de los 80, los privados desarrollaron el cultivo comercial del chorito, debido a la creciente y demanda. No obstante, los cambios más significativos ocurren a fines de los años 90, con la llegada de capitales españoles que invierten en plantas de proceso y abren un poder comprador importante. Comienza así una fuerte expansión de las áreas de cultivo concesionadas (Plaza *et al.*, 2005; Pizarro *et al.*, 2008). A nivel nacional, la industria del chorito ha tenido un crecimiento exponencial sostenido, a una tasa promedio anual de un 34% (Plaza *et al.*, 2005; García, 2009; Díaz, 2010).

En el contexto mundial, la producción de mitílidos proviene en un 20% de producción silvestre y en 80% de cultivos. De acuerdo a estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), unos 50 países generan la oferta mundial de mitílidos, que alcanzó para el año 2012 la cantidad de 1.828.845 toneladas. Entre los principales países cultivadores se encuentran China, Noruega, Tailandia, Vietnam, Estados Unidos, Dinamarca, Chile, Canadá, España y Holanda (FAO, 2005; FAO, 2014).

En el caso de nuestro país, tres especies tienen importancia económica: el chorito (*Mytilus chilensis* Hupe, 1854), el choro zapato (*Choromytilus chorus* Molina, 1782) y la cholga (*Aulacomya ater* Molina, 1782). Sin embargo, el chorito representa el 98,2% del volumen total de mitílidos desembarcados (captura y cosecha), del cual el 99,8% proviene de la actividad acuícola (Guerrero, 2006; SERNAPESCA, 2011). Según SERNAPESCA, el desembarque total que se presentó en el 2015, fue de 289.149 t, donde el 99,99% del total de la cosecha de chorito fue en la Región de los Lagos, seguido muy por debajo la Región de los Ríos (14 t).

Las principales formas de presentación de los mitílidos procesados en Chile son congelado y en conserva, y en muy bajas cantidades cocido o fresco congelado, y en su mayoría, es exportado (Uriarte, 2008; AMICHILE, 2010). En 2013, los productos congelados exportados alcanzaron las 61.412,9 toneladas mientras en el caso de las conservas alcanzaron las 3.582,2 toneladas. Estos productos se destinaron principalmente a España, Francia, Estados Unidos, Italia y Rusia. En cuando a los retornos, el incremento fue de un 9,1%, pasando de los US\$ 153.917 millones en 2012 a US\$ 184.652 millones en 2013 y a junio de 2014 se registraba un incremento de un 3,2% respecto a igual fecha del año anterior (SERNAPESCA, 2014).

1.2. MITILIDOS

La familia *Mytilidae*, es un grupo diverso de bivalvos que incluye un gran número de géneros (*Aulacomya*, *Choromytilus*, *Modiolus*, *Mytilus*, y *Perna* entre otros) y cada uno de ellos, abarca un número de especies de importancia económica, algunas de las cuales son explotadas comercialmente en todo el mundo. Hay por lo menos 12 especies de cinco géneros de mitílidos conocidas por ser comestibles y que son comercializadas en la actualidad (Fernández-Tejes *et al.*, 2011). Las diferencias entre los cinco géneros se basan principalmente en sus características morfológicas, y por lo tanto, se pueden distinguir fácilmente en el producto fresco con concha. Sin embargo, en los productos elaborados desconchados no se puede distinguir certeramente las diferentes especies pertenecientes al mismo género, basándose en su aspecto (Santaclara *et al.*, 2006; Fernández-Tejes *et al.*, 2011).

Dentro de la familia *Mytilidae*, el género *Mytilus* es uno de los que más se destaca. Incluye un complejo de 3 especies emparentadas, *M. edulis* L. 1758, *M. trossulus* Gould 1850 y *M. galloprovincialis* Lamark, 1819, conformando el complejo *M. edulis* (Inoue *et al.*, 1995). Estas tres especies actualmente están distribuidas en todo el mundo y han formado zonas híbridas que se superponen

(Wonham, 2004). *M. trossulus* se limita a las regiones boreales y subboreales. *M. edulis* y *M. galloprovincialis* están presentes en las regiones templadas y frías de ambos hemisferios. Según la información obtenida de su perfil de alozimas, marcadores de ADN y descripción morfológica, resultan ser distintos los ejemplares de *M. galloprovincialis* y *M. edulis* que se encuentran en el hemisferio sur de los del norte (Borsa *et al.*, 2012).

El estatus taxonómico de los mejillones nativos que habitan la costa de Chile ha sido discutido durante varios años, proponiendo diferentes sugerencias para su nomenclatura, incluyendo *M. edulis* (Koehn 1991, McDonald *et al.*, 1991) *M. edulis chilensis* (Toro, 1998), *M. galloprovincialis chilensis* (Cárcamo *et al.*, 2005), *M. galloprovincialis* (Toro *et al.*, 2005), *M. edulis platensis* (Borsa *et al.*, 2012), el linaje del hemisferio sur de *M. galloprovincialis* (Westfall & Gardner 2013), *M. planulatus* y *M. platensis* (Astorga *et al.*, 2015). Estas diferentes conclusiones taxonómicas pueden haber surgido de la falta de claridad sobre qué especies de mejillones que habitan en nuestro país, por el número y tipo de marcadores utilizados en cada proyecto de investigación (Larraín *et al.*, 2015).

Sin embargo, como han señalado varios autores, históricamente *M. chilensis* no tiene una posición taxonómica formal. Esta controversia y la historia de la discusión se reflejan en los muchos cambios realizados en el Registro mundial de especies marinas (WoRMS). Las especies de *Mytilus* en Chile, tanto nativas como introducidas, han sido estudiadas extensamente, alguno de estos estudios para ver estatus taxonómico de las especies que habitan nuestras costas son los realizados por Ouagajjou *et al.* (2011) donde desarrollaron nueve microsatélites para *M. chilensis*, sugiriendo que es una especie válida que se distingue del resto de las especies conocidas. En otro estudio, Seguel (2011) realizó una evaluación del estatus taxonómico de *M. chilensis* mediante el gen mitocondrial *citocromo oxidasa I* (COI) obteniendo conclusiones similares. En estudios anteriores, como el realizado por Daguin & Borsa (2000) utilizando Glu-

5' y el intrón del gen de la actina mac-1, encontraron que las muestras de Chile eran idénticas al *M. galloprovincialis* del Mediterráneo. En un trabajo posterior de los mismos autores se señala que la especie presente en las costas chilenas corresponde a la variante del Hemisferio Sur de *M. edulis*. En las poblaciones del Centro-Sur de Chile se encontró evidencia de ligera introgresión de *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur (Daguin & Borsa, 2000; Borsa *et al.*, 2012). Por otro lado, Hilbish *et al.* (2000), utilizando un RFLP del gen mitocondrial 16S ADN, encontró una gran similitud entre los mejillones que se encuentran en el Hemisferio Sur y *M. edulis* y *M. galloprovincialis* del Hemisferio Norte. En un estudio más reciente, Oyarzún *et al.* (2014) observaron diferencias en la ultraestructura de los espermios entre *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*, encontrando diferencias en el tamaño del acrosoma, lo cual puede ser utilizado como un rasgo para validar el estatus taxonómico de la especie.

A pesar de la falta de acuerdo sobre el estatus taxonómico del mejillón nativo chileno, el término *M. chilensis* se ha empleado durante mucho tiempo en etiquetas de productos alimenticios y en artículos científicos (Ouagajjou *et al.*, 2011; Astorga, 2014; Larraín *et al.*, 2014; Oyarzún *et al.* 2016; Araneda *et al.*, 2016b). El nombre también se utiliza en las estadísticas de producción acuícola (FAO, 2016) y en las certificaciones de buenas prácticas de acuicultura (GAA, 2013).

M. chilensis se distribuye desde el río Tirúa en la Región del Biobío (18°S) hasta el Estrecho de Magallanes, presentándose desde el intermareal bajo hasta los 25 m de profundidad (Hernández y González, 1976; Bahamondes & Muñoz, 1998; Oyarzún *et al.*, 2011), esta es una especie gonocórica con fecundación externa y sin dimorfismo sexual. El macho se puede reconocer por presentar gónada de color crema amarillenta y la hembra por su color crema anaranjado (Bahamondes & Muñoz, 1998; Clasing *et al.*, 1998). En el aspecto reproductivo Winter *et al.*, (1984) determinaron que esta especie tiene un ciclo gametogénico

anual con desoves en primavera-verano, presentándose individuos maduros principalmente en noviembre-diciembre en el Sur de Chile. Sin embargo, se ha observado *M. chilensis* maduros en época invernal desde julio-septiembre (Jaramillo & Navarro, 1995). Aunque, Oyarzún *et al.* (2011) observo que la mayor parte de los individuos de las poblaciones que estudio, maduraron principalmente en octubre.

Los óvulos y espermios son liberados al agua, donde se produce la fecundación y comienza el desarrollo de un nuevo individuo, el cual va pasando por diferentes estados larvales hasta alcanzar un estado denominado postlarva. La postlarva se caracteriza por poseer un tamaño menor a 1 mm, un pie móvil, mancha ocular y un velo que con el tiempo se va perdiendo. El pie le ayuda a desplazarse para buscar sustratos apropiados; al encontrarlo se fija, metamorfosea y adquiere el aspecto externo de un adulto, que recibe el nombre de pre-semilla. A partir de aquí solamente se dedica a desarrollarse hasta alcanzar su talla comercial (Plaza *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que *M. chilensis* posee una etapa larval plantónica con una existencia pelágica que va entre los 20 (Ruiz *et al.*, 2008) y los 45 días (Toro & Sastre, 1995; Toro *et al.*, 2004). Así, la especie tiene un potencial de dispersión a larga distancia en una escala de cientos de kilómetros a lo largo de la costa chilena. En ambiente natural, una vez que la postlarva se fija al sustrato, transcurren 3 a 4 años hasta alcanzar su talla comercial, esto dependerá directamente de las condiciones ambientales. Dado que los mitílidos adultos son organismos sésiles, es decir, no son capaces de desplazarse de un lugar a otro en busca de alimento, deben filtrar su alimento, es decir, capturan su alimento a través de sus branquias y luego lo transportan a la boca para iniciar la digestión. Uno de los factores importantes para el crecimiento de los mitílidos es la temperatura, la cual influye directamente en la cantidad de alimento disponible en el agua y en la fisiología de éste. En condiciones normales toleran

temperaturas que fluctúan entre los 3°C a 20°C, pero se ha observado que aquellos bancos ubicados en la zona del intermareal pueden resistir condiciones extremas de temperatura de -10 °C a 28°C (Plaza *et al.*, 2005; Toro *et al.*, 2006; Oyarzún *et al.*, 2011).

Para contar con una identificación exacta de las especies que se comercializan, es importante para la industria desarrollar un etiquetado veraz y que implante de manera fiel la procedencia e identificación del producto que será consumido. Por tanto resulta ser un tema de interés normativo y comercial el poder diferenciar el *M. galloprovincialis* del hemisferio norte o mejillón de Galicia, del mejillón chileno. Es por ello que se han desarrollado técnicas moleculares para diferenciar ambas especies (Rego *et al.*, 2002; Santaclara *et al.*, 2006; Fernández-Tajes *et al.*, 2011). Según AMICHILE y la Dirección de Promoción de Exportaciones (PROCHILE), la estrategia del sector se orientará, entre otras, hacia el desarrollo y posicionamiento de la marca mejillón chileno, para mejorar el precio de comercialización por medio de la incorporación de mayores estándares de calidad y valor agregado, y con ello posicionar y distinguir el producto de la competencia (Toledo, 2009)

1.3. CALIDAD DE ALIMENTOS: TRAZABILIDAD

La calidad de los alimentos, es una característica compleja que determina su valor o aceptabilidad por parte del consumidor (FAO, 2003). Las características de calidad incluyen la inocuidad del alimento; su valor nutricional; sus propiedades organolépticas, como aspecto, color, textura, sabor y las propiedades funcionales, entre otras.

Desde fines de la década de los 80, los consumidores, especialmente europeos y norteamericanos, han visto con preocupación la aparición de una serie de crisis agroalimentarias originadas por el alcance y amplia difusión de patologías (Pettitt, 2001). Todo esto ha causado gran alarma en muchos países

y resalta al mismo tiempo la facilidad con que actualmente se extienden estos problemas y la complejidad de su control y prevención. Para controlar estos peligros a la salud humana en la cadena de alimentos y así asegurar la confianza del consumidor, las autoridades públicas necesitan información que les permita detectar rápidamente la fuente de infección o contaminación de los productos alimentarios. Surge así la imperiosa necesidad de establecer políticas de identificación de los productos, mediante la aplicación de nuevas tecnologías, con lo que empieza a tomar notoriedad el término trazabilidad (Felmer *et al.*, 2006)

En forma general, la trazabilidad es un conjunto de acciones, medidas y procedimientos técnicos que permite identificar y registrar cada producto desde su origen hasta el final de la cadena de comercialización. Así, la trazabilidad otorga la posibilidad de colocar sus productos en mercados específicos más rentables, que exigen la certeza del origen y de las distintas etapas del proceso productivo (Caporale *et al.*, 2001; Barbuto *et al.*, 2010;).

Generalmente se usan indistintamente diversos términos para referirse a la trazabilidad, como son autenticación, certificación de productos, marcas y controles de calidad. Muchas veces se ha producido una confusión entre los conceptos de trazabilidad y de identificación de la especie. No obstante, hay que saber diferenciarlos ya que aunque todos forman parte de un sistema de trazabilidad, no pueden ser considerados sinónimos (López *et al.*, 2003). La autenticación consiste en la identificación de la especie y la declaración precisa de ésta, lo que resulta ser distinto de la trazabilidad ya que esta última permite establecer el origen del alimento. La presencia de esta información puede marcar la diferencia entre un producto y otro durante el proceso de compra que hace el consumidor (Cabezas, 2007).

Entre las relaciones comerciales internacionales rige el llamado “principio de equivalencia” que promueve la igualdad de condiciones en lo referente a las exigencias que se hacen a los productos importados de distintos países. A modo

de ejemplo, si una empresa desea exportar un determinado producto del mar a la Comunidad Europea, esta debe cumplir con todas las normativas y reglamentos pertinentes a la actividad que se les exigen a los productores europeos, como el reglamento (UE) N° 1379/2013 que establece la obligatoriedad de informar en el rotulado del producto el nombre científico, el origen y el método de producción (acuicultura o pesca extractiva) y la zona de captura (Arriagada, 2005; Jacquet & Pauly, 2008).

En el caso de los moluscos bivalvos, su comercialización en formato desconchado impide su identificación por la morfología de las valvas, lo que generó la necesidad de desarrollar métodos basados en técnicas no morfológicas para garantizar la veracidad de la información contenida en el (Cárcamo *et al.*, 2005; Santaclara *et al.*, 2006; Kripivka *et al.*, 2007).

Considerando estos antecedentes, resulta necesario contar con herramientas analíticas para verificar la trazabilidad física (a través de etiquetas) y aportar información en el caso de pérdida de éstas. Actualmente, existen una serie de tecnologías para la identificación animal y sus productos, como es el caso de los marcadores moleculares (Felmer *et al.*, 2006). Las ventajas que presentan los métodos basados en el análisis de ADN son: (i) El ADN es una molécula relativamente estable, incluso cuando el producto es tratado a altas temperaturas (hasta 120°C), (ii) Los resultados de los ensayos de ADN son independiente de la edad y sexo del individuo analizado, (iii) La prueba puede llevarse a cabo a partir de una amplia variedad de materiales biológicos, (iv) Los resultados son ampliamente repetibles y se pueden estandarizar y automatizar fácilmente (Negrini *et al.*, 2008).

Los métodos de análisis basados en el ADN pueden verificar la exactitud de los métodos de identificación tradicionales, como el etiquetado de los productos, la declaración de las especies presentes en los productos

alimenticios, incluidos los productos derivados y que permitan la identificación de los diferentes niveles taxonómicos, desde individuos, razas, poblaciones locales y las especies, a lo largo de la cadena alimentaria. La trazabilidad acuícola abarca tres niveles: la identificación de la especie, la determinación de la procedencia geográfica y el seguimiento de la cadena alimentaria (Ogden, 2008; Larraín *et al.*, 2014). Para el desarrollo basado en el ADN, la trazabilidad en *M. chilensis*, se puede abarcar por lo menos las preguntas: ¿Qué especie es? Y ¿Dónde fue capturado?. La identificación del origen geográfico se basa en nuestra capacidad de asignar una muestra a una población en particular, lo que requiere que la población de origen sea genéticamente lo suficiente distintas de otras poblaciones candidatas y depende de la existencia de los datos de poblaciones de varias zonas (Ogden *et al.*, 2009). El origen geográfico de los mejillones, no se puede establecer simplemente mediante la identificación de especie, debido a la distribución mundial de *Mytilus* spp e híbridos. Desde una perspectiva genética forense, identificar el origen geográfico de una muestra suele ser equivalente a la identificación de su población reproductora de origen (Ogden, 2008; Ogden & Linacre, 2015).

1.4 ANÁLISIS DE ADN, MARCADORES MOLECULARES

El principio de la identificación genética animal se basa en que, a excepción de los gemelos monocigóticos y de los clones, todos los individuos de una población difieren entre sí a nivel de ADN (Cunningham & Meghen, 2001). De esta forma es factible, a través del análisis de ADN mediante marcadores moleculares, establecer estas diferencias entre individuos de la misma especie o individuos de diferentes especies (Lodish *et al.*, 1995). Los marcadores moleculares permiten visualizar la presencia de variantes alélicas. A esta variación genética detectada se le conoce como polimorfismo, y es lo que permite separar grupos, poblaciones, cepas, especies o grupos taxonómicos mayores (Negri *et al.*, 2008). El objetivo de la obtención de marcadores moleculares es

identificar variantes polimórficas que permitan discriminar entre los grupos bajo estudio, al nivel que este sea necesario. Es decir, son herramientas que permiten obtener una marca que diferencia un grupo de otro (Astorga, 2008; Ogden & Linacre, 2015).

1.5. MARCADORES MICROSATÉLITES (SSR)

Desde la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 1989, se han desarrollado muchos tipos de marcadores (Dalvit *et al.*, 2007). Dentro de las diversas herramientas moleculares podemos destacar, RFLP (*Restriction fragment length polymorphisn*); RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*); AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*); Microsatélites (SSR (*Simple sequence repeats*) o STR (*Short tandem repeats*) y SNP (*Single nucleotide polymorphism*). La aplicación de estas herramientas es muy amplia y la adecuada elección de alguno de estos marcadores moleculares está dada por la situación a resolver, es posible utilizar diversos marcadores, pero algunos son costosos o requieren de mayor tiempo para obtener el resultado, lo que no los hace eficientes para la autenticación y trazabilidad a nivel industrial (Maldini *et al.*, 2006).

Los SSR, son secuencias o segmentos cortos de ADN, de uno a seis pares de bases (pb), que se repiten en tandem y de forma aleatoria en el genoma. Típicamente están conformados por un motivo repetitivo en el que se encuentra contenida la secuencia repetida, y dos regiones flanqueantes, las cuales se encuentran en ambos lados del motivo repetitivo. La variación en el número de repeticiones da origen a los diferentes alelos (Jarne & Lagoda, 1996; Ellegren 2004; Schötterer, 2004; Aranguren *et al.*, 2005). Se encuentran ampliamente distribuidos en el genoma, aunque su distribución dentro de los cromosomas no es uniforme ya que se encuentran en menos abundancia en las regiones subteloméricas (Koreth *et al.*, 1996). Pueden encontrarse tanto en las regiones

codificantes como en las que no lo son (Toth *et al.*, 2000) aunque en eucariotas se encuentran en exceso en las no codificantes (Metzgar *et al.*, 2000; Aranguren *et al.*, 2005). Las repeticiones de trinucleótidos y hexanucleótidos son más frecuentes en los intrones, y las otras en las regiones no codificadoras (Nikitina & Nazarenko, 2004). De acuerdo a la estructura repetitiva, los SSR se clasifican en: Simples, que tienen una sola unidad repetitiva (repeticiones perfectas) y Compuestos, con repeticiones de diferente composición (repeticiones imperfectas) (Jarne & Lagoda, 1996). Poseen tasas de 10^{-3} mutaciones por locus por generación, varios ordenes de magnitud mayores en comparación con 10^{-6} mutaciones por locus por generación de secuencias no repetitivas, haciéndolos altamente informativos y presentando un alto número de alelos (Díaz *et al.*, 2005; Larraín, 2012).

El mecanismo de mutación predominante en el genoma es la sustitución de una base por otra. Aunque los SRR podrían acumular sustituciones de bases, también están expuestos a otro proceso de mutación, el que se produce durante la replicación del ADN, conocido como *slippage* (deslizamiento), en el cual se produce la ganancia o pérdida de unidades de repetición. El modelo de mutación escalonado (SMM, por sus siglas en inglés) mutan principalmente por una o unas pocas unidades de repetición (Schlötterer & Harr, 2001; Ellegren 2004; Aranguren *et al.*, 2005). Una de las principales utilidades de este tipo de marcador, es la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas (Jarne & Lagoda 1996; Schlötterer & Harr 2001; Ellegren 2004; Schlötterer 2004).

En el caso que no exista SRR específicos para la especie en estudio, se puede usar partidores “heterologos” aislados de especies evolutivamente cercanas y transferirlos a la que es objeto del estudio. El polimorfismo detectado por este marcador puede ser revelado por electroforesis en geles de

poliacrilamida, tinción radioactiva o con plata (Araneda *et al.*, 2005) o utilizando partidores marcados con fluorescencia (Schuelke, 2000).

1.6 DIVERSIDAD GENÉTICA, ESTRUCTURA POBLACIONAL Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL

La diversidad genética se define como la variedad de alelos y genotipos presentes entre de los individuos de una misma especie o grupo bajo estudio (Frankham *et al.*, 2005). La cantidad y tipo de diversidad genética en una población se ve afectada por varios factores, como la selección, la endogamia, la deriva genética, el flujo génico y la mutación. Estos factores pueden tener efectos particulares: por ejemplo, la deriva genética y la endogamia reducen la cantidad de variación mientras que la mutación la aumenta. La selección y el flujo génico, pueden aumentar o reducir la diversidad, dependiendo de la situación en particular (Feral, 2002; Hedrick, 2005).

El conocimiento y mantenimiento de la diversidad genética de especies cultivadas es de considerable interés científico ya que contribuye a la adaptación de las especies a los cambios en el ambiente, permite diseñar estrategias de cultivo y conservación, y conocer los efectos del cultivo en las poblaciones naturales. En general, cuando el tamaño de las poblaciones se reduce, aumentan la reproducción entre organismos emparentados, produciendo consanguinidad y una reducción de la diversidad genética.

La diversidad genética se mide usualmente a través de la frecuencia de los genotipos y alelos, proporción de loci polimórficos (loci con más de un alelo), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) en una población que se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE). Al comparar el valor de la heterocigosidad (H_o y H_e) en una población, se determina si la población se encuentra en equilibrio o si presenta deficiencia o exceso de heterocigotos.

La estructura poblacional o subdivisión de la población surge cuando ocurren restricciones al flujo genético dentro de la población debido a barreras ambientales o distancia geográfica, causando desviaciones de la panmixia, produciendo pérdida de diversidad genética por deriva génica y formación de subpoblaciones. En estas subpoblaciones ocurre una fijación más rápida de alelos y existe una heterocigocidad menor que en la población no dividida. Existen varias maneras de cuantificar el grado de estructuración-diferenciación genética en un conjunto de poblaciones, pero generalmente se usan los estadísticos F de Wright (1965). Estos describen la partición de la diversidad genética en la población a diferentes niveles jerárquicos (Holsinger & Wair, 2009), Wright definió tres estadísticos F: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} . Los dos primeros indican el déficit o exceso de heterocigotos en una subpoblación y en la población total respectivamente. F_{ST} mide el grado de diferenciación en las frecuencias alélicas entre subpoblaciones (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005) o frecuencias alélicas entre sub poblaciones relativa a la población total (Holsinger & Weir, 2009). Otra forma de medir estructuración poblacional es a través de un Análisis de Variancia Molecular (AMOVA) que es un ANOVA anidado que permite analizar la partición de la diversidad genética en diferentes niveles jerárquicos de división poblacional (Frankham *et al.*, 2003).

La diferenciación genética es una medida que expresa la similitud o diferencia entre individuos o poblaciones, ya que cuando más parecidas sea las frecuencias alélicas de dos poblaciones, el grado de diferenciación entre ellas será menor. Para visualizar e interpretar fácilmente los resultados de estudios poblacionales usando marcadores genéticos (multilocus-multialelicos), es útil resumir los datos obtenidos en pocas variables sintéticas. Los métodos recomendados son análisis de correspondencia factorial, reconstrucción filogenética y agrupamiento (clustering), los que permiten visualizar los datos en gráficos de dos hasta tres dimensiones.

La mayoría de los estudios genéticos realizados hasta la fecha en animales marinos han empleado muestras puntuales en el tiempo, y por lo tanto han asumido que los patrones genéticos observados son estables (Constable, 2014). De esta forma, la detección de diferencias entre las poblaciones ha sido atribuida a variaciones recientes de las frecuencias alélicas. Sin embargo, las especies que se encuentran estructuradas genéticamente pueden sufrir fluctuaciones demográficas que en ocasiones afectan la diversidad genética y causar cambios en la distribución y abundancia de las frecuencias alélicas en las poblaciones (Robainas, 2004). Con el objetivo de esclarecer las causas y consecuencias de estas variaciones, algunos autores han examinado la estabilidad temporal de la diversidad y estructura genética de las poblaciones mediante el análisis comparativo de muestras antiguas y contemporáneas.

Estos estudios se han realizado en especies marinas y de agua dulce, y en la mayoría de éstas se han evidenciado patrones de diversidad genética estables durante períodos de tiempo relativamente largos, como ha ocurrido en el salmón del Atlántico (*Salmo salar*) (Nielsen *et al.*, 1997; Potvin y Bernatchez 2001), la trucha (*Salmo trutta*) (Hansen *et al.*, 2002), el lucio europeo (*Esox lucius*) (Larsen *et al.*, 2005), el bacalao (*Gadus morhua*) (Jónsdóttir *et al.*, 2001; Ruzzante *et al.* 2001; Poulsen *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2007), la platija de vientre amarillo (*Rhombosolea plebeia*) y platija arena (*R. leporina*) (Constable, 2014). Sin embargo, en otras especies como truchas (Heath *et al.*, 2002; Østergaard *et al.*, 2003; Jensen *et al.*, 2005) y camarón rosado al sur de Cuba (*Farfantepenaeus notialis*) (Robainas, 2004), no hubo estabilidad temporal de la diversidad genética y estructura poblaciones. Pocos estudios de este tipo se han realizados en *Mytilus* spp. observando en algunos estabilidad temporal en sus frecuencias alélicas (Diz & Presa *et al.*, 2008; Lado-Insua *et al.*, 2011; Giantsis *et al.*, 2014) y en otros variación en ellas (Shields *et al.*, 2011).

1.7 ASIGNACIÓN DE INDIVIDUOS A LOCALIDADES

Los métodos de asignación usan la información genética para establecer la pertenencia de individuos, ya sea a localidades predeterminadas o a grupos no definidos previamente (Manel *et al.*, 2005). El desarrollo rápido y barato de marcadores genéticos altamente polimórficos, tales como los SRR, ha aumentado la eficiencia de tales métodos (Estoup *et al.*, 1998). El uso de marcadores SRR para diferenciar las poblaciones y vincular un individuo a un origen particular, se basa en la variación de las frecuencias de alelos de los marcadores entre las poblaciones. Los altos niveles de polimorfismo observado en los marcadores SSR, han llevado a su uso en la determinación del origen geográfico de una gran variedad de especies, como por ejemplo, el marfil africano (Wasser *et al.*, 2008), gato montés de los EE.UU (Millions *et al.*, 2006), tortugas (Schwartz *et al.*, 2008), osos (Andreassen *et al.*, 2012), así como los peces (Primmer *et al.*, 2000; Glover *et al.*, 2009) y moluscos, como es el trabajo realizado por Larraín *et al.* (2014) en *M. chilensis* en localidades del sur de nuestro país.

Los métodos de asignación genéticos son útiles en el tratamiento de temas tales como las relaciones, la estructura y la clasificación a nivel individual (Estoup & Angers. 1998). Debido a que los métodos de asignación nos permiten extraer inferencias acerca del origen de los individuos, también tienen el potencial de proporcionar estimaciones directas de la dispersión en tiempo real a través de la detección de individuos inmigrantes (Rannala & Mountain, 1997; Paetkau *et al.*, 2004).

Los estimadores tradicionales de estructura de la población dependen de la definición *a priori* de las poblaciones, pero en los últimos años se han desarrollado métodos que tratan de dividir la muestra total de genotipos de una población en un número desconocido de subpoblaciones o grupos para maximizar el equilibrio de Hardy-Weinberg y el equilibrio de ligamiento dentro de

las agrupaciones. La ventaja de la agrupación es que tiene en cuenta las situaciones genéticas complejas como también, patrones extremos de heterogeneidad espacial y temporal que se muestran en las poblaciones marinas (Selkoe *et al.*, 2008).

Los métodos de asignación utilizan la información genética para determinar la población o grupo de pertenencia de los individuos. Los métodos computacionales se han desarrollado específicamente para asignar a individuos predefinidos (población de referencia) o no predefinidos (clusters) y/o métodos de probabilidad (ya sea de máxima verosimilitud o métodos Bayesianos). Los enfoques frecuentistas utilizan pruebas de hipótesis estadísticas y dar p-value derivado de una distribución de frecuencia predefinida o simulada. Los métodos de verosimilitud asumen que los datos observados surgieron de un modelo probabilístico con parámetros desconocidos, y se utilizan los datos para estimar estos parámetros con el fin de evaluar el grado de incertidumbre asociada con estas estimaciones (Manel *et al.*, 2005; Negreni *et al.*, 2008).

Considerando los antecedentes expuestos, para aplicar herramientas analíticas que permitan verificar los sistemas de trazabilidad administrativa, se hace necesario conocer la diversidad genética, estructura poblacional y su estabilidad temporal en *Mytilus chilensis* en el sur de Chile.

2. HIPOTESIS, OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS

2.1 HIPOTESIS

La diversidad genética y estructura poblacional de *Mytilus chilensis* en seis localidades del sur de Chile, es temporalmente estable.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la estabilidad temporal de la diversidad genética y estructura poblacional en *M. chilensis* en el sur de Chile para aplicar un sistema de trazabilidad molecular basado en genética de poblaciones.

2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estimar la diversidad genética y su estabilidad temporal a partir de las frecuencias alélicas y genotípicas en individuos de *M. chilensis* colectados en seis localidades en el sur de Chile en 2009 y 2013.
- Estimar la estructura poblacional, y su estabilidad temporal, en *M. chilensis* analizando individuos colectados en seis localidades del sur de Chile, en 2009 y 2013.
- Evaluar el poder de asignación de los marcadores SSR utilizados en *M. chilensis* en los años 2009 y 2013.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS, EXTRACCIÓN DE ADN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

3.1.1 OBTENCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Se utilizaron muestras de *M. chilensis* recolectadas en 6 localidades en el sur de Chile entre 41 ° 31'S, 72 ° 20 'W hasta 50 ° 50'S, 74 ° 00 'W. En cada lugar se recolectaron 50 individuos (n = 50). Cinco localidades corresponden a centros de captación de semilla ubicados en la Region de los Rios y una fue un banco natural ubicado en la Region de Magallanes, las que se dividieron en tres zonas de recolección, la primera denominada zona de Reloncaví, donde se ubicaron las localidades de Quillaipe (1QI), Pichicolo (1PI), Caleta La Arena (1LA) y Canutillar (1CN), la segunda denominada zona de Chiloé donde se ubicó la localidad de Canal Coldita-Piedra Blanca (2CB) y por último la zona de Magallanes donde se ubicó la localidad de Isla Peel (3IP) (Figura 3.1). Para estudiar la estabilidad temporal de la estructura de población, se analizaron muestras recogidas en las mismas localidades en 2009 (obtenidas en un estudio anterior por Larraín *et al.*, 2012) como en 2013 (Tabla 3.1).

Los individuos recolectados en este estudio fueron disectados y se almacenó una sección de tejido del borde del manto (200 mg aproximadamente) en tubo eppendorf de 1,5 ml y se fijó con etanol (95%). Los individuos se almacenaron a 4°C hasta la extracción de ADN en el Laboratorio de Ingeniería de Procesos y Control de Calidad del Departamento de Química de Ciencias de los Alimentos y Tecnología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

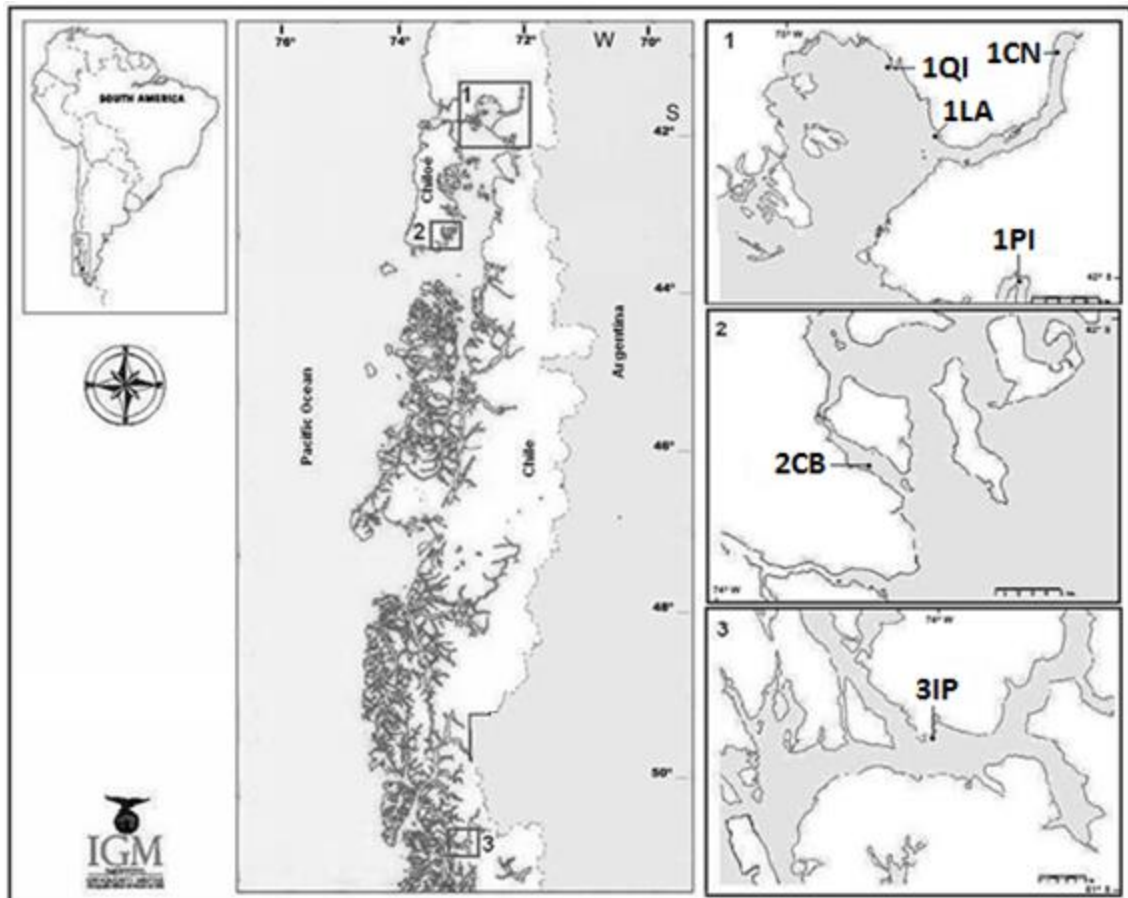


Figura 3.1. Ubicación de los lugares muestreados en el sur de Chile; Zona Reloncaví: 1QI: Quillaipe, 1PI: Pichicolo, 1LA: Caleta La Arena, 1CN: Canutillar; Zona Chiloé: 2CB: Canal Coldita–Piedra Blanca; Zona Magallanes: 3IP: Isla Peel.

Tabla 3.1. Sitios y fechas de recolección de *M. chilensis* del sur de Chile, origen de la muestra, etapa de desarrollo y código de asignación.

Localidad	Fecha de recolección	Latitud Sur	Longitud Oeste	Origen	Etapas de desarrollo	Código
Quillaípe	24.06.2009	41° 32' 55,35''	72° 46' 14,35''	Centro de Captación	Semilla	1QI09
	25.03.2013					1QI13
Pichicolo	24.06.2009	42° 02' 23,76''	72° 35' 27,17''	Centro de Captación	Semilla	1PI09
	25.03.2013					1PI13
Caleta La Arena	24.06.2009	41° 41' 00,00''	72° 40' 18,92''	Centro de Captación	Semilla	1LA09
	25.03.2013					1LA13
Canutillar	24.06.2009	41° 31' 13,9''	72° 20' 15,69''	Centro de Captación	Semilla	1CN09
	25.03.2013					1CN13
Canal Coldita-Piedra Blanca	25.06.2009	43° 14' 48,82''	72° 41' 42,77''	Centro de Captación	Semilla	2CB09
	27.03.2013					2CB13
Isla Peel	16.02.2009	50° 50' 29,83''	74° 00' 41,27''	Banco natural	Adulto	3IP09
	14.02.2014					3IP13

3.1.2 EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y CALIDAD DEL ADN

Para la extracción de ADN en los individuos recolectados se utilizó el método de fenol-cloroformo adaptado para bivalvos según Larraín *et al.* (2012). La calidad de las extracciones de ADN fue comprobada mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7% con bromuro de etidio (10 mg mL^{-1}) para visualizar la integridad de ADN en un transiluminador de luz ultravioleta. La cuantificación de la concentración y el control de la pureza se realizaron por lectura de la muestra a 260nm/280nm en espectrofotómetro (NanoDrop 2000). Las muestras se ajustaron a una concentración $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ con tampón TE 0,1X (Tris 1mM, EDTA 0,5 mM pH 8,0). Todas las muestras de ADN se almacenaron a -18°C hasta la realización de los análisis genéticos correspondientes.

3.1.3 AMPLIFICACIÓN Y SEPARACIÓN DE LOS FRAGMENTOS

Las reacciones de amplificación se realizaron en termociclador T100™ (Bio-Rad®) o termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific Ltd, UK) con Taq ADN polimerasa recombinante (Thermo Scientific®) o Taq ADN polimerasa Maxima Hot Start (Thermo Scientific®) y agua grado PCR (HyClone®). En todas las reacciones de PCR se incluyó un control negativo sin agregar ADN. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa (1,8%), usando tampón TBE con 10 mg mL⁻¹ de bromuro de etidio para detección de las bandas bajo luz ultravioleta en transiluminador White/2UV (UVP modelo LMW-20). Se registraron las imágenes con una cámara fotográfica digital Cannon PowerShot SX160 IS. El tamaño de los fragmentos amplificados se estimó utilizando en cada gel un estándar de tamaño (ladder) de 100 pb (Hyperladder V™ - BioLine).

3.1.4 IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE

Se utilizó el marcador nuclear PCR-RFLP específico de la especie (Santaclara *et al.*, 2006), empleando la pareja de partidores *Me 15* (5'-CCAGTATACAAACCTGTGAAGA-3') y *Me 16* (5'-TGTTGTCTTAATAGGTTTGTAAGA-3') (Inoue *et al.*, 1995) para amplificar la región no repetitiva del gen de la proteína adhesiva polifenólica, un componente clave en la formación del biso que fija el mejillón al sustrato y que permite diferenciar los productos de PCR obteniendo fragmentos de distinto tamaño, 180 pares de bases (pb) en *M. edulis*, 168 pb en *M. trossulus* y 126 pb en *M. galloprovincialis*. En el caso de *M. chilensis* estos partidores producen un fragmento de 126 pb al igual que *M. galloprovincialis*. Para lograr diferenciarlos se digirió el fragmento amplificado con enzima de restricción *Aci I* que corta el amplicón de *M. galloprovincialis* en dos fragmentos y no corta el amplicón de *M. chilensis* (Santaclara *et al.*, 2006). La identificación de la especie se realizó sólo en los individuos 2013, debido a que en los individuos 2009 se realizó previo a

este trabajo (Larraín *et al.*, 2012). Los individuos híbridos encontrados en este estudio, fueron remplazados por individuos homocigotos de *M. chilensis*.

Se realizó un análisis de homogeneidad basada en la prueba exacta de Fisher, utilizando el software estadístico R, con el fin de comparar la distribución de cada especie y los híbridos a través de ambos años.

3.2 SELECCIÓN, ESTANDARIZACIÓN Y GENOTIPADO DE SSR

3.2.1 SELECCIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LOCI SSR.

Se usaron 91 loci SSR descubiertos por pirosecuenciación de 3.826.276 pb por Omics Solutions (<http://omics-solutions.cl>) detectados de un individuo de *M. chilensis* del sur de Chile (de la población 1QI09 muestreado en 2009). Sobre la base de estas secuencias se identificaron 743 motivos SSR, en su mayoría dinucleótidos. Posteriormente se diseñaron 91 pares de partidores para motivos penta, tetra, tri y dinucleótidos que presentaron secuencias flaqueantes que permitieron el diseño de partidores de calidad, utilizando los programas AmplifX 1.7.0 (<http://crn2m.univ-mrs.fr/pub/amplifx-dist>) y Primer Blast NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Estos pasos se realizaron previo a este estudio. También se mandaron a sintetizar parejas de partidores para amplificar 10 marcadores SSR obtenidos por otro grupo de investigadores (MIT02 (Vidal *et al.*, 2009), Mgu1, Mgu3 y Mgu5 (Presa *et al.*, 2002), MGE003, MGE004, MGE005 y MGE007 (Yu & Li, 2007), MT203 y MT282 (Gardeström *et al.*, 2007)). Se solicitó la síntesis de las parejas de partidores para amplificar los 91 loci SSR descritos (ANEXO I).

Para la selección final de los loci que se utilizaron en este estudio, se aplicó un protocolo de selección de las condiciones óptimas de amplificación para los loci SSR (ANEXO II) los que fueron probados en 6 individuos, eliminando

aquellos loci que presentan alto porcentaje de fallas en la amplificación y los que dan múltiples bandas en geles de agarosa. Para los loci que superaron esta etapa se solicitó la síntesis de un nuevo partidador forward con una cola universal M13.

Para la estandarización de las condiciones de amplificación de los loci usando los partidores con cola universal M13 (ANEXO III) y los partidores con marca fluorescente (Marcados con fluorescencia (PETTM, NEDTM, 6FAMTM y VICTM) se siguió el protocolo descrito por Schuelke (2000).

Las condiciones térmicas de amplificación se programaron con una denaturación inicial a 95°C por 5 min., seguida de 30 ciclos de amplificación, cada uno consistente en denaturación a 95°C por 30 s, hibridación a temperatura unión específicos (T_m) por 30s y una extensión a 72°C por 30 s. Luego fue seguido por 8 ciclos de amplificación, consistentes en denaturación a 94°C por 30 s, hibridación a 53°C a 45 s y una extensión a 72°C por 45 s. Concluido los 8 ciclos se programó una extensión final a 72°C por 12 min. Se determinó el T_m óptimo para cada uno de los loci realizando un gradiente de temperatura. Cada locus se amplificó en 36 individuos en placas de 96 pocillos.

Los loci que pasaron los criterios establecidos se genotipificaron en 50 individuos de cada población en 2009 y 2013 (600 individuos en total). Los loci fueron agrupados de a cuatro, con diferente fluorescencia, en un tubo para ser analizados en una misma reacción en un equipo de electroforesis capilar ABI-44 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®), utilizando el patrón de tamaño LIZ GS-500. Para conocer el tamaño de los alelos se analizaron los archivos de salida con el software PEAK SCANNER 1.0 (Applied Biosystems®), eliminando los loci que no entregaban una lectura fluorescente clara (presencia de multipeaks) y nitida.

Cada vez que se mandaron muestras a lectura se incluyó un control negativo, que consistió en una mezcla de los reactivos de PCR sin la presencia de ADN, con el propósito de detectar posible contaminación en la reacción. Cuando se evidenció contaminación (peak reiterativos en el electroferograma) y ésta se superponía con la zona en que debía aparecer el alelo, se realizó nuevamente la reacción de PCR. La detección de contaminación se realizó antes del “*scoring*”, por lo que no ocasionó error de genotipado.

Debido a que los archivos de salidas entregan los tamaño del alelo con dos decimales, se usó el software TANDEM 1.1 (Matschiner & Salzburger, 2009) para redondear el tamaño de los alelos a números enteros válidos (Bining), dependiendo de la unidad de repetición del SSR que se esté utilizando.

Se usó el software CONVERT 1.31 (Glaubitz, 2004) para adecuar el formato de datos de los genotipos a los paquetes estadísticos que se utilizaron para el análisis de genética poblacional.

3.2.2 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

El desequilibrio de ligamiento entre pares de loci se evaluó en todas las localidades y dentro de cada localidad, mediante la prueba estadística de razón de verosimilitud (prueba G) usando la simulación de cadena de Markov implementada en el software web GENOPOP 4.2 (<http://genepop.curtin.edu.au/>) (Rousset, 2008; Raymond & Rousset, 1995). Se utilizó la corrección False Discovery Rate (FDR) modificada por Benjamini y Yekutieli (2001) denominada método FDR-BY, ya que en el método FDR modificado por Benjamini y Hochberg (1995) (FDR-BH), la tasa de error tipo I es demasiado alta para ser aplicada ampliamente en genética de conservación y la corrección de Bonferroni para múltiples test (Rice, 1989) proporciona valores críticos muy conservadores (Narum, 2006).

3.2.3 ERROR DE GENOTIPADO

Para evaluar el error de genotipado, se amplificaron dos veces los 36 individuos analizados en la etapa anterior y se compararon los genotipos, como lo describe Bonin *et al.* (2004). Se utilizó el software MICROCHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004) para detectar errores de genotipificación: descarte de alelos grandes, presencia de alelos nulos y tartamudeo, en cada una de las localidades analizadas en cada uno de los años de estudio.

3.3 EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL

3.3.1 DIVERSIDAD GENÉTICA Y PARENTESCO

La diversidad genética se determinó calculando el número de alelos por locus (A), la heterocigocidad por locus observada (H_o) y esperada (H_e) según el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), contenido de información polimórfica (PIC) y presencia de alelos privados, con el complemento de Excel MS Tools (Park, 2001). Las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg se estimaron mediante el estadístico F_{IS} (Wright, 1965) según Weir & Cockerham (1984) en cada locus y localidad. Para ajustar el nivel de significación en el estadístico F_{IS} se utilizó la corrección del método FDR-BY (Narum, 2006).

Se estimó el parentesco o proporción de alelos entre dos individuos que son idénticos por descendencia, mediante el índice r_{xy} a partir de los genotipos multilocus de acuerdo a Queller & Goodnight (1989) usando el software IDENTIX 1.1.5 (Belkhir *et al.*, 2002).

Para comprobar si existe estabilidad temporal en la diversidad genética de *M. chilensis*, se utilizó la prueba exacta de Fisher para comparar la distribución de frecuencias alélicas de los SSR entre 2009 y 2013 por locus en las 6

localidades (Shields *et al.*, 2010). Para esto se utilizó el software R 2.5.

3.4 EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL

3.4.1 ESTRUCTURA POBLACIONAL

Se evaluó la diferenciación genética y su significancia entre pares de localidades y a nivel global en la población total, usando el estadístico F_{ST} estimado según Weir & Cockerham (1984) a través del software web GENOPOP 4.2 (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008). Para estimar las distancias genéticas entre las localidades se utilizó la distancia de Reynolds (Reynolds *et al.*, 1983), debido a que se ha descrito como más exacta para eventos recientes de divergencia usando SRR (Lenstra *et al.*, 2011), ya que no considera la mutación y depende del flujo genético. Se empleó el algoritmo de agrupamiento Neighbor-Joining para obtener un árbol de distancias genéticas, que consiste en agrupar los genotipos de acuerdo al número de alelos compartidos, expresando de esta manera la cercanía que puedan presentar los individuos. La confianza de las ramas del árbol se obtuvo a partir de 1000 réplicas de bootstrap. Este árbol se generó mediante el análisis en el software PHYLIP 3.69 (Felsenstein, 2009) y graficado en el software TreeView 1.6.6 (Page, 1996). Se realizó un análisis de correspondencia factorial (AFC) en base a los genotipos multilocus entre las localidades en el software GENETIX 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 1996).

Mediante el test de Mantel (1967) se probó el aislamiento por distancia, es decir, que poblaciones más distantes entre sí tienen menor posibilidad de ser genéticamente homogéneas, ya que la probabilidad de intercambio de migrantes (flujo génico) disminuye con la distancia. Se comparó las matrices de distancia genética ($F_{ST}/(1 - F_{ST})$) con la de distancia geográfica (km) estimada como la trayectoria mínima por la línea de la costa, usando el logaritmo de la distancia

geográfica recomendado para un hábitat con dos dimensiones (latitud y longitud) (Rousset, 2008). El cálculo del índice de similitud (r) se realizó en el software GENETIX 4.05.2 (Belkhir *et al.*, 1996) y la significancia de la asociación se probó con 1000 réplicas.

Se visualizó la relación de la estructura poblacional entre estos dos años, graficando los valores de F_{ST} pareados en 2009 versus los valores de F_{ST} pareados en 2013. La significancia de la matriz de correlación se probó mediante el test de Mantel (1967) con 1000 iteraciones en el software web GENOPOP 4.2 (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008).

Se utilizó el software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) para evaluar el agrupamiento de los individuos usando sus genotipos multilocus, considerando y sin considerar la información de la localidad de origen. En ambos casos el parámetro K (número de grupos) se fijó en el número de localidades analizadas. Se usó una longitud de quemado (burn-in) inicial de 50.000 para minimizar el efecto de la configuración inicial, seguido de 100.000 iteraciones de cadena de Markov (Negrini *et al.*, 2008).

Otro software utilizado para medir el grado de agrupamiento es el complemento AWClust 1.0 (Gao & Starmer, 2008) del software de análisis estadísticos R 2.5, que no requiere de suposiciones acerca de modelos de poblaciones. AWClust no hace suposiciones acerca del equilibrio de H-W o desequilibrio de ligamiento, como lo hace el software STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). El programa fue desarrollado originalmente para datos de SNPs, pero cada alelo dentro de un locus puede ser codificado como tal, con un dos para homocigoto, uno para heterocigoto y cero para ningún alelo en un genotipo, siguiendo el enfoque de Gruber *et al.* (2013).

Mediante un Análisis de Variación Molecular (AMOVA) se estimó el grado

de diferenciación a tres niveles jerárquicos: entre años, zonas de recolección, localidades dentro de las zonas de recolección. Se usó el software ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005), utilizando un nivel de significación calculado con 1023 permutaciones.

3.5 DESEMPEÑO DE LOS MARCADORES SSR

3.5.1 ASIGNACIÓN DE INDIVIDUOS A LOCALIDADES

La asignación de los individuos a su localidad de origen se realizó con el software GeneClass2 2.0 (Piry *et al.*, 2004), que utiliza un análisis Bayesiano que no asume equilibrio de H-W. Este método de asignación es el más utilizado con poblaciones de referencia. Se utilizó el método de frecuencia debido a que asigna el individuo al sitio donde su frecuencia alélica es más probable (Paetkau *et al.*, 1995) y el método bayesiano (Rannala & Mountain, 1997) asigna al individuo a la población que tiene la probabilidad más alta.

Para evaluar el desempeño de los métodos de asignación se calcularon los índices diagnóstico para cada población en base a las reasignaciones realizadas por el programa GeneClass2 2.0 usando el método bayesiano: i) La sensibilidad (S), calculado como el número de individuos correctamente asignados a su ubicación original, dividido por el número total de individuos muestreada desde esa ubicación. Este índice refleja lo bien que una prueba está en asignando correctamente los individuos a una ubicación. ii) Especificidad (E), calculado como el número de individuos correctamente excluidos de la población, dividido por el número total de individuos que no pertenecen a la población. Este índice refleja lo bien que la prueba está excluyendo correctamente individuos que no pertenecen a ese lugar (Altman & Bland, 1994; Loong, 2003). iii) Probabilidad total de asignación de los individuos a la categoría (PA), calculado como el promedio de la probabilidad de cada éxito en la reasignación a la ubicación

respectiva. iv) razón de verosimilitud (LR +), calculado como $S / (1-E)$. Este estadístico resume cuántas veces más (o menos) es la probabilidad de que los individuos que pertenecen a una ubicación serán asignados a esta ubicación, en comparación con los individuos que pertenecen a otra ubicación (Deeks & Altman, 2004).

3.5.2. RANKING DE MARCADORES SEGÚN SU GRADO DE INFORMACIÓN

Se utilizó distintos criterios para seleccionar los loci más informativos, estos criterios fueron: i) Loci putativos bajo selección positiva utilizando el F_{ST} Wright's (95% IC de F_{ST}) analizado en el software LOSITAN (Antao *et al.*, 2008), ii) El contenido de información polimórfica ($PIC \geq 0,5$) analizados en el complemento Excel MS Tools (Park, 2001), iii) El número de alelos por locus (≥ 10 alelos/locus) y iv) Maximizando la asignación individual a través del software BELS 1.0 (Bromaghin, 2008) que clasificó los loci SSR en función de su competencia informativa y la interacción sinérgica entre loci (Hess *et al.*, 2011).

Para ejecutar la reasignación de los individuos a su población de origen se utilizó el método *leave-one-out* (LOO) con el criterio bayesiano de Rannala & Mountain (1997) en el software GeneClass2 2.0 (Piry, 2004).

RESULTADOS

4.1 OBTENCIÓN, EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

4.1.1 EXTRACCIÓN DE ADN

La integridad del ADN observada en geles de agarosa al 0,7% no mostró ninguna o poca degradación. Su concentración varió entre 207 y 1986 ng/ μ L y la pureza, medida a través de la relación de absorbancia 260/280 nm, fluctuó entre 1,81 y 2,01.

4.1.2 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE

En las seis localidades de 2013, los individuos presentaron mayoritariamente el alelo de 126 pb y fueron homocigotos de *M. chilensis* (98,7%), no encontrando individuos de otras especies de *Mytilus*. Sin embargo, se detectaron en una baja proporción, híbridos putativos, de *M. chilensis* x *M. galloprovincialis* (1,0%) y *M. chilensis* x *M. trossulus* (0,3%). No se encontró evidencia de híbridos de *M. edulis* en las muestras analizadas. La composición de especies y presencia de híbridos putativos fue homogénea en los años 2009 y 2013, cuando se consideró los individuos de las 6 localidades globalmente (Fisher p -value= 0,3333) y también en cada una de las localidades por separado (Tabla 4.1).

Con la herramienta aplicada se concluye que la composición de *Mytilus* en Chile fue estable en el periodo (2009-2013) y en la región analizada. *M. chilensis* fue la especie predominante de las costas del sur de Chile y tampoco se encontraron otras especies en el muestreo realizado.

Tabla 4.1. Número de individuos de cada genotipo *M. chilensis* e híbridos aparentes encontrados en las muestras (n=50) de las 6 localidades de 2009 y 2013, con sus respectivos p-value de la prueba exacta de Fischer.

Localidades	Fisher (p-value)	Código	Especie		
			<i>Mch</i>	<i>Mch x Mg</i>	<i>Mch x Mt</i>
Quillaípe	1,000	1QI09	49	1	0
		1QI13	49	1	0
Pichicolo	1,000	1PI09	50	0	0
		1PI13	50	0	0
Caleta La Arena	0,4949	1LA09	48	0	2
		1LA13	49	1	0
Canutillar	1,000	1CN09	50	0	0
		1CN13	50	0	0
Canal Coldita- Piedra Blanca	0,4949	2CB09	48	0	2
		2CB13	49	1	0
Isla Peel	1,000	3IP09	50	0	0
		3IP13	49	0	1

Mch: *M. chilensis*; ***Mch x Mg***: *M. chilensis* x *M. galloprovincialis*; ***Mch x Mt***: *M. chilensis* x *M. trossullus*

4.2 SELECCIÓN, ESTANDARIZACIÓN Y GENOTIPADO DE SSR

4.2.1 SELECCIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LOCI SSR

Se logró la amplificación exitosa en 14 de los 91 loci inicialmente ensayados en este estudio, presentando buenos resultados de amplificación en cada una de las etapas (ANEXO II y IV). Las condiciones de amplificación estandarizadas para la reacción de PCR de cada uno de los SSR fue llevada en una reacción final de 25 µL mezclando 40 ng de ADN, 1,5 µl de Buffer PCR 10x

[(NH₄)₂ SO₄], 3 µM de MgCl₂ (25mM), 200 µM de dNTP (10 mM de cada uno), 0,04 µM de primer F-M13 (10 µM), 0,16 µM de primer R (10 µM), 0,02 µM de Fluoróforo (1 µM), 1,25 U de Taq ADN polimerasa “Recombinante” (Thermo Scientific®) (5U/µL), las correspondientes Tm estandarizadas de cada uno de los loci se ven en la tabla 4.2

4.2.2 TAMAÑO DE LOS ALELOS

Los tamaños de los alelos observados fluctuaron entre 131 a 416 pb (Tabla 4.2), y fueron semejantes a los publicados en Animal Genetics (Araneda *et al.*, 2016a). El motivo repetido más frecuentes fue el trinucleótidos (8 loci) seguido del dinucleótidos (6 loci) y sólo un pentanucleotido. Se obtuvo el genotipo de la mayoría de los individuos (ANEXO V-a y V-b),

Tabla 4.2 Numero de GenBank, Motivo de repetición, tamaño esperado y observado, fluorescencia y Tm de los 14 loci SSR

Locus	GenBank N°	Motivo de repetición	Tamaño esperado (pb)	Tamaño observado (pb)	Fluoróforo	Tm (C°)
<i>Mch-UCH01</i>	KJ018288	(AAC) ¹⁰	131 ¹	131-305	VIC	60
<i>Mch-UCH02</i>	KJ018289	(GCTGA) ⁵	380 ¹	290-416	FAM	61
<i>Mch-UCH11</i>	KJ018298	(TTC) ⁵	180 ¹	179-212	VIC	58
<i>Mch-UCH12</i>	KJ018299	(AAT) ⁵	295 ¹	232-337	PET	55
<i>Mch-UCH15</i>	KJ018302	(ATA) ⁷	335 ¹	342-384	PET	56
<i>Mch-UCH18</i>	KJ018305	(TGA) ⁶	170 ¹	161-236	PET	63
<i>Mch-UCH20</i>	KJ018307	(ATG) ⁵	235 ¹	245-254	NED	61
<i>Mch-UCH23</i>	KJ018310	(CAT) ³	210 ¹	219-234	FAM	66
<i>Mch-UCH30</i>	KJ018317	(AAT) ⁶	185 ¹	168-213	VIC	57
<i>Mch-UCH104</i>	KT731087	(AT) ⁶	230 ¹	163-261	VIC	62
<i>Mch-UCH110</i>	KT731091	(AT) ⁶	176 ¹	162-200	FAM	61
<i>MT203</i>	BV725482	(CA) ⁸	196-238 ²	194-332	FAM	61
<i>MT282</i>	BV725484	(GT) ⁹	336-354 ²	335-381	NED	51
<i>Mgu1</i>	AF445370	(TG) ⁿ - (AT) ⁿ	168-208 ³	123-243	NED	49

¹Diseñados en este estudio; ² Gardeström *et al.*, 2007; ³ Presa, 2002

4.2.3 DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

La prueba de desequilibrio de ligamiento entre pares de loci indicó, mayoritariamente, que los genotipos en los 14 loci SRR segregaban de manera independiente. Sólo 68 (6,22%) de las 1092 comparaciones realizadas, mostraron ligamiento (29 comparaciones en las localidades de 2009 y 39 en 2013), luego de realizar la corrección con el método FDR-BY ($p= 0,00727$). En las 39 comparaciones que mostraron ligamiento en 2013, sólo en 2 se repitió el par de loci en más de una localidad. El primer caso (loci *Mch-UCH2* x *MT282*) se encontró ligamiento en las localidades de Pichicolo (1PI13) y Caleta La Arena (1LA13), en el segundo caso (loci *MT282* x *MT203*) hubo ligamiento en las localidades de Canutillar (1CN13) y Canal Coldita-Piedra Blanca (2CB13). No se pudo evaluar el grado de desequilibrio del locus *Mch-UCH20* en la localidad de Canutillar de 2013 (1CN13) debido a que fue monomórfico.

4.2.4 ERROR DE GENOTIPADO

Se encontraron 17 diferencias entre los 858 genotipos examinados (ANEXO VI), dando una tasa de error total de genotipado de 1,98%. No se utilizó el locus *Mch-UCH18* debido a que hubo un cambio en el fluoróforo alterando el tamaño de lectura de los alelos. Se utilizaron sólo 33 individuos, debido a la exclusión de 3 individuos por problemas de amplificación. La lectura fallida se consideró cuando un locus en un mismo individuo amplificado en tres oportunidades en una ocasión dio un genotipo, mientras que en las otras dos no hubo amplificación. El error por lectura fallida fue 1,28%, mientras que el cambio en el tamaño del alelo (los mismos genotipos analizados dos veces presentan distinto tamaño alélico) corresponde al 0,70% (Tabla 4.3).

Para cada locus, la presencia de alelos falsos o artefactos (alelos con forma irregular ubicados en una misma zona del electroferograma) se determinó analizando electroferogramas de varios individuos. Los artefactos fueron detectados y omitidos antes del “*scoring*”, por lo que no fueron motivo de error.

Tabla 4.3 Diferencias encontradas al comparar 858 genotipos de 33 individuos en 13 loci.

Error de genotipado	Numero de diferencias	% de diferencia
Lectura fallida	11	1,28
Cambio del tamaño del alelo	6	0,7
Contaminación	0	0
Alelo falso	0	0
Total	17	1,98

El software Micro-Checker no detectó errores de conteo ni descarte de alelos grandes en ninguna de las localidades analizadas. En los loci *Mch-UCH02*, *Mch-UCH12*, *Mch-UCH15*, *Mch-UCH20*, *Mch-UCH23*, *Mch-UCH30*, *Mch-UCH104*, se encontró la presencia de un alelo predominante, que se encontraba en más del 50% de los individuos en todas o algunas localidades analizadas. Se detectó posible presencia de tartamudeo en los loci *Mch-UCH02*, *Mch-UCH11*, *Mch-UCH12* y *Mch-UCH15*, *Mch-UCH18* y *Mch-UCH110*, pero se desestimó esta advertencia por que el supuesto tartamudeo no se encontró en todas las localidades. Basándose en las frecuencias alélicas esperadas de acuerdo al equilibrio de H-W, el software detectó posible presencia de alelos nulos en todas las localidades para los loci *Mch-UCH01*, *Mch-UCH02* y *Mch-UCH15*, en 8 localidades para *Mch-UCH11* y *Mch-UCH110* y en 7 localidades de locus *MT203* y *Mgu1*, debido a que este software detectó exceso de homocigotos en el análisis.

4.3 EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL

4.3.1 DIVERSIDAD GENÉTICA Y PARENTESCO

Los 14 loci analizados fueron polimórficos en todas las localidades, aunque el locus *Mch-UCH20*, en las localidades de Quillaipe 2009 (1QI09), Caleta La Arena (1CN13) y Canutillar 2013 (1LA13), fue considerado monomórfico porque la frecuencia del alelo menor fue \leq al 1%, en comparación al alelo más frecuente (ANEXO VII).

Se detectó un total de 225 alelos, 188 en los individuos de 2009 y 190 en 2013 (Tabla 4.4) con un promedio de 13,49 y 13,64 alelos por locus respectivamente. Sobre el total de locis analizados el locus *Mch-UCH01* presentó el mayor número de alelos encontrados en este estudio (36 alelos en cada año). A demás este locus presentó el mayor número de alelos en las localidades de Quillaipe (QI09), Caleta La Arena (1LA09), e Isla Peel (3IP13) (25 alelos por localidad) (Tabla 4.5). Se observó que más del 40% de los alelos encontrados en este estudio se encontraron presentes en ambos años (Tabla 4.4).

Tanto en 2009 como en 2013 se encontraron 37 alelos que aparecieron en varias localidades, pero sólo en uno de estos años (Tabla 4.4). Aunque todo los loci mostraron distribución de alelos comunes entre los sitios, se encontraron 25 y 33 alelos privados (alelo que aparece sólo en una población de las analizadas (Li *et al.*, 2009)) en 2009 y 2013 respectivamente (Tabla 4.5). Estos alelos se encontraron en baja frecuencia, como máximo 5,32%, lo que nos sugiere que aparecieron por azar del muestreo. Por otra parte, nueve alelos aparecieron en una sola localidad cada año, pero en sólo uno de estos casos (alelo 232 pb encontrado en el locus *Mch-UCH12*) coincidió la localidad en ambos años (Canal Coldita-Piedra Blanca).

Tabla 4.4 Número de alelos por locus encontrados en 2009 y 2013

Locus	2009		2013		2009-2013		
	At	Ag	At	Ag	Ac	Ata	% Ati
<i>Mch-UCH01</i>	36	4	36	4	32	40	80,0
<i>Mch-UCH02</i>	7	2	6	1	5	8	62,5
<i>Mch-UCH11</i>	9	2	8	1	7	10	70,0
<i>Mch-UCH12</i>	7	0	10	3	6	9	66,7
<i>Mch-UCH15</i>	8	2	8	2	6	10	60,0
<i>Mch-UCH18</i>	15	4	17	6	11	21	52,4
<i>Mch-UCH20</i>	3	1	3	1	2	4	50,0
<i>Mch-UCH23</i>	4	2	3	1	2	5	40,0
<i>Mch-UCH30</i>	13	3	11	1	10	14	71,4
<i>Mch-UCH104</i>	8	2	11	5	6	13	46,2
<i>Mch-UCH110</i>	8	3	8	3	5	11	45,5
<i>MT203</i>	27	7	22	0	21	28	75,0
<i>MT282</i>	16	1	20	5	15	21	71,4
<i>Mgu1</i>	27	4	27	4	23	31	74,2
Total	188	37	190	37	151	225	67,1

At= Número total de alelos por locus; **Ag**= Numero de alelos por locus que aparecen en este año y no se encuentran en el otro; **Ac**= Numero de alelos presentes en ambos años; **Ata**= Numero de Alelos totales encontrados en ambos años; **Ati**= Porcentaje de alelos compartidos en ambos años.

Tabla 4.5 Estimadores de diversidad genética en *M. chilensis* en 6 localidades en el sur de Chile, en los años 2009 y 2013.

	Localidades 2009						Localidades 2013						
	1QI09	1PI09	1LA09	1CN09	2CB09	3IP09	1QI13	1PI13	1LA13	1CN13	2CB13	3IP13	
Mch-UCH 01	N	50	48	49	50	49	50	49	50	49	48	48	
	A	25(1)	24(1)	25(1)	22	21	19	20	21(1)	24(1)	21	21	25(1)
	Ho	0,500	0,542	0,429	0,540	0,306	0,320	0,320	0,388	0,400	0,449	0,333	0,438
	He	0,946	0,945	0,940	0,936	0,934	0,943	0,937	0,927	0,948	0,902	0,944	0,934
	PIC	0,933	0,931	0,926	0,922	0,919	0,929	0,923	0,912	0,936	0,886	0,931	0,921
	F_{IS} (W&C)	0,474*	0,429*	0,547*	0,426*	0,674*	0,663*	0,661*	0,584*	0,581*	0,505*	0,649*	0,534*
Mch-UCH 02	N	49	47	47	50	48	49	47	49	48	48	47	44
	A	5	4	3	4	5	4	3	4	4	5	4	4
	Ho	0,102	0,106	0,043	0,100	0,104	0,000	0,043	0,061	0,042	0,063	0,085	0,152
	He	0,174	0,161	0,160	0,170	0,215	0,351	0,228	0,137	0,159	0,141	0,408	0,353
	PIC	0,167	0,154	0,151	0,163	0,207	0,323	0,204	0,132	0,153	0,137	0,374	0,322
	F_{IS} (W&C)	0,415*	0,343*	0,736*	0,415*	0,518*	1,000*	0,815*	0,556*	0,740*	0,558*	0,793*	0,571*
Mch-UCH 11	N	50	48	46	47	45	50	50	49	48	49	48	50
	A	8(2)	5	4	5	4	2	4	5	3	4	4	6(1)
	Ho	0,300	0,292	0,283	0,617	0,400	0,260	0,320	0,347	0,250	0,327	0,125	0,480
	He	0,568	0,549	0,511	0,583	0,523	0,500	0,520	0,545	0,509	0,563	0,545	0,622
	PIC	0,484	0,444	0,407	0,486	0,423	0,372	0,410	0,433	0,387	0,466	0,433	0,540
	F_{IS} (W&C)	0,474*	0,471*	0,450*	-0,059	0,238*	0,483*	0,387*	0,366*	0,512*	0,423*	0,773*	0,230*
Mch-UCH 12	N	41	47	44	48	44	43	45	47	44	48	50	46
	A	4	3	3	4	5	4	5	7(2)	7(1)	5	5	5
	Ho	0,195	0,234	0,159	0,292	0,205	0,209	0,133	0,213	0,136	0,125	0,174	0,217
	He	0,553	0,466	0,449	0,430	0,359	0,483	0,452	0,532	0,510	0,440	0,488	0,585
	PIC	0,493	0,380	0,383	0,396	0,319	0,427	0,399	0,505	0,475	0,401	0,450	0,525
	F_{IS} (W&C)	0,695*	0,501*	0,648*	0,325*	0,434*	0,569*	0,708*	0,603*	0,735*	0,719*	0,644*	0,631*
Mch-UCH 15	N	47	48	48	48	47	46	50	47	49	50	46	50
	A	5(1)	4	6	4	4	5(1)	7(1)	5	4	4	4	7(1)
	Ho	0,362	0,125	0,250	0,208	0,170	0,348	0,200	0,213	0,204	0,160	0,109	0,200
	He	0,491	0,493	0,543	0,592	0,600	0,593	0,593	0,526	0,578	0,568	0,408	0,499
	PIC	0,439	0,416	0,488	0,527	0,513	0,536	0,548	0,482	0,517	0,504	0,366	0,453
	F_{IS} (W&C)	0,266*	0,748*	0,542*	0,651*	0,719*	0,416*	0,665*	0,598*	0,650*	0,720*	0,736*	0,601*
Mch-UCH 18	N	47	45	48	47	47	47	44	43	48	47	47	47
	A	10	9(1)	8	10(1)	7	11(1)	7	9(1)	7	9(1)	11(4)	7
	Ho	0,574	0,489	0,313	0,362	0,319	0,681	0,432	0,279	0,292	0,383	0,298	0,340
	He	0,742	0,812	0,739	0,798	0,785	0,725	0,729	0,737	0,751	0,794	0,784	0,801
	PIC	0,708	0,779	0,690	0,760	0,744	0,695	0,683	0,702	0,704	0,757	0,741	0,763
	F_{IS} (W&C)	0,228*	0,401*	0,580*	0,550*	0,596*	0,061	0,411*	0,624*	0,615*	0,521*	0,622*	0,577*

Tabla 4.5 Continuación

	Localidades 2009						Localidades 2013						
	1QI09	1PI09	1LA09	1CN09	2CB09	3IP09	1QI13	1PI13	1LA13	1CN13	2CB13	3IP13	
Mch-UCH 20	N	50	50	44	49	48	48	49	49	49	49	50	
	A	2	2	2	2	3(1)	2	2	2	1	2	3(1)	
	Ho	0,021	0,06	0	0,041	0,021	0,083	0,041	0,122	0,02	0	0,041	0,16
	He	0,021	0,132	0,043	0,04	0,062	0,081	0,116	0,116	0,02	0	0,04	0,15
	PIC	0,021	0,122	0,042	0,039	0,06	0,077	0,108	0,108	0,02	0	0,039	0,14
	F_{IS} (W&C)	-	0,546*	1,000*	-0,011	0,664*	-0,033	0,651*	-0,055	-	-	-0,011	-0,067
Mch-UCH 23	N	49	49	50	49	49	50	47	49	49	49	48	48
	A	3(1)	2	2	3(1)	2	2	3	3	3	3	3	3
	Ho	0,163	0,184	0,1	0,245	0,102	0,12	0,34	0,327	0,163	0,265	0,104	0,292
	He	0,153	0,169	0,096	0,224	0,098	0,114	0,289	0,282	0,153	0,267	0,101	0,259
	PIC	0,143	0,153	0,09	0,209	0,092	0,106	0,251	0,25	0,143	0,239	0,096	0,236
	F_{IS} (W&C)	-0,068	-0,091	-0,043	-0,095	-0,044	-0,054	-0,18	-0,16	-0,068	0,008	-0,035	-0,128
Mch-UCH 30	N	47	48	49	48	50	44	48	49	47	50	49	48
	A	3	4	5	7	6	8(2)	4	6	6	7(1)	7	6
	Ho	0,043	0,104	0,102	0,271	0,18	0,182	0,188	0,408	0,319	0,18	0,143	0,104
	He	0,163	0,14	0,138	0,357	0,275	0,479	0,175	0,376	0,319	0,275	0,279	0,215
	PIC	0,154	0,135	0,133	0,329	0,265	0,459	0,164	0,359	0,298	0,266	0,267	0,207
	F_{IS} (W&C)	0,736*	0,259*	0,260*	0,244*	0,348*	0,623*	-0,072	-0,087	0,001	0,349*	0,491*	0,518*
Mch-UCH 104	N	49	50	50	50	49	50	46	47	45	49	49	46
	A	5	6	6	8(1)	3	4	5	5	7(2)	4(1)	7(1)	3
	Ho	0,49	0,48	0,46	0,583	0,51	0,44	0,652	0,489	0,511	0,592	0,571	0,413
	He	0,578	0,637	0,556	0,598	0,5	0,533	0,621	0,541	0,58	0,529	0,653	0,574
	PIC	0,504	0,568	0,485	0,517	0,382	0,417	0,539	0,432	0,482	0,415	0,587	0,471
	F_{IS} (W&C)	0,154	0,248*	0,174	0,026	-0,02	0,176	-0,051	0,097	0,120*	-0,121	0,127	0,282*
Mch-UCH 110	N	48	47	50	48	48	48	47	50	49	50	48	44
	A	4	3	3	4(1)	7(1)	3	5	6(1)	5	5	7(1)	5
	Ho	0,375	0,234	0,32	0,25	0,271	0,208	0,34	0,4	0,265	0,42	0,292	0,318
	He	0,609	0,62	0,603	0,521	0,421	0,474	0,649	0,737	0,759	0,767	0,611	0,608
	PIC	0,538	0,545	0,524	0,45	0,393	0,391	0,602	0,693	0,708	0,722	0,573	0,55
	F_{IS} (W&C)	0,428*	0,651*	0,491*	0,660*	0,362*	0,585*	0,478*	0,460*	0,653*	0,455*	0,525*	0,480*
MT 203	N	44	50	50	44	50	49	46	49	50	50	46	49
	A	11	15(1)	14	15	15 (1)	17 (1)	17	13	11	13	15	16(1)
	Ho	0,318	0,54	0,4	0,455	0,42	0,429	0,565	0,469	0,46	0,48	0,543	0,367
	He	0,811	0,838	0,818	0,811	0,843	0,855	0,845	0,819	0,862	0,838	0,801	0,826
	PIC	0,776	0,811	0,792	0,777	0,817	0,829	0,819	0,79	0,837	0,811	0,772	0,794
	F_{IS} (W&C)	0,621*	0,369*	0,541*	0,469*	0,522*	0,508*	0,334*	0,430*	0,469*	0,429*	0,324*	0,558*

Tabla 4.5 Continuación

	Localidades 2009						Localidades 2013						
	1QI09	1PI09	1LA09	1CN09	2CB09	3IP09	1QI13	1PI13	1LA13	1CN13	2CB13	3IP13	
MT 282	N	48	50	47	49	47	47	48	49	47	48	47	
	A	11(1)	11	7	7	7	7	11(1)	10	13(2)	11	10	12(1)
	Ho	0,625	0,66	0,511	0,633	0,723	0,468	0,447	0,583	0,735	0,489	0,438	0,596
	He	0,789	0,777	0,76	0,752	0,719	0,708	0,815	0,821	0,806	0,815	0,809	0,828
	PIC	0,748	0,738	0,717	0,707	0,671	0,662	0,784	0,791	0,773	0,782	0,773	0,798
	F_{IS} (W&C)	0,212*	0,152*	0,316*	0,16	-0,006	0,342*	0,454*	0,292*	0,090*	0,402*	0,462*	0,283*
Mgu1	N	44	44	44	44	45	41	46	45	47	46	45	47
	A	16	14	14(1)	17(1)	15(1)	16	14	16	18(3)	16(1)	17(1)	19
	Ho	0,477	0,5	0,455	0,543	0,289	0,268	0,609	0,644	0,468	0,565	0,489	0,362
	He	0,898	0,847	0,852	0,886	0,813	0,812	0,855	0,84	0,869	0,856	0,869	0,896
	PIC	0,88	0,818	0,826	0,867	0,787	0,78	0,83	0,812	0,846	0,832	0,846	0,878
	F_{IS} (W&C)	0,469*	0,413*	0,469*	0,382*	0,644*	0,672*	0,291*	0,235*	0,464*	0,342*	0,440*	0,599*

*Desviación significativa ($p < 0,0204$) del Equilibrio H-W después de la corrección del método de FDR-BY (Narum, 2006); **n**=Numero de muestras amplificadas; **A**=Numero de alelos por locus; ()= Alelos privados; **Ho**= Heterocigosidad observada; **He**= Heterocigosidad esperada; **PIC**= Contenido de información polimórfica; **F_{IS} (W&C)**= Índice de fijación de acuerdo a Weir & Cockerham.

El mayor contenido de información polimórfica (PIC) se presentó en el locus *Mch-UCH01* en 2009 y 2013, mientras que el menor valor se presentó en el locus *Mch-UCH20*. A nivel global los locus *Mch-UCH01*, *Mch-UCH15*, *Mch-UCH18*, *Mch-UCH104*, *Mch-UCH110*, *MT203* *MT282* y *Mgu1* fueron altamente informativos ($PIC > 0,5$) (Tabla 4.6).

Los valores de H_o y H_e globales (Tabla 4.6) en 2009 fueron de 0,311 y 0,547 respectivamente, estadísticamente iguales a los de 2013 (0,316 y 0,569 respectivamente) ($\chi^2 p=1,00$). Los valores positivos de F_{IS} observados (Tabla 4.5) indican una desviación significativa del equilibrio de H-W en 133 de las 165 combinaciones locus–localidad, provocados por déficit de heterocigotos observados respecto a lo esperado, después de aplicar la corrección del método FDR-BY (Narum, 2006). En los loci *Mch-UCH01*, *Mch-UCH02*, *Mch-UCH12*, *Mch-*

UCH15, *Mch-UCH110*, *MT203* y *Mgu1* no hubo equilibrio en ninguna localidad, en tanto en el locus *Mch-UCH23* todas las localidades se encontraron en equilibrio. El estimador F_{IS} a nivel global presentó valores positivos tanto en 2009 (0,424) como 2013 (0,441) indicando un exceso de homocigotos (Tabla 4.6).

Tabla 4.6 Estimadores de diversidad genética global de *M. chilensis* (n=600)

Locus	Localidades 2009							Localidades 2013						
	A	Ho	He	PIC	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}	A	Ho	He	PIC	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
<i>Mch-UCH01</i>	36	0,439	0,949	0,945	0,536	0,005	0,538	36	0,388	0,943	0,938	0,587	0,008	0,590
<i>Mch-UCH02</i>	7	0,076	0,207	0,200	0,634	0,003	0,635	6	0,074	0,243	0,233	0,690	0,028	0,698
<i>Mch-UCH11</i>	9	0,357	0,549	0,446	0,341	0,018	0,352	8	0,310	0,553	0,451	0,441	0,000	0,440
<i>Mch-UCH12</i>	7	0,213	0,459	0,410	0,534	0,003	0,536	10	0,167	0,503	0,469	0,670	0,000	0,669
<i>Mch-UCH15</i>	8	0,243	0,556	0,507	0,562	0,004	0,564	8	0,182	0,534	0,500	0,660	0,001	0,661
<i>Mch-UCH18</i>	15	0,456	0,776	0,748	0,408	0,011	0,415	17	0,337	0,779	0,747	0,563	0,013	0,569
<i>Mch-UCH20</i>	3	0,038	0,064	0,062	0,404	0,000	0,404	3	0,064	0,075	0,072	0,132	0,015	0,146
<i>Mch-UCH23</i>	4	0,152	0,142	0,134	-0,072	0,000	-0,072	3	0,248	0,227	0,207	-0,105	0,011	-0,093
<i>Mch-UCH30</i>	13	0,147	0,264	0,259	0,427	0,033	0,446	11	0,223	0,275	0,267	0,185	0,005	0,189
<i>Mch-UCH104</i>	8	0,493	0,584	0,501	0,131	0,034	0,161	11	0,539	0,584	0,507	0,076	0,001	0,077
<i>Mch-UCH110</i>	8	0,277	0,621	0,577	0,541	0,037	0,558	8	0,340	0,718	0,683	0,510	0,040	0,530
<i>MT203</i>	27	0,429	0,860	0,844	0,503	0,000	0,502	22	0,479	0,835	0,816	0,426	0,000	0,426
<i>MT282</i>	16	0,604	0,749	0,713	0,195	0,000	0,194	20	0,549	0,823	0,801	0,330	0,007	0,334
<i>Mgu1</i>	27	0,424	0,881	0,869	0,502	0,040	0,522	27	0,522	0,873	0,861	0,399	0,008	0,404
Global	188	0,311	0,547	0,515	0,424	0,014	0,433	190	0,316	0,569	0,539	0,441	0,009	0,446

Al promediar los p-value obtenidos al comparar la frecuencia de cada alelo (ANEXO VII) entre los años 2009 y 2013 por localidad, usando el test de Fisher (Tabla 4.7), se observó que el locus *Mch-UCH01* que presentó diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas en cada una de las localidades ($p < 0,05$), mientras que las frecuencias alélicas en el locus *Mch-UCH20* fueron homogéneas ($p > 0,05$) entre los años comparados en toda las localidades. No se observó una relación clara entre el número de alelos del locus y el número de localidades donde fue homogénea la distribución de sus frecuencias alélicas. En los loci *Mch-UCH20* y *Mch-UCH23*, que presentaron el menor número de alelos (3 y 4 alelos respectivamente), se observó que más del 50% de las localidades

fueron estables en el tiempo (6 y 5 localidades respectivamente). Sin embargo, esto también ocurrió en el locus *MT203*, el que presentó un alto número de alelos (27 alelos). Los loci *Mch-UCH01* y *Mgu1*, que también presentaron un alto número de alelos (36 y 27 alelos respectivamente) y se observó menos del 50% de localidades estables en el tiempo (0 y 1 localidades respectivamente). Además, al promediar las medias de los p-value obtenidos en cada localidad se observó homogeneidad en la distribución de las frecuencias alélicas, encontrando estabilidad temporal en el periodo analizado.

Tabla 4.7 Promedio de p-value al comparar la frecuencia de cada alelo entre los años 2009 y 2013 por localidad y por locus.

Locus	Localidades					
	1QI	1PI	1LA	1CN	2CB	3IP
<i>Mch-UCH01</i>	0,0000	0,0001	0,0000	0,0001	0,0000	0,0000
<i>Mch-UCH02</i>	0,0001	0,0917	0,1790	0,2690	0,0002	0,0069
<i>Mch-UCH11</i>	0,3697	0,7370	0,5371	0,5678	0,3675	0,0031
<i>Mch-UCH12</i>	0,0384	0,0011	0,0686	0,1841	0,0129	0,0294
<i>Mch-UCH15</i>	0,0817	0,0026	0,2691	0,0001	0,0010	0,0003
<i>Mch-UCH18</i>	0,1479	0,0047	0,0203	0,4959	0,0597	0,0000
<i>Mch-UCH20</i>	0,1184	1,0000	1,0000	0,4975	1,0000	0,3727
<i>Mch-UCH23</i>	0,0608	0,1736	0,5679	0,0494	1,0000	0,0711
<i>Mch-UCH30</i>	0,0054	0,0005	0,0101	0,0150	0,1244	0,0001
<i>Mch-UCH104</i>	0,5429	0,0000	0,0372	0,2924	0,0012	0,0426
<i>Mch-UCH110</i>	0,0219	0,0000	0,0000	0,2319	0,0104	0,0382
<i>MT203</i>	0,3497	0,0057	0,0068	0,3156	0,2095	0,1916
<i>MT282</i>	0,0003	0,2798	0,2632	0,0171	0,0003	0,0000
<i>Mgu1</i>	0,0000	0,0455	0,1699	0,0000	0,0017	0,0042
p-value promedio por localidad	0,1241	0,1673	0,2235	0,2097	0,1992	0,0543

Valores en negrita indican diferencias en la distribución de las frecuencias alélicas entre ambos años ($p < 0,05$)

El parentesco de los individuos en el año 2009, evidenciado en el valor r_{XY} fue bajo, tanto al estimar el parentesco entre pares de individuos pertenecientes a un mismo sitio (0,015) como entre individuos de diferentes localidades (-0,004). De manera similar, en el año 2013 los valores promedio entre los individuos pertenecientes a un mismo sitio (0,013), como entre individuos de diferentes localidades (-0.017) fue bajo.

Tabla 4.8 Valor promedio de parentesco (r_{XY}) entre pares de individuos resultante al comparar localidades 2009 y 2013 basado en 14 loci SRR

r_{XY}	Localidades 2009						r_{xy}	Localidades 2013					
	1QI09	1PI09	1LA09	1CN09	2CN09	3IP09		1QI13	1PI13	1LA13	1CN13	2CN13	3IP13
1QI09	0,013	-0,004	0,013	-0,024	0,001	-0,002	1QI13	-0,055	-0,012	0,099	-0,002	-0,007	-0,087
1PI09		0,002	0,026	-0,026	-0,001	-0,020	1PI13		0,077	-0,030	-0,015	-0,003	0,005
1LA09			0,041	-0,005	0,016	-0,002	1LA13			-0,009	-0,095	-0,049	-0,076
1CN09				-0,026	-0,007	-0,033	1CN13				0,089	0,096	-0,020
2CN09					0,056	0,014	2CN13					-0,079	-0,045
3IP09						0,008	3IP13						0,053

4.4 EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL

4.4.1 ESTRUCTURA POBLACIONAL

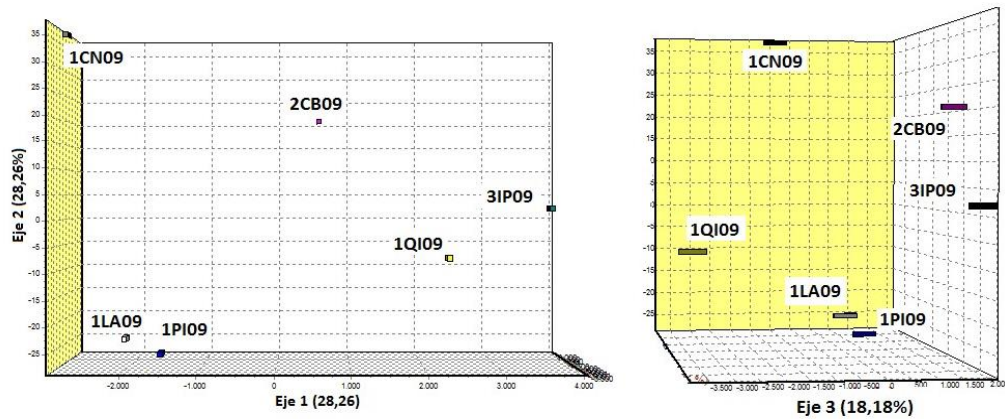
El análisis de correspondencia factorial (AFC) muestra gráficamente la similitud de los genotipos multilocus por localidad en un gráfico tridimensional. En 2009 los tres primeros ejes explican el 74,70% de la variación total de las frecuencias alélicas. El 28,26% de la variación de las frecuencias alélicas de la población es explicada por el eje 1, que separa la localidad de Isla Peel (3IP09) de las demás. El eje 2 explica el 28,26 % de la variación, mientras que el eje 3 explica sólo el 18,18% de esta variación (Figura 4.1.a).

En el caso del año 2013 los 3 ejes explican un 73,42% de la variación total

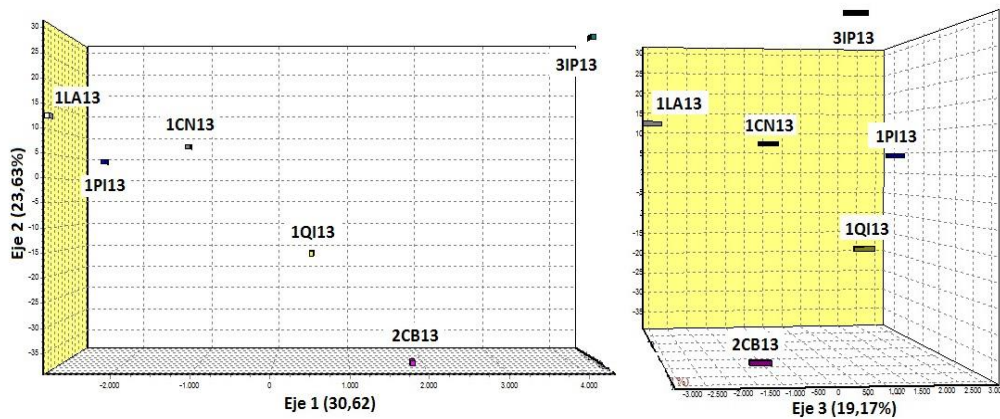
de las frecuencias alélicas. Los ejes 1 y 2 explican una variación de las frecuencias alélicas del 30,62% y 23,63% respectivamente, siendo la localidad de Isla Peel (3IP13) la más alejada de los sitios analizados. El eje 3 explica el 19,17% de la variación observada en las frecuencias alélicas (Figura 4.1.b).

Al analizar en conjunto ambos años, los tres ejes explican el 41,07% de la variación observada de las frecuencias alélicas y no se observó un patrón claro de separación espacial o temporal en las localidades, debido a que ambos años aparecen entremezclados (Figura 4.1.c).

a) Localidades 2009



b) Localidades 2013



c) Localidades 2009-2013

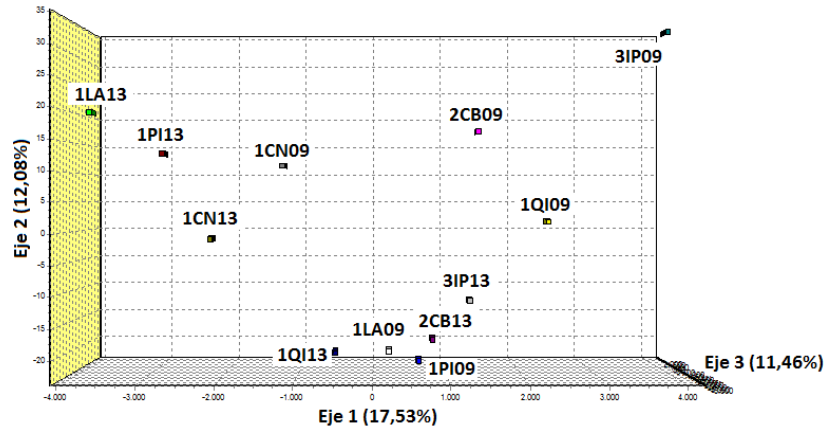


Figura 4.1 Análisis de correspondencia factorial (AFC) en a) 2009, b) 2013 y c) analizando en conjunto ambos años

Los valores de F_{ST} globales en 2009 y 2013 fueron bajos (0,014 y 0,009, respectivamente) pero significativamente distintos de cero ($p < 0,01$) (Tabla 4.6), mostrando una baja diferenciación entre las localidades en ambos años. Esto indica que el 1,42 % y 0,88% de la variación total de las frecuencias alélicas está entre las localidades y por lo tanto que el 98,58 % y 99,12% de la varianza entre las frecuencias alélicas se explicaría por la variación intra-poblacional. Al analizar entre pares de localidades (Tabla 4.9), se observaron diferencias significativas en 11 de las 15 comparaciones realizadas en 2009, el mayor valor de F_{ST} de estas localidades se da entre Caleta La Arena (1LA09) y Canal Coldita-Piedra Blanca (2CN09) (0,025), mientras que en 2013, de las 15 comparaciones realizadas 7 fueron significativas, presentando el mayor valor de F_{ST} entre las localidades de Caleta La Arena (1LA13) e Isla Peel (3IP13) (0,0201). Por lo tanto, se observa una mayor estructuración poblacional en 2009 que en 2013.

Tabla 4.9 Valores de F_{ST} pareados entre poblaciones de *Mytilus* spp del sur de Chile, basado en 14 loci SSR. Poblaciones 2009 por arriba de la diagonal, poblaciones 2013 abajo de la diagonal.

F_{ST}	1QI	1PI	1LA	1CN	2CB	3IP
1QI		0,0077	0,0116	0,0113	0,0245	0,0076
1PI	0,0008		0	0,0099	0,0234	0,0175
1LA	0,0115	0,0050		0,0085	0,0257	0,0208
1CN	0,0046	0	0		0,0180	0,0177
2CB	0,0038	0,0124	0,0159	0,0122		0,0135
3IP	0,0089	0,0174	0,0201	0,0165	0,0059	

Valores en negrita indica valores significativos después de la corrección del método de FDR-BY ($p < 0,015$)

La prueba de Mantel no mostró aislamiento por distancia tanto en los años 2009 ($r = -0,014$; $p = 0,189$) como en 2013 ($r = -0,014$; $p = 0,085$), ya que no hubo correlación entre la matriz de distancia genética ($F_{ST} / (1 - F_{ST})$) y la de distancia geográfica de las 6 localidades en cada año analizado.

Aunque se encontró homogeneidad en la distribución de las frecuencias alélicas, los valores de F_{ST} pareados estimados en 2009 y 2013 (Figura 4.2) no mostraron una correlación significativa, no observándose estabilidad temporal en las zonas en el periodo analizado, específicamente con este tipo de análisis.

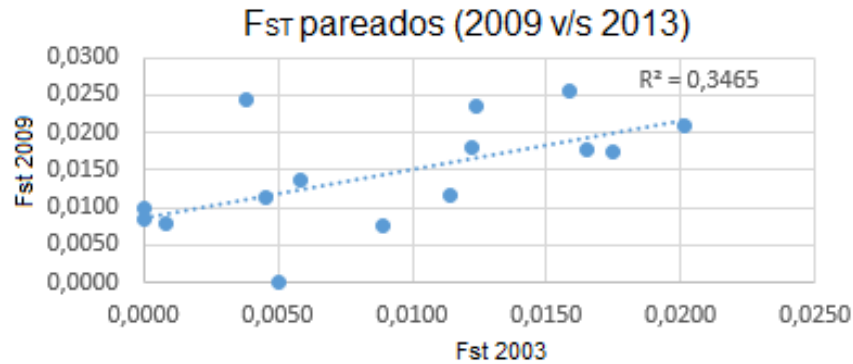


Figura 4.2 Diagrama de dispersión de valores F_{ST} entre pares de localidades de 2009 v/s 2013, no hay correlación significativa (test de Mantel $p > 0,05$). La estabilidad temporal se reflejaría en la proximidad de los puntos a la línea 1:1 (línea punteada). La relación no fue significativa (prueba de Mantel) en $p < 0,05$.

Los dendrogramas no enraizados de los años 2009 (Figura 4.3.a) y 2013 (Figura 4.3.b), no mostraron localidades más separadas unas de otras. Los valores de bootstrap que indican la confianza de los nodos, fluctuaron entre 96 y 47. Se eligió este tipo de dendrograma porque representa mejor las relaciones entre grupos parcialmente mezclados como es frecuente en organismos marinos, ya que no asume relaciones jerárquicas entre ellos (Toro *et al.*, 2009).

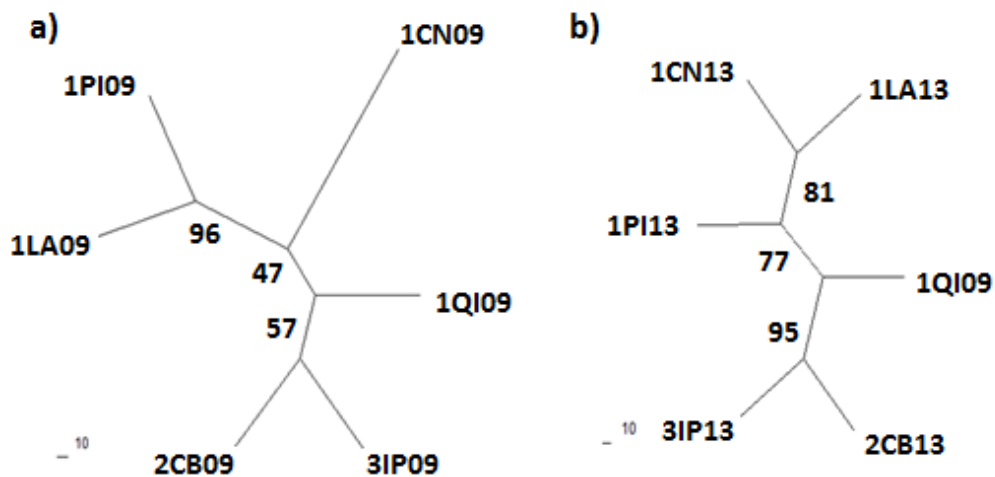
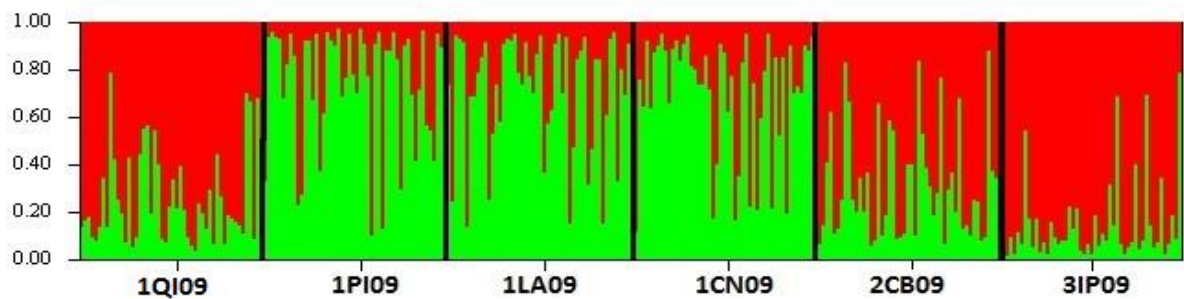


Figura 4.3 Dendrograma no enraizado, construido a partir de la matriz de la distancia genética de Reynolds, en las localidades de a) 2009 y b) 2013.

El análisis de agrupamiento por año realizado con el software STRUCTURE 2.3.4 considerando y sin considerar la información de la localidad de origen, agrupó los individuos en 2 clusters (K=2)

En ambos años se observa una pertenencia proporcional (Q) sobre el 69% en 2009 y 66% en 2013 en el grupo formado por las localidades de Pichicolo, Caleta La Arena y Canutillar. Estos valores son similares a los obtenidos en el grupo formado por las localidades de Quillaipe, Canal Coldita-Piedra Blanca e Isla Peel presentando una pertenencia sobre el 68% en 2009 y 66% en 2013 (Figura 4.5 ; Tabla 4.10).

a) Localidades 2009



b) Localidades 2013

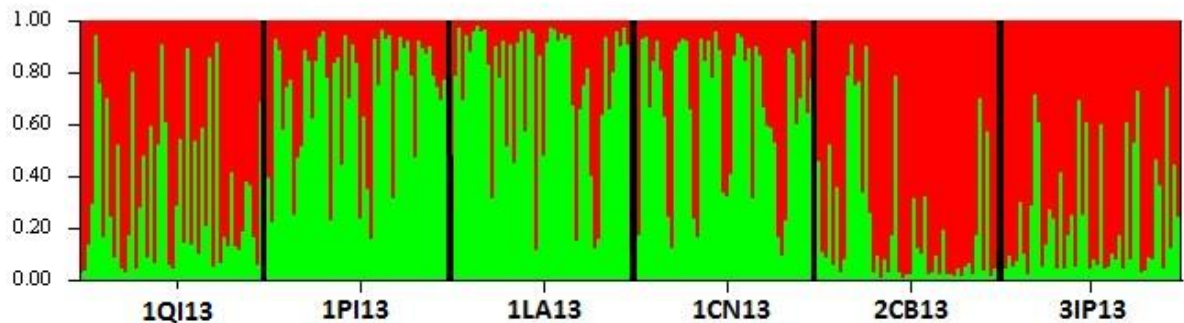


Figura 4.5 Pertenencia proporcional (Q) de cada individuo en las 6 localidades o grupos identificados por STRUCTURE 3.3.4 en las localidades de a) 2009 y b) 2013.

Tabla 4.10 Proporción de individuos de cada una de las localidades de 2009 y 2013 predefinida en los dos grupos establecidos por el software STRUCTURE 3.3.4, considerando la información de localidad de origen.

Localidades 2009	Grupo		Localidades 2013	Grupo	
	1	2		1	2
1QI09	0,737	0,263	1QI13	0,662	0,338
1PI09	0,248	0,752	1PI13	0,283	0,717
1LA09	0,286	0,714	1LA13	0,240	0,760
1CN09	0,306	0,694	1CN13	0,334	0,666
2CB09	0,683	0,317	2CB13	0,782	0,218
3IP09	0,849	0,151	3IP13	0,764	0,236

Valores en negrita indican el grupo al que fue asignado la mayor cantidad de individuos por localidad

El análisis realizado en AWclust 1.0, agrupo los individuos de las localidades de 2009 y 2013 en un sólo cluster (K=1) (Figura 4.6). Este análisis no encontró diferencias entre las localidades considerando a todos estos individuos como una sola población (población panmíctica).

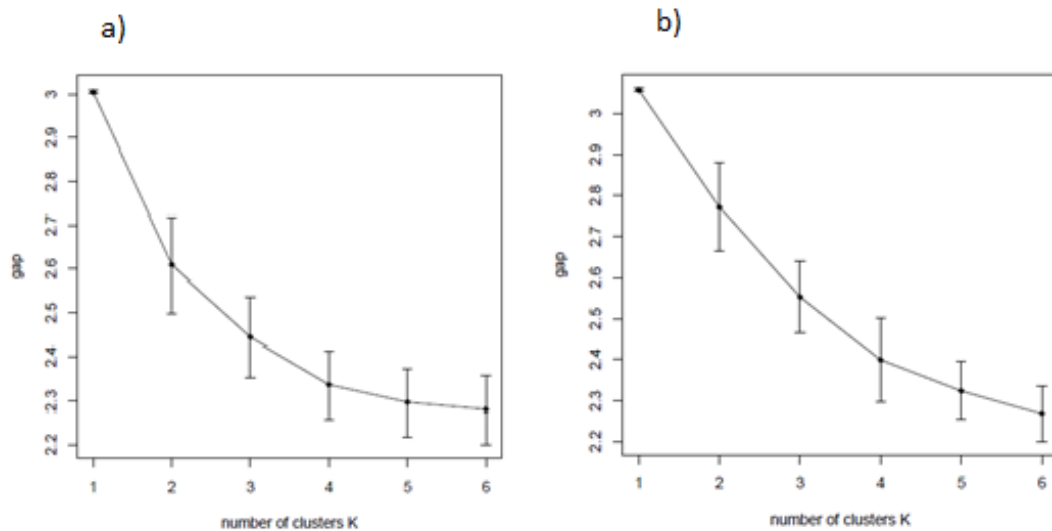


Figura 4.6 Resultados de los grupos identificados por el software AWClust (K=1-6), indicado por el estadístico gap en las localidades de a) 2009 y b) 2013.

El análisis AMOVA jerárquico espacio-temporal (Tabla 4.11) no mostró variación significativa entre las zonas de 2009 y 2013, ni tampoco se mostró variación entre años ($p > 0,05$). Solo se evidenció variación significativa entre las localidades dentro de las zonas de 2013 ($p < 0,05$).

Tabla 4.11 AMOVA jerárquico espacio-temporal entre los años 2009 y 2013

Fuente de Variación	gl	Suma de Cuadrado	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	p-value
2009					
Entre zonas	2	18,966	0,038	1,62	0,0694
Entre las localidades dentro de las zonas	3	11,287	0,015	0,62	0,1154
2013					
Entre zonas	2	14,598	0,017	0,71	0,0645
Entre las localidades dentro de las zonas	3	14,045	0,023	0,92	0,0235*
A través de los años y zonas					
Entre años	1	12,038	-0,006	-0,21	0,4936
Entre zonas dentro de los años	4	36,009	0,043	1,6	0,0000*

* $p \leq 0,05$ se basa en la probabilidad de 1023 pruebas de permutación

4.5 DESEMPEÑO DE LOS MARCADORES SSR

4.5.1 ASIGNACION DE INDIVIDUOS A LOCALIDADES

La asignación correcta de los individuos a localidades realizada con el software GeneClass2 (Piry *et al.*, 2004) fue menor con el método basado en frecuencias (Paetkau *et al.*, 1995) con 100 individuos (33,3%) en 2009 y 101 (33,7%) en 2013 que con el método bayesiano (Rannala & Mountain, 1997), debido a que reubicó correctamente en 2009 (Tabla 4.12) a 119 individuos (39,7%), siendo Canal Coldita-Piedra Blanca (2CB09) e Isla Peel (3IP09) las localidades con mayor número de individuos correctamente reasignados [24 individuos (48%)], mientras que en 2013 (Tabla 4.13) reubicó correctamente a 110 individuos (36,7%), siendo Canal Coldita-Piedra Blanca (2CB13) e Isla Peel

(3IP13) las localidades con mayor número de individuos correctamente reasignados [20 individuos (40%) respectivamente].

Tabla 4.12 Reasignación de individuos de las localidades 2009 basado en método bayesiano (Rannala & Mountain, 1997) implementado en el software GeneClass2.

Localidades 2009	Individuos correctamente reasignados		Individuos incorrectamente reasignados							
	n°	%	1QI09	1PI09	1LA09	1CN09	2CB09	3IP09	n°	%
1QI09	16	32	-	8	7	4	6	9	34	68
1PI09	18	36	6	-	11	6	6	3	32	64
1LA09	18	36	5	16	-	2	5	4	32	64
1CN09	19	38	3	8	7	-	9	4	31	62
2CB09	24	48	4	5	4	8	-	5	26	52
3IP09	24	48	10	2	1	5	8	-	26	52
Global	119	39,7	28	39	30	25	34	25	181	60,3

Tabla 4.13 Reasignación de individuos de las localidades 2013 basado en método bayesiano (Rannala & Mountain, 1997) implementado en el software GeneClass2.

Localidades 2013	Individuos correctamente reasignados		Individuos incorrectamente reasignados							
	n°	%	1QI13	1PI13	1LA13	1CN13	2CB13	3IP13	n°	%
1QI13	18	36	-	7	5	7	10	3	32	64
1PI13	17	34	8	-	8	6	7	4	33	66
1LA13	15	30	2	13	-	12	6	2	35	70
1CN13	20	40	7	7	8	-	5	3	30	60
2CB13	20	40	13	2	4	5	-	6	30	60
3IP13	20	40	7	3	5	6	9	-	30	60
Global	110	36,67	37	32	30	36	37	18	190	63,33

Los índices de calidad de los test de diagnóstico calculados usando los resultados obtenidos con el método bayesiano (Rannala & Mountain, 1997), en 2009 y 2013 fueron estadísticamente similares (χ^2 p=1,00). La sensibilidad promedio por localidad fue de 0,397 y 2013 (0,367), alcanzando su máximo en la localidad de Isla Peel de 2009 (0,480) y 2013 (0,400). La especificidad promedio por localidad fue de 0,875 (2009) y 0,872 (2013), encontrando sus valores más altos en Isla Peel de 2009 (0,900) y 2013 (0,928). En el caso de la razón de verosimilitud promedio fue de 3,260 (2009) y 3,612 (2013), observando que en la localidad de Isla Peel presentó sus valores más altos con 4,80 en 2009 y 5,58 en 2013 (Tabla 4.14).

Tabla 4.14 Número y porcentaje de individuos correctamente reasignados a localidades en 2009 y 2013, sensibilidad, especificidad, probabilidad total de asignación y razón de verosimilitud usando algoritmo bayesiano en el software GeneClass2 (Piry *et al.*, 2004)

a) 2009

Reasignación correcta			Localidades 2009						
n° de individuos	%		1QI09	1PI09	1LA09	1CN09	2CB09	3IP09	Promedio
119	39,7	S	0,32	0,36	0,36	0,38	0,48	0,48	0,40
		E	0,89	0,84	0,88	0,88	0,86	0,90	0,88
		PA	0,75	0,74	0,79	0,84	0,76	0,77	0,77
		LR+	2,86	2,31	3,00	3,06	3,53	4,80	3,26

b) 2013

Reasignación correcta			Localidades 2013						
n° de individuos	%		1QI13	1PI13	1LA13	1CN13	2CB13	3IP13	Promedio
110	36,7	S	0,36	0,34	0,30	0,40	0,40	0,40	0,37
		E	0,85	0,86	0,88	0,86	0,85	0,93	0,87
		PA	0,76	0,77	0,80	0,72	0,77	0,86	0,78
		LR+	2,43	2,58	2,50	2,78	2,70	5,56	3,09

S: Sensibilidad; **E:** Especificidad; **PA:** Probabilidad total de asignación a la categoría; **LR+:** Razón de verosimilitud positivo

4.5.2 RANKING DE MARCADORES SEGÚN SU GRADO DE INFORMACIÓN

El panel total de loci utilizados (14) asignó correctamente en ambos años alrededor del 61% de individuos de zonas de muestreo, mientras que a localidades asignó alrededor del 36% (tabla 4.14). Usando el primer criterio de selección, loci putativos bajo selección positiva (F_{ST} outliers 95% IC), en 2009 sólo el locus *Mgu1* y en 2013 los loci *Mch-UCH02* y *Mch-UCH110*, cumplieron con el criterio establecido (ANEXO VIII). Al usar sólo estos tres loci en ambos años la asignación correcta fue sobre el 40% a las zonas de muestreo y un 24% a las localidades (Tabla 4.15).

Con el segundo criterio ($PIC \geq 0,5$), se seleccionaron en ambos años los mismos 8 loci, presentando una asignación a zonas aproximadamente el 54% y cercano al 32% a localidades. Considerando el número de alelos/locus (≥ 10), el tercer criterio de selección, en 2009 6 loci y en 2013 8 loci cumplieron con el criterio. Al usar sólo estos loci la asignación en ambos años a zonas fue alrededor del 49% y cercano al 26% a localidades.

El cuarto criterio, para maximizar la asignación individual usando un mínimo de marcadores en el software BELS, reflejada en el indicador de desempeño, en 2009 solo 7 loci y en 2013 solo 9 loci fueron los más informativos. Es decir, de ser eliminados reducen el desempeño del panel a valores bajo 0.75. Al usar sólo estos loci la asignación en ambos años a zonas fue alrededor del 54% y aproximadamente el 31% a localidades.

En este estudio en que se trabajó con individuos de 6 localidades, sólo por azar cabe esperar una asignación correcta del 17%. El 61 % de individuos correctamente asignados a zonas indica cierto nivel de estructuración poblacional.

Todos los paneles de loci formados con los distintos criterios utilizados disminuyeron su poder de asignación expresado en el número de individuos correctamente asignados respecto del panel total. Esto indica que, a pesar de que hay loci más informativos que otros, no podemos descartar ningún locus sin disminuir aún más el desempeño del panel, sólo al agregar nuevos loci que sean más informativos podríamos mejorar el desempeño del panel y eventualmente descartar loci que no aportan mayor información.

Tabla 4.15 Individuos correctamente asignados a localidades y a zonas por año con paneles de loci según ranking y criterios

a) 2009

Criterios de Selección	Todos	F_{ST} outliers 95% IC	PIC $\geq 0,5$	N° de alelos/locus ≥ 10	BELS Max Asignación
N° loci seleccionados	14	1	8	6	7
A zonas (%)	62,7	40,2	58,0	53,7	54,7
A localidades (%)	39,7	24,6	36,0	30,0	35,1

b) 2013

Criterios de Selección	Todos	F_{ST} outliers 95% IC	PIC $\geq 0,5$	N° de alelos/locus ≥ 10	BELS Max Asignación
N° loci seleccionados	14	2	8	8	9
A zonas (%)	61,1	48,2	54,7	49,7	56,6
A localidades (%)	36,3	24,1	32,3	26,7	31,3

Al graficar los loci seleccionados utilizando los cuatro criterios (Figura 4.7), en 2009 el locus *Mgu1* se encontró común en todos los criterios, mientras que en

2013 no ocurrió el mismo caso. El locus *Mch-UCH30*, fue común en los criterios de número de alelos/locus y el software BELS en ambos años. A su vez la combinación de criterios PIC, número de alelos/locus y software BELS, presentaron el mayor número de loci en común en ambos años.

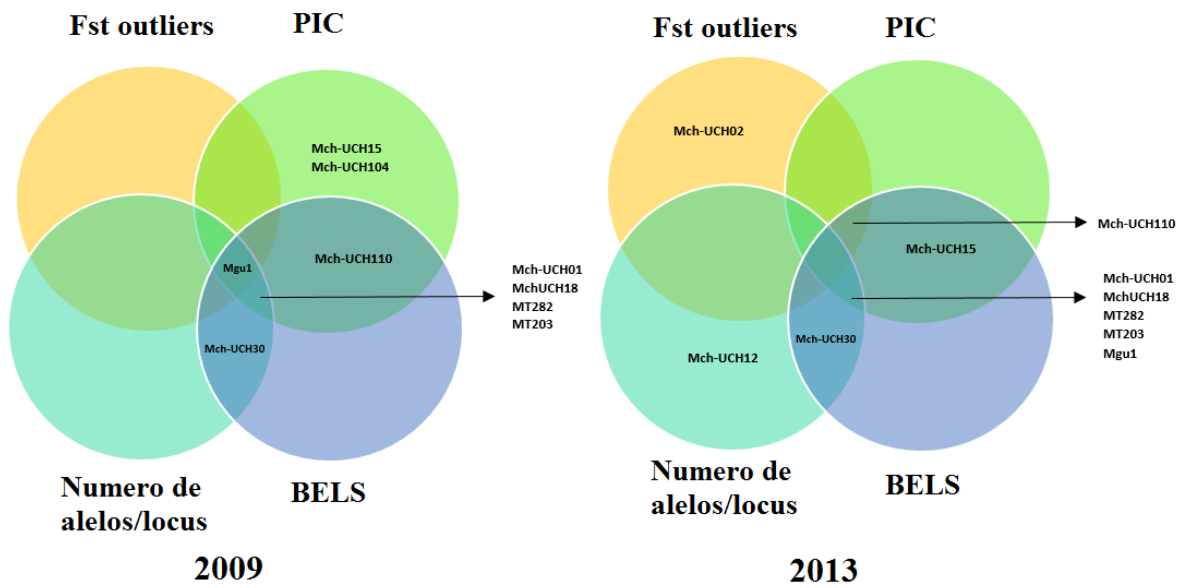


Figura 4.7. Diagrama de Venn de loci seleccionados utilizando los criterios por año.

5. DISCUSIÓN

5.1 OBTENCIÓN, EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES

5.1.1 IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE

La identificación de especie fue necesaria en este estudio debido a que se ha reportado la presencia de otras especies de mitilidos en las costas de Chile como es el caso de *M. galloprovincialis* (McDonald *et al.*, 1991; Daguin & Borsa, 2000; Hilbish *et al.*, 2000; Castilla *et al.*, 2005; Tarifeño *et al.*, 2005; Toro *et al.*, 2005; Gérard *et al.*, 2008; Galleguillos *et al.*, 2009; Astorga & Toro, 2010; Westfall & Gardner, 2010; Tarifeño *et al.*, 2012; Westfall & Gardner, 2013). Para conocer que especie se encuentra presente en nuestra costa se utilizó la pareja de partidores *Me 15-16* desarrollado por Inoue *et al.* (1995) debido a que ha sido utilizado en numerosos trabajos para identificar especies del género *Mytilus* (Toro *et al.*, 2005; Santaclara *et al.*, 2006; Coghlan & Gosling, 2007; Días *et al.*, 2009; Kijewski *et al.*, 2009; Westfall & Gardner, 2010; Fernández-Tajes *et al.*, 2011; Larraín *et al.*, 2012, Tarifeño *et al.*, 2012; Westfall & Gardner, 2013) y porque posee un modo de herencia mendeliana y puede ser usado para identificar inequívocamente la especie en larvas y adultos (Wood *et al.*, 2003). Además los resultados obtenidos usando este marcador en individuos adultos del género *Mytilus* son más consistentes y reproducibles que los obtenidos con el marcador nuclear *Glu - 5'* desarrollado por Rawson (1996). El tamaño de los fragmentos de restricción utilizando la enzima *Acil* en los individuos analizados corresponden con lo descrito por Santaclara *et al.* (2006) para *M. chilensis* (126 pb) donde esta enzima no afecta el tamaño del amplicón.

Como era de esperar, los alelos de *M. chilensis* fueron los más frecuentes en las 6 localidades muestreadas, tanto en 2009 (98,3%) como 2013 (98,7%). No se observó presencia de individuos puros de *M. galloprovincialis*, sólo se

encontró híbrido entre *M galloprovincialis* y la especie nativa. Se ha descrito que *M. galloprovincialis* se distribuye entre el mar Mediterráneo, islas británicas, incluyendo el suroeste de Inglaterra, Irlanda, y el suroeste de Escocia, Europa Continental, norte de África y partes del Pacífico norte (McDonald *et al.*, 1991; Rawson *et al.*, 1999; Días *et al.*, 2009; Daguin & Borsa, 2000; Hilbish *et al.*, 2000; Coghlan & Gosling *et al.*, 2007; Kijewski *et al.*, 2009; Westfall & Gardner 2010; Oyarzún *et al.*, 2016). En toda las localidades donde dos taxones son simpátricos se hibridan y estas zonas híbridadas se caracterizan a menudo por la formación de barreras semipermeable para el flujo de los genes (Rawson *et al.*, 1999; Kijewski *et al.*, 2009).

La especie *M. galloprovincialis* ha sido clasificada como una de las 100 principales amenazas invasoras en el mundo (Lowe *et al.*, 2000), ha tenido un impacto negativo en Nueva Zelanda debido a la introgresión, y ligera hibridación entre los individuos nativos, lo que puede conducir a la extinción del linaje nativo (Wastfall & Gardner, 2013). En nuestro país no se ha considerado aún una amenaza debido a que esta especie se cultiva comercialmente en otros países y porque no se ha encontrado su presencia en bancos naturales en la Región de los Lagos (Castilla *et al.*, 2005; Castilla & Neill, 2009; Larrain, *et al.*, 2012) y Punta Arenas (Larraín *et al.*, 2012). Toro *et al.* (2005) detectaron la presencia de alelos de *M. galloprovincialis* y *M. edulis* con el marcador nuclear *Me* desarrollado por Inoue *et al.* (1995). Sin embargo, ellos no realizaron el análisis de restricción posterior desarrollado por Santaclara *et al.* (2006) a fin de diferenciar el alelo de *M. galloprovincialis* de *M. chilensis*, confundiendo ambas especies y en consecuencia sobreestima la frecuencia de alelos de *M. galloprovincialis* en el sur de Chile. Para confirmar la efectiva presencia de esta especie en el sur de Chile, se debería aumentar los puntos de muestreo, utilizando un mayor tamaño muestral.

Se encontró la presencia de alelos de *M. trossulus* en 2009 y 2013, pero no encontrando individuos puros de *M. trossulus* en las localidades analizadas. La especie *M. trossulus* se encuentra distribuida en el noreste del Pacífico, noroeste del Atlántico y mar Báltico (Vainola y Strelkov, 2010). Toro *et al.*, (2005) realizaron un estudio en toda el área natural de crecimiento de este recurso en Chile, no encontrando evidencia de la presencia de esta especie. Fernández-Tajez *et al.*, (2011) encontraron dos híbridos de *M. chilensis* x *M. trossulus* en conservas de mejillón elaboradas con materia prima chilena basándose en el gen de la proteína adhesiva polifenólica y confirmó su identidad por secuenciación y por PCR-RFLP del gen mitocondrial COI. Larraín *et al.* (2012) describió por primera vez la presencia de alelos de *M. trossulus* en las costas de Chile con el marcador PCR RFLP *Me 15-16*, mientras que en un estudio posterior se informó su presencia en una zona híbrida de *M. chilensis*, *M. edulis* y *M. trossulus* en el estrecho de Magallanes que rodea el puerto internacional de Punta Arenas (Oyarzún *et al.*, 2016). En el último tiempo alrededor del mundo, se han encontrado híbridos de *M. trossulus* en poblaciones naturales y cultivadas de Escocia, Irlanda y Holanda con el nativo *M. edulis*, lo que añade complejidad a las zonas híbridas alrededor del mundo (Dias *et al.*, 2009; Kijewski *et al.*, 2009). Inoue *et al.* (1997), también encontró presencia de híbridos de *M. trossulus* y no de individuos puros en las localidades de Hokkaido y Kyushu en Japón, atribuyéndolos a diferentes causas: puede ser híbridos verdaderos, más adaptados a las condiciones ambientales de las zonas analizadas que los individuos de *M. trossulus* y *M. galloprovincialis* puros. También es posible que el genotipo encontrado sea causado por la introgresión. Puede tener ambos tipos de secuencias en su genoma haploide, y ambas secuencias pueden ser así heredadas siempre a la descendencia.

La baja presencia de alelos de *M. trossulus* también se puede deber a la introducción accidental en el canal Magallánico hacia el Pacífico en los barcos de

transporte a través de agua de lastre, como se ha descrito para otras especies no nativas. Esta especie ha sido asociada a pérdidas económicas significativas en cultivos de *M. edulis* en Canadá (Penney & Hart, 1999) y Escocia (Beaumont *et al.*, 2008) debido a que *M. trossulus* y sus híbridos desarrollan conchas más delgadas y frágiles y a menudo se dañan en el proceso de cosecha y clasificación (Beaumont *et al.*, 2008; Días *et al.*, 2009), también presentan menor contenido comestible y talla al momento de la madurez (Días *et al.*, 2009). En nuestro país, no se ha presentado este tipo de problemas en los cultivos.

No se encontró evidencia de híbridos entre *M. galloprovincialis* x *M. trossulus* ni tampoco de la especie *M. edulis* en las muestras de ambos años. En un estudio realizado por Toro *et al.* (2005) encontraron presencia de individuos puros e híbridos de *M. edulis* en diferentes localidades de la costas del sur de Chile (Canal magallánico, Punta Arenas), no encontrando alelos de esta especie en la Región del Bío Bío. Mientras, en un estudio más reciente realizado por Westfall & Gardner. (2010) encontró la presencia de híbridos en las costas de esta Región (*M. galloprovincialis* x *M. edulis*). Estas discrepancias entre los estudios pueden deberse a diferencias en la recolección de muestras respecto a fechas, lugares (protegido o expuesto), nivel de mareas (sub o intermareal) o talla de los ejemplares, tipo de marcadores utilizados, factores que han demostrado afectar la composición genética de la población (Coghlan & Gosling, 2007).

De acuerdo a los resultados obtenidos con el marcador *Me 15-16 - Acil* RFLP, siendo *M. chilensis* la especie dominante en las costas del sur de Chile, encontrando presencia de alelos de especies no nativas pero en una baja proporción, observando estabilidad temporal en el periodo analizado.

5.2 SELECCIÓN, ESTANDARIZACIÓN Y GENOTIPADO DE SSR

5.2.1 SELECCIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LOCI SSR

Los loci SSR son marcadores moleculares ampliamente utilizados en estudios genéticos a nivel poblacional que permiten realizar análisis a nivel familiar e individual, desarrollando un importante avance en el campo de la genética poblacional (Jarne & Lagoda, 1996; Ellegren, 2004). Se ha visto que para poder realizar tales análisis se requiere entre 6-10 loci para obtener resultados satisfactorios. Sin embargo, la tendencia a incrementar el número de loci SSR conlleva un aumento del gasto, por lo que en ocasiones se emplean estrategias que permiten minimizar estos costes. Una de estas estrategias fue la utilización de un método económico de genotipado descrito por Schuelke. (2000) que utiliza partidores universales que llevan una etiqueta fluorescente en el extremo 5', permitiendo disminuir el tiempo del genotipado, con respecto a la metodologías con geles de acrilamida y/o agarosa. La tecnología de genotipado utilizada disminuyó considerablemente los tiempos de analisis en comparación con el método tradicional de electroforesis en gel de poliacrilamida. Esto favoreció la rapidez y facilitó la interpretación de los resultados disminuyendo los errores de lectura y permitiendo un trabajo más limpio sin la utilización de químicos tóxicos y cancerígenos que pueden ser perjudiciales para las personas y el medio ambiente.

De los 14 loci seleccionados en este estudio, once fueron desarrollados para *M. chilensis* por nuestro grupo de trabajo y tres fueron desarrollados para otras especies de mitílidos por autores extranjeros. Los loci descritos para *M. trossulus* y *M. galloprovincialis* amplifican en el genoma de *M. chilensis* se debe a que las regiones del ADN flanqueantes del SSR se encuentran conservadas entre especies relacionadas lo que permite la transferencia del SSR usando partidores heterólogos (Araneda, 2005).

5.2.2 TAMAÑO Y NÚMERO DE LOS ALELOS EN LOS LOCI SSR

En todos los loci, los tamaños observados fueron semejantes a los publicados (Araneda *et al.*, 2016a), No se observaron variaciones significativas en el número de alelos entre 2009 y 2013. En los loci desarrollados para otras especies de mitílidos si hubo diferencias en el número de alelos, encontrando en este estudio, 27 (2009) y 22 (2013) alelos para el locus *MT 203*, en la literatura se han registrados entre 8 y 19 alelos (Gardeström *et al.*, 2007; Larraín, 2012; Chichero, 2013; Giantsis *et al.*, 2014). En el locus *MT 282* se encontraron 16 (2009) y 20 (2013) alelos, mientras que en otros estudios se han observados entre 4 y 16 alelos (Gardeström *et al.*, 2007; Larraín, 2012; Chichero, 2013; Giantsis *et al.*, 2014). En el loci *Mgu1* se encontró para ambos años 27 alelos, mientras que en otras publicaciones se han encontrado entre 6 y 23 alelos (Presa *et al.*, 2002; Lado-Insua *et al.*, 2011; Larraín, 2012). Comparando nuestros resultados con las demas publicaciones, se observa que el numero de alelos es mucho mayor, favoreciendo la diversidad de genotipado. Esta discrepancia de genotipado entre los mitílidos es posible debido a las distintas regiones donde se realizado el muestreo y las metodologías de genotipado utilizadas (Shahzad *et al.*, 2013), esto pudo variar el numero real de alelos encontrados.

5.2.3 ERROR DE GENOTIPADO

El error de genotipado ocurre cuando el genotipo determinado, después del análisis molecular, no corresponde con el genotipo real del individuo en cuestión (Van de Casteele *et al.*, 2001; Pompanon *et al.*, 2005). Prácticamente cada conjunto de datos obtenidos por genotipado incluye algunos errores y en consecuencia, no pueden pasarse por alto, ya que podrían sesgar considerablemente los resultados finales de un estudio, pero este sigue siendo un tema tabú en la genética poblacional para muchos investigadores (Bonin *et*

al., 2004). Los errores de genotipificación se pueden generar en cada paso del proceso de determinación del genotipo de un individuo: toma de muestras, extracción de ADN, análisis molecular, análisis de datos, entre otros y también pueden generarse por una variedad de factores externos (causas antropogénicas, artefactos técnicos y ambientales). Bonin *et al.* (2004) realizaron una revisión bibliográfica en los estudios publicados en la revista “Molecular Ecology” y de los 125 documentos publicados utilizando marcadores SSR sólo el 6% mencionan claramente la tasa de error encontrada o por lo menos la presencia de alelos falsos, contaminación o cambio del tamaño del alelo.

En este estudio se observó una tasa de error de genotipado de 1,98%, donde la lectura fallida contribuye al 1,28% de error y el cambio en el tamaño del alelo (las lecturas analizadas presentan distinto tamaño alélico) contribuye al 0,70%. Estos resultados son similares a los obtenidos por Bonin *et al.*, (2004) al analizar tejido de oso pardo (*Ursus arctos*) con loci SSR, obteniendo una tasa de error del 0,8%, y al 2% al analizar muestras fecales. Lee-Montero *et al.* (2013), genotipando SSR por PCR-multiplex en el pez “la dorada” (*Sparus aurata*), encontraron un error de genotipado de un 16%.

El error de genotipado encontrado en este estudio fue aceptable según Bonin *et al.*, 2004, por lo que los datos son confiables para los distintos análisis que se realizaron.

Se ha observado errores de genotipado causados por baja cantidad o calidad del ADN que se utiliza en los análisis, lo que da amplificación por PCR poco fiables (Hoffman & Amos, 2005), pero esto es descartado en este estudio debido a que cada una de las muestras cumple con la relación de absorbancia 260/280 nm establecida entre 1,81 y 2,01, y las bandas de ADN que se observaron en los geles de agarosa o en el genotipado con fluorescencia realizado en este estudio fue nítido. Las bandas de tartamudeo también generan errores,

estas son causadas por el deslizamiento de la enzima polimerasa en la amplificación de los alelos SSR a partir de la cadena molde, presentándose en mayor frecuencia en los SSR con repeticiones di y trinucleotidos (Ellegren, 2004; Hoffman & Amos, 2005). De los 14 loci utilizados, 6 presentaron “posible tartamudeo”, pero esto fue descartado debido a que no se encontraba en toda las localidades analizadas.

Se encontró presencia de alelos nulos en distintas localidades de 2009 y 2013, esta presencia es común en las poblaciones naturales de organismos marinos (Bruford & Wayne, 1993; Lado-Insua *et al.*, 2011). Dakin & Avise, (2004), observaron que el 90% de los estudios publicados que han empleado SSR, se han encontrado loci que presentan alelos nulos. En los moluscos, la frecuencia de alelos nulos llega al 40%, aunque se han reportado frecuencias mucho mayores (Chapuis & Estoup, 2007; Hedgecock *et al.*, 2004), particularmente en las especies del genero *Mytilus* la presencia de alelos nulos en SSR ha sido ampliamente descrita (Presa, 2002; Gardeström *et al.*, 2007; Yu & Li, 2007; Lallias *et al.*, 2009; Ouagajjou *et al.*, 2011; Giantsis *et al.*, 2014). También se ha observado que la presencia de alelos nulos aumenta cuanto mayor es la distancia filogenética entre la especie en la que se desarrolló el SSR y la especie en la cual se usa. Esto era esperable en los SSR que fueron desarrollados para *M. trossulus* y *M. galloprovincialis* que en este estudio se usaron para *M. chilensis*.

5.3 EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL

5.3.1 DIVERSIDAD GENÉTICA Y PARENTESCO

Se observaron altos niveles de polimorfismo en cada una de las localidades en 2009 y 2013. De los 14 loci, 8 presentaron un alto valor de PIC >0,5, por lo que son considerados SSR altamente informativos, si bien en cierto

los que cumplieron los criterios del Anexo II, no hubo ninguno que fuera monomorfo, por lo tanto esto la diversidad genética calculada puede verse sobreestimada.

En gran parte de los loci analizados, se encontró déficit de heterocigotos, observando valores de F_{IS} positivos y desequilibrio de H-W, este es un fenómeno frecuente en la genética de poblaciones de bivalvos marinos, que también se ha observado en especies del género *Mytilus* usando alozimas (Carcamo *et al.*, 2005; Toro *et al.*, 2006) y loci SSR (Presa *et al.*, 2002; Lallias *et al.*, 2009; Lado-Insua *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Ouagajjou *et al.*, 2011; Marin *et al.*, 2013; Giantsis *et al.*, 2014). Existen varias explicaciones para el alto porcentaje de F_{IS} positivo y desequilibrio de H-W. Esto se puede atribuir a altos niveles de consanguineidad en la población, producto del apareamiento entre individuos emparentados (endogamia) (Gaffney, 1994), que los locus estén bajo selección, homoplasia (Estoup *et al.*, 2002), aneuploidía (Giatsis *et al.*, 2014), y presencia de alelos nulos (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005) entre otras variables.

La endogamia no sería causa del déficit de heterocigotos encontrado en estas localidades, debido a que esta especie libera los gametos al medio acuático donde ocurre la fecundación, presentando un periodo de desove que puede llegar hasta los seis meses y además una excelente capacidad de sobrevivencia en diversas condiciones ambientales en la fase gamética (Gosling, 2003), esto hace imposible que ocurra una relación de parentesco de esta especie en las zonas analizadas debido a las condiciones biológicas y ambientales. Por lo tanto, no se mostro evidencia que el apareamiento entre individuos sea una causante del déficit de heterocigotos.

En la mayoría de las localidades, en ambos años, se encontró presencia de alelos nulos. Este es un fenómeno frecuente en genética de poblaciones de bivalvos marinos encontrándose en alta frecuencia. Esto se produce cuando

existe una mutación en uno de los sitios de unión de los partidores, impidiendo su unión, lo que genera que uno de los alelos no amplifique, por lo que el individuo es genotipado como un falso homocigoto. Según Vidal *et al.* (2009) y Shields *et al.* (2010), es la razón más conocida para la subestimación de la heterocigocidad en SSR. Presa. (2002) y Gardeström *et al.* (2007) desarrollaron parte de los SSR utilizados y también reportaron déficit de heterocigotos y posible presencia de alelos nulos en algunos loci en *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*. En este estudio la presencia de alelos nulos también podría explicar parte del déficit de heterocigotos en los loci que mostraron desequilibrio de H-W en las 6 localidades de 2009 y 2013. Toro *et al.* (2006), en un estudio de estructura poblacional usando alozimas, también describió déficit de heterocigotos. Este tipo de marcador no es afectado por la presencia de alelos nulos, por lo que está explicación para el déficit de heterocigotos argumentada en estudios poblacionales en *Mytilus* puede no ser la única razón causante de éste hecho.

A pesar de que está ampliamente descrito que la presencia de alelos nulos puede distorsionar los análisis de diferenciación poblacional (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005) se decidió no corregir las frecuencias alélicas para la presencia de alelos nulos ya que ésta puede no ser la única razón causante del déficit de heterocigotos encontrado. Estudios realizados por Gardeström *et al.* (2007), Diz & Presa. (2008) y Giantsis *et al.* (2014) encontraron que la corrección de las frecuencias alélicas para alelos nulos entre poblaciones de *Mytilus* no modificó el resultado de las pruebas estadísticas de diferenciación. De igual manera otros autores como Hauser *et al.* (2006) y Chapuis & Estoup. (2007) demostraron que la presencia de alelos nulos en loci SSR tuvo un efecto menor en la estimación de la diferenciación poblacional, determinación de distancias genéticas y asignación de individuos a poblaciones.

El tamaño muestral es pequeño (n=50) en comparación con el número

de alelos encontrados en algunos loci. Dependiendo del tipo de marcador se necesita un mínimo de 30 a 50 muestras por localidad para permitir estimaciones precisas de frecuencias de los alelos de la población (Ogden & Linacre, 2015). En este caso, se tomo el tamaño mínimo de muestras, sin conocer el número de alelos por locus, encontrando un gran número de alelos de baja frecuencia, por lo que se recomendaría aumentar el número de muestras para determinar mejor la frecuencia de los alelos raros en las poblaciones.

Se ha observado que los altos índices de aneuploidía en los bivalvos (Individuos cuyo número de cromosomas no es normal, debido a un cromosoma extra o ausente como consecuencia de una mutación), principalmente en ostras y vieiras (Teixeira de Sousa *et al.*, 2012) nos llevan a sugerir que este fenómeno también podría contribuir en parte en la deficiencia de heterocigotos en las diferentes especies del género. Para verificar esto se necesitan estudios en esta dirección para aclarar la prevalencia de este fenómeno en *Mytilus* spp.

Se observó estabilidad temporal en las frecuencias alélicas en el periodo 2009 y 2013 ($P < 0,05$), encontrando homogeneidad en la mayoría de los loci. Las frecuencias alélicas en las localidades y zonas analizadas, independientemente de su distancia espacial, fueron similares. Por lo tanto el cultivo de mitilidos no ha afectado la diversidad genética, y por lo tanto la escases de semilla no ha afectado la diversidad de esta especie y sirve para fines de trazabilidad.

5.4 EVALUACIÓN DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL Y SU ESTABILIDAD TEMPORAL

5.4.1 ESTRUCTURA POBLACIONAL

La mayoría de las especies de peces e invertebrados marinos históricamente han sido consideradas panmícticas con estructura genética

limitada debido a la distribución de las larvas pelágicas por las corrientes oceánicas (Araneda *et al.*, 2016b), lo que hace particularmente difícil identificar las unidades de manejo para las especies marinas (Allendorf *et al.*, 2010).

Estudios recientes han demostrado la importancia de conocer la variación genómica para mejorar la estimación de la estructura de la población a escala fina (Limborg *et al.*, 2012; Milano *et al.*, 2014). Los estudios de estructura poblacional de *M. chilensis* son escasos en la literatura, ésta ha sido estudiada con marcadores de tipo RAPD (Toro *et al.*, 2004), alozimas (Carcamo *et al.*, 2005; Toro *et al.*, 2006) y SNP (Araneda *et al.*, 2016b). Larraín (2012) analizó *M. chilensis* en 11 localidades del sur de nuestro país, utilizando 9 loci SSR y encontró una baja diferenciación genética ($F_{ST} = 0,055$). En este estudio también se observó bajos valores de F_{ST} global ($F_{ST\ 2009} = 0,014$; $F_{ST\ 2013} = 0,009$) aunque significativamente distintos de cero ($P < 0,01$). Según Constable, (2014) y Jost, (2008) estos valores sugiere una baja estructura genética con un alto nivel de flujo genético entre las localidades a lo largo de la costa Chilena.

El flujo genético entre estas localidades se ve favorecido por el tipo de reproducción (fertilización externa), por una alta tasa de producción de gametos, por la prolongada etapa pelágica de las larvas (hasta 45 días), y por las condiciones oceanográficas de la zona (Constable, 2014; Toro *et al.*, 2004), presentando un potencial de dispersión que puede llegar a cientos de kilómetros. Estos factores promueven la dispersión y la homogeneidad genética, a pesar de las barreras geográficas naturales presentes en esta zona. La operación de las empresas mitilicultoras, que trasladan juveniles (semilla) desde áreas de captación hacia los centros de engorda ubicados principalmente en el Archipiélago de Chiloé y en Calbuco, favorecen el flujo genético.

Esta homogeneidad genética encontrada también se ha visto en otros invertebrados marinos, en casos como la almeja (*Venus antiqua*) (Gallardo *et al.*,

1998) y la cholga (*Aulacomya ater*) (Mena *et al.*, 2001) los valores de diferenciación fueron mayores a los obtenidos en este estudio ($F_{ST} = 0,107$ y $0,147$ respectivamente), esto podría sugerir que parte de la homogeneidad genética interlocalidades encontrada se atribuiría al traslado de semillas de las zonas de estudio.

No se observó un patrón definido de diferenciación genética (F_{ST}) entre localidades y zonas de muestreo, siendo Isla Peel la localidad más separada del resto. Toro *et al.*, (2004) utilizando marcadores RAPD observaron que la localidad de Punta Arenas fue la más diferenciada, proponiendo como responsable a la corriente de Deriva del Oeste, debido a que al topar con el continente, origina y regula la circulación en las costas de Chile, ya que se divide dando origen al sistema de la corriente de Humboldt y a la corriente del Cabo de Hornos (Gatica *et al.*, 2009).

STRUCTURE mostró solo 2 grupos, pero debido a que gran parte de los loci analizados están en desequilibrio de H-W, no se cumple con uno de los supuestos del software por lo que no es un programa adecuado para analizar estructuración poblacional en este escenario (Falush *et al.*, 2003; Kaeuffer *et al.*, 2007).

Como se ha dicho los marcadores SSR son ideales para el estudio de la estructura y conectividad genética de las poblaciones. Por este motivo han sido usados para estudiar poblaciones de mejillones en la península Ibérica (Diz & Presa, 2008; Diz & Presa, 2009), costa oeste de Canadá (Shields *et al.*, 2011), Nueva Zelanda (Wei *et al.*, 2013) y centro y oriente del Mediterráneo (Giantsis *et al.*, 2014), revelando diferentes grados de estructuración y flujo genético en ellas. En el caso de la península Ibérica los niveles de diferenciación fueron mayores ($F_{ST} = 0,024$ y $0,012$) que los reportados en este estudio, mientras que en el

centro y oriente del Mediterráneo se encontró que las localidades analizadas están cerca de la panmixia. También en Nueva Zelanda, se encontró un alto flujo genético y una baja estructuración. En nuestro estudio se obtuvieron resultados similares, indicando que las barreras geográficas presentes no provocaron diferenciación importante entre las localidades. Sin embargo, en la costa de Canadá, específicamente en el Estrecho de Georgia, se observó una barrera para el flujo de genes debido a las características hidrológicas del lugar.

En los estudios de estructuración poblacional mencionados se usó un número de marcadores SSR que no superaron los 10 marcadores (Wei *et al.*, 2013), siendo menor a los 14 usados en este estudio. Según Vaha & Primmer. (2006), para identificar con precisión la estructura poblacional se necesita un gran número de loci (>50), mientras que Latch *et al.* (2006) en sus simulaciones encontró una alta diferenciación sólo con 10 loci. Por lo tanto, más que tener un gran número de loci para realizar un estudio de genética poblacional se debe tener presente lo informativos que son para así obtener resultados óptimos.

El análisis de varianza molecular (AMOVA), mostró estabilidad temporal en las frecuencias alélicas entre los años 2009 y 2013. Solo se observó una baja pero significativa variación entre las localidades de las zonas de recolección en el año 2013. En este escenario es favorable para trazabilidad, para la asignación de individuos a su origen geográfico, con el propósito de verificar la trazabilidad de *M. chilensis* en el sur de Chile.

5.5 DESEMPEÑO DE LOS MARCADORES SSR

5.5.1 ASIGNACION DE INDIVIDUOS A LOCALIDADES

Los recientes avances en métodos estadísticos y matemáticos para la asignación de individuos a la población, junto con los recursos de hardware de soporte de análisis computacionales existentes, constituyen herramientas

prometedoras que proporcionan probabilidades cuantitativas de asignación para un individuo a cada una de las localidades. Los métodos estadísticos se han aplicado utilizando aproximaciones frecuentistas o de verosimilitud (máxima verosimilitud o métodos bayesianos) (Manel *et al.*, 2005).

Los métodos de asignación se han usado para detectar estructura poblacional en forma más sensitiva que las pruebas tradicionales basadas en frecuencias y F_{ST} . Las poblaciones marinas presentan uno de los patrones más extremos de heterogeneidad espacial y temporal, por lo que modelos basados en F_{ST} que asumen tamaños poblacionales y tasas de migración iguales y constantes, desconocen la realidad demográfica del mar en los análisis genéticos. Los métodos de simulación y bayesianos hacen posible la inclusión de información demográfica y oceanográfica en los estudios genéticos (Selkoe *et al.*, 2008).

Considerando que la pertenencia a priori a cada localidad es de 17% (uno sobre seis), los métodos probados consiguen reasignar correctamente al menos el doble de los individuos esperados por azar, por lo tanto se observa estructuración poblacional. El número de individuos correctamente asignados a localidades utilizando el método bayesiano de Rannala & Mountain (1997), fue similar en las localidades de ambos años. El moderado porcentaje de asignación correcta encontrado en las localidades de 2009 y 2013, no es suficiente para su uso efectivo en trazabilidad.

Para aumentar el rendimiento de asignaciones correctas al nivel requerido para fines de trazabilidad, se debería aumentar el tamaño muestral y el número de marcadores utilizados. Holderegger & Wagner (2008), demostraron que una muestra de 30 individuos fue suficiente para una exitosa asignación. Mientras que Ogden & Linacre (2015), en especies marinas con F_{ST} cercano al

0,1 sugirieron el uso 10 loci SSR y entre 30-50 individuos proporcionan suficiente poder de asignación para identificar el origen de la población. Sin embargo, en poblaciones débilmente estructuradas (F_{ST} alrededor del 0,01-0,05), el número de marcadores necesarios para estimar el origen de muestras desconocidas se elevaría rápidamente. En este estudio el número de individuos utilizados en cada una de las localidades se encuentra dentro de este rango ($n=50$), pero que los F_{ST} globales tanto de 2009 y 2013 presentaron baja estructuración genética (0,014 y 0,009 respectivamente), por lo que aunque el número de marcadores utilizados en este estudio sobrepasa la media planteada y gran parte son polimorficos, no es suficiente para tener éxito de asignación, para los fines de trazabilidad que se buscan.

También otra solución es incorporar un panel de SNPs (Polimorfismo de nucleótido único), los que han recibido mayor atención en el último tiempo debido a su valor potencial para estudios de organismos no modelos y la facilidad de automatización (Storer *et al.*, 2012). Un estudio reciente realizado por Araneda *et al.* (2016 b), utilizó un panel de 58 SNPs en las mismas localidades de este estudio, alcanzando una asignación correcta a zonas superior al 73%, mayor a lo registrado en este estudio con los loci seleccionados. Al igual que los marcadores SSR, los marcadores SNPs, pueden presentar diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones debido a la deriva genética aleatoria, pero debido a su menor variabilidad alélica se requiere un mayor número de marcadores SNP neutros para general la misma potencia de asignación que presentan los marcadores SSR (Ogden & Linacre, 2015). Además, pueden detectar estructura cuando existen bajos niveles de diferenciación poblacional (Ogden, 2008), los marcadores SNPs han sido descritos en la especie *Mytilus* en muestras europeas (Vera *et al.*, 2010; Zbawicka *et al.*, 2012) y chilenas (Araneda *et al.*, 2016b). En peces, estos marcadores también se utilizan para la asignación de origen geográfico en investigaciones de pesca ilegal para aplicaciones

forenses en el proyecto FishPopTrace en Europa (Ogden, 2008; Larrain *et al.*, 2014).

En este estudio, la proporción de asignaciones correctas fue mayor a la esperada por azar, lo que confirma que la estructura poblacional de *M. chilensis* en las zonas analizadas existe como alternativa a la panmixia (Manel *et al.*, 2005).

5.5.2 RANKING DE MARCADORES SEGÚN SU GRADO DE INFORMACIÓN

La selección de un panel de marcadores altamente informativo resulta vital para no perder información ni gastar recursos generando datos redundantes. Algunos marcadores resultan ser mas informativos que otros, y es necesario determinar que criterio resulta mejor para seleccionar aquellos mas informativos (Storer *et al.*, 2012; Helyar *et al.*, 2011). En este caso el criterio que presentó mejor desempeño asignando correctamente individuos a localidades fue PIC, seguido del numero de alelos por locus. Para ambos criterios se asigno un mayor porcentaje en zonas de muestreo que localidades. Se habría esperado que el mejor criterio para la selección de loci mas informativos hubiera sido F_{ST} outliers porque son afectados por el medio ambiente ya que darían cuenta de adaptación local, pero en este estudio tanto el PIC como el numero de alelos por locus presentaron los mejores resultados, esto se puede deber a la naturaleza misma de los SSR, ya que estos marcadores se basan en el polimorfismo.

Al utilizar todo los loci a la vez se obtuvo una mejor reasignación que al eliminar loci que se consideraron menos informativos. Los loci polimórficos mas potentes, demostraron ser altamente informativos ya al ser utilizados en forma individual o en conjunto son responsables de casi la totalidad del poder de reasignación del panel. Al eliminar del panel los marcadores peor rankeados disminuyeron el poder de asignación, por lo que se recomienda mantenerlos a la espera de incorporar loci mas informativos al panel.

La escala de importancia que presenta este tipo de estudios es cada vez mayor y se necesitará de técnicas más eficientes para cumplir con las políticas de gestión existentes en el mercado, presentado mayor calidad y confianza a los consumidores, los que cada día exigen productos que cumplan con las normativas vigentes, eliminando de esta manera el fraude existente en muchos productos de consumo en nuestro país y en el mundo.

6. CONCLUSIONES

M. chilensis es la especie dominante en las costas del sur de nuestro país y fue temporalmente estable.

La diversidad genética y la estructura poblacional fue espacial y temporalmente estable. La estructura poblacional detectada es baja aunque significativa, indicando un alto nivel de flujo genético entre las localidades. Ésto se explica en parte por las condiciones de reproducción, larga fase planctónica de la larva, condiciones oceanográficas, climáticas y por la intensa actividad mitilicultora realizada en la zona.

La mayor diferenciación genética se observó entre los individuos de cada localidad. Las frecuencias alélicas se mantuvieron estables en ambos años, sólo se encontró una variación baja pero significativa entre las zonas de recolección de 2013, la que puede explicarse por condiciones oceanográficas y/o climáticas en ese periodo.

Los loci SSR fueron polimórficos aunque presentaron alto déficit de heterocigotos en las localidades, el alto número de alelos nulos podría ser la principal causa de este déficit.

La reasignación de los individuos a localidades y zonas fue el doble de lo esperado por azar, lo que confirma que hay estructuración poblacional. Sin embargo el desempeño del panel no fue suficiente para fines de trazabilidad por lo que se recomienda complementar el panel con SSR con mayor poder de asignación y con marcadores tipo SNP para aumentar las asignaciones correctas a localidades y zonas, permitiendo su aplicación en el sector mitilicultor.

7. BIBLIOGRAFIA

Allendorf, F., P. Hohenlohe, and G. Luikart. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. *Nat. Rev. Genet.* 11:697–709.

AMICHILE. 2010. Exportación de Moluscos Seleccionados (Exportación y Cultivo).

Andreassen, R., J. Schregel, A. Kopatz, C. Tobiassen, P.M. Knappskog, S.B. Hagen. 2012. A forensic DNA profiling system for Northern European brown bears (*Ursus arctos*). *Forensic Sci. Int. Genet.* 6: 798–809.

Araneda, C. 2005. Marcadores genéticos basados en PCR. El uso de marcadores genéticos moleculares en el mejoramiento genético de peces. Vol 4. Santiago, Chile.

Araneda, C., M. X. Noriega, F. Jilberto, J. Ruiz, C. Jara, F. Lafarga & M. A. Larrain. 2016 a. Development of genome-wide microsatellite resources in a commercially important mussel species (*Mytilus chilensis*). *Animal Genetics.* 47: 387-388.

Araneda, C., M. A. Larrain, B. Hecht & S. Narum. 2016b. Adaptive genetic variation distinguishes Chilean blue mussels (*Mytilus chilensis*) from different marine environments. *Eco. and Evo.* 10.1002/ece3.2110.

Aranguren-Méndez, J. A., R. Roman, W. Isea-Villasmil, Y. Villasmil & J. Jordana. 2005. Los microsatélites (SSR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación. Una revisión. *Archivos Latinoamericanos de producción animal.* 13: 30-42.

Arriegada, G., 2005. Trazabilidad en la miticultura: Un desafío, una oportunidad, *I Curso de Análisis de Riesgo y Trazabilidad para la Miticultura*. Laboratorio de Toxinas Marinas y Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. 24 pp.

Astorga, M., 2008. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura, Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina, edited by F. A. D. P. Y. ACUICULTURA. *Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007*, Puerto Montt, Chile, Roma. 277 -287 pp.

Astorga, M. P. & Toro, J. (2010). Genetic differentiation in *Mytilus* (Mollusca:Bivalvia) in the Chilean coast. In: *XIV Congreso Latinoamericano de*

Genética - ALAG Viña del Mar, Chile.

Astorga, M. P. 2014 Genetic considerations for mollusc production in aquaculture: current state of knowledge. *Frontiers in Genetics*, 5: 1-6.

Astorga MP, Cardenas L, Vargas J (2015) Phylogenetic Approaches to Delimit Genetic Lineages of the *Mytilus* Complex of South America: How Many Species are there? *Journal of Shellfish Research*, 34: 919-930.

Bahamondes, R.I. & J.E. Muñoz. 1998. Manual de cultivo de mitílicos. Tecnoimprensa Color, Valdivia, 16 pp.

Barbutto, M., A. Galimberti, E. Ferri, M. Labra & R. Malandra. 2010. DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus spp.*). *Food Research International*. 43: 376-381.

Beaumont, M. A & D. J. Balding. 2004. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology*. 13: 969-980.

Beaumont, A. R., M.P. Hawkins, F. L. Doig, I. M. Davies & M. Snow. 2008. Three species of *Mytilus* and their hybrids identified in a Scottish Loch: natives, relicts and invaders? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 367:100-110.

Belkhir, K., P. Borsa, J. Goudet. L. Chikhi & F. Bonhomme. 1996. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations., *Laboratoire Génome Populations, Interactions CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II. Montpellier, France.*

Belkhir, K., V. Castric & F. Bonhomme. 2002. Program Note IIDENTIX: a software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Molecular Ecology Notes*. 2: 611-614.

Bonin, A., E. Bellemain, E. Bronken, P. Eidesen, F. Pompanon, C. Brochmann & P. Taberlet. 2004. How to track and assess genotyping error in population genetics studies. *Molecular Ecology*, 13:3261-3273.

Borsa, P., V. Rolland & C. Daguin-Thiebaut. 2012. Genetics and taxonomy of Chilean smooth-shelled mussels, *Mytilus spp.* (Bivalvia: Mytilidae). *C. R. Biol.* 335: 51-61.

Bruford, M. W. & R. K. Wayne. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3, 939–943.

- Cabezas, M. 2007. Rastreado la Trazabilidad en Salmonicultura, *Salmociencia*. Intenal de SalmonChile. 16 pp.
- Caporale, V., A. Giovannini, C. DiFrancesco & P. Calistri. 2001. Importance of the Traceability of Animals and Animal Products in Epidemiology. *Scientific and Technical Review of the Office International of Epizooties*. 372 – 378 pp.
- Carcamo, C., A. S. Comesana, F. M. Winkler & A. Sanjuan. 2005. Allozyme identification of mussels (Bivalvia : Mytilus) on the Pacific coast of South America. *Journal of Shellfish Research*. 24: 1101-1115.
- Castilla, J. C., M. Uribe, N. Bahamonde, M. Clarke, R. Desqueyroux-Faundez, I. Kong, H. Moyano, N. Rozbaczylo, B. Santelices, C. Valdovinos & P. Zavala. 2005. Down under the southeastern Pacific: Marine non-indigenous species in Chile. *Biological Invasions*. 7:213-232.
- Castilla, J. C. & P. E. Neill. 2009. Marine bioinvasions in the southeastern Pacific: status, ecology, economic impacts, conservation and management. *Biological invasions in marine ecosystems*. 204: 439–457.
- Chapuis, M. & A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24: 621-631.
- Chichero, D. 2013. Validación de ocho marcadores microsatélites para el análisis genético de *Mytilus chilensis*. Memoria para optar el título profesional de Médico Veterinario. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 31 pp.
- Clasing, E., A. Oñate & H. Arriagada. 1998. Cultivo de choritos en Chile. Imprenta Universitaria, Valdivia, 36 pp.
- Coghlán, B. & E. Cosling. 2007. Genetic structure of hybrid mussel populations in the west of Ireland: two hypotheses revisited. *Mar. Biol.* 150:841-852.
- Colonna, V., T. Natile R. R. Ferrucci G. Fardella M. Aversano & G. Barbujani. 2009. Comparing population structure as inferred from genealogical versus genetic information. *Eur. J. Hum. Genet.* 17:1635–1641.
- Constable, H. B. 2014. Population structure, temporal stability and seascape genetics of two endemic New Zealand Pleuronectiformes, *Rhombosolea plebeai* (sand flounder) and *R. leporina* (yellowbelly flounder). The requirement for the degree of Doctor of Philosophy in Marine Biology. Victoria University of Wellington. 189 pp.
- Cunningham E. P. & C. Meghen. 2001. Biological identification systems: genetic

markers. *Rev. Sci Tech.* 20:491-499.

Daguin, C. & P. Borsa. 2000. Genetic relationships of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck populations worldwide: evidence from nuclear-DNA markers. Geological Society, London, *Special Publications*. 177: 389-397.

Dakin, E. E. & J. C. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93: 504–509.

Dalvit, C., M. De Marchi & M. Cassandro. 2007. Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science*. 77: 437-449

Dias, P. J., A. Dordor, S. Tulett, S. Piertney, I. Davies & M. Snow. 2009. Survey of mussel (*Mytilus*) species at Scottish shellfish farms. *Aquaculture Research*. 40:1715-1722.

Díaz, E. 2010. Mitílidos de la región de Los Lagos: Condiciones de trabajo en la industria del chorito. Dirección del Trabajo, departamento de estudios, cuaderno de investigación n° 38. Santiago. Chile. 182 pp.

Díaz, F. N., C. Araneda, P. Iturra & R. Neira. 2005. El uso de marcadores genético moleculares en el mejoramiento genético de peces. *Serie de publicaciones para la Acuicultura* Vol. 4. Santiago, Chile. 64 pp.

Diz, A. P., & P. Presa. 2008. Regional patterns of microsatellite variation in *Mytilus galloprovincialis* from the Iberian Peninsula. *Marine Biology*. 154: 277–286.

Earl, D. A. & B. vonHoldt. 2011. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genet. Resour.* 4: 359-361.

Ellegren, H., 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature* 5: 436-445.

Estoup, A., P. Jarne & J. Cornuet. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*. 11: 1591-1604.

Estoup A. & B. Angers. 1998. Microsatellites and minisatellites for molecular ecology: theoretical and empirical considerations. In: *Advances in molecular ecology* (Carvalho G. ed) Amsterdam: IOS Press; 55-86.

Estoup, A., F. Rousset, Y. Michalakis, J.M. Cornuet, M. Adriamanga & R. Guyomard. 1998. Comparative analysis of microsatellites and allozyme markers:

a case study investigating microgeographic differentiation in Brown trout (*Salmo trutta*). *Mol. Ecol.* 7:339-353.

Excoffier, L., G.Laval & S. Schneider 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online.* 1:47-50.

Falush, D., M. Stephens & J. Pritchard. 2003. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics.* 164: 1567-1587.

FAO, 2005 National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - Chile. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets, Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO.

FAO, 2011 Estadísticas de Pesca y Acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), Roma, Italia.

FAO, 2016. Global Statistical Collections. <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>
Accession date: 20.11.2016.

FAO, 2003. Garantía de la Inocuidad y Calidad de los Alimentos: Directrices para el Fortalecimiento de los Sistemas Nacionales de Control de los Alimentos. 94 pp.

Frankham, R. 2003. Genetics and conservation biology. *C.R. Biologies.* 326: S22-S29.

Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* 126: 131-140.

Felmer, R., R. Chávez, A. Catrileo & C. Rojas. 2006. Tecnologías actuales y emergentes para la identificación animal y su aplicación en la trazabilidad animal. *Arch Med Vet* 38: 197-206.

Felmer, R., B. Sagredo, R. Chávez, H. Iraira, C. Folch, L. Parra, A. Catrileo & M. Ortíz. 2008. Implementation of a molecular system for traceability of beef based on microsatellite markers. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 68(4): 342-351.

Felsenstein, J. 2009. Phylogeny inference package PHYLIP, version 3.69. Department of genome sciences and department of biology. University of Washington, Seattle WA.USA.

Fernandez-Tajes, J. A. Longa, J. Garcia-Gil, Y. Chiu & S. Huang. 2011. Alternative PCR-RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification. *European Food Research and Technology*. 233: 791-796.

Feral, J. P. 2002. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 268:131-145.

GAA. 2013. Global Aquaculture Alliance. Best Aquaculture practices certification. Mussel Farms. *BAP Standards, Guidelines*.

Gaffney, P. M. 1994. Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: more light? In: A. R. Beaumont, editor. Genetics and evolution of aquatic organisms. London: Chapman and Hall. 146–153 pp.

Gallardo, M. H., L. Peñaloza & E. Clasing. 1998. Gene flow and allozymic population structure in the clam *Venus antiqua* (King of Broderip), (Bivalvia, Veneriidae) from Southern Chile. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 230: 193-205.

Galleguillos, R., Tarifeño, E. & Ferrada, S. (2009). Las especies de mitílidos en las costas de Chile. *Foro Ac. Rec Mar. Rias Gal*, vol. 11. 505-506 pp.

Gao, X. & J. Starmer. 2008. AWclust: Point-and-click software for non-parametric population structure analysis. *BMC Bioinformatics*. 9:77.

García, X. 2009. Mitílidos. Punto de inflexión. Aqua.

Gardestrom, J., R.T. Pereyra, & C. André. 2007. Characterization of six microsatellites loci in the Baltic blue mussel *Mytilus trossulus* and cross-species amplification in North sea *Mytilus edulis*. *Conservation Genetic*. 9: 1003-1005.

Gatica, C., R. Quiñones, D. Figueroa, R. Wiff, E. Navarro & M. Donoso. 2009. Asociación entre la Corriente de Deriva de los Vientos del Oeste y la abundancia relativa del pez espada (*Xiphias gladius*) frente a la costa de Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 37: 97-105.

Gérard, K., N. Bierne, P. Borsa, A. Chenuil & J. Féral. 2008. Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. mussels from Northern and Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 49: 84-91.

Giantsis, I. A., N. Mucci, E. Randi & T. J. Abatzopoulos. 2014. Microsatellite variation of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in central and Eastern

Mediterranean: genetic panmixia in the Aegean and the Ionian Seas. *J. of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 94: 797-809.

Glaubitz J. G. 2004. CONVERT: A user friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly user population genetic software packages. *Molecular Ecology Notes*. 4: 309-310.

Glover, K. A., M. M. Hansen, & O. Skaala. 2009. Identifying the source of farmed escaped Atlantic salmon (*Salmo salar*): Bayesian clustering analysis increases accuracy of assignment. *Aquaculture*, 290: 37–46.

Gosling, E. M. 2003. Bivalve molluscs. Biology, ecology and culture. Oxford: Fishing News Books.

Guerrero, M. A. 2006. Evaluación Técnica y Económica del Proceso de Cosecha de Choritos en Plataforma Flotante. Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Escuela de Ingeniería Mecánica. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. 78 pp.

Hansen, M. M., D. E. Ruzzante, E. E. Nielsen, D. Bekkevold & K. D. Mesenberg. 2002 Long-term effective population sizes, temporal stability of genetic composition and potential for local adaptation in anadromous brown trout (*Salmo trutta*) populations. *Molecular Ecology*, 11: 2523–2535.

Hartl, D.L. & A. G. Clark. 1989. Principles of Population Genetics, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Hauser, L., T. R. Seamons, M. Dauer, K. A. Naish & T. P. Quinn. 2006. An empirical verification of population assignment methods by marking and parentage data: Hatchery and wild steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) in Forks Creek, Washington, USA. *Molecular Ecology*, 15: 3157–3173.

He, L., Y. Xie, W. Lu, Y. Wang, L. Chen, P. B. Mather, Y. L. Zhao, Y. P. Wang & Q. Wang. 2012. Genetic diversity in three redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*, von Martens) lines developed in culture in China. *Aquaculture Research*, 43(1): 75-83.

Heath, D. D., C. Busch, J. Kelly, D. Y. Atagi. 2002 Temporal change in genetic structure and effective population size in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Ecology*, 11: 197-214.

Hedrick, P. W. 2005. A standardized genetic differentiation measure. *Evolution*. 59: 1633-1638.

Hedgecock, D., G. Li, S. Hubert, K. Bucklin & V. Ribes. 2004. Widespread null

alleles and poor cross-species amplification of microsatellite DNA loci cloned from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Shellfish Res.* 23: 379–385.

Helyar, S. J., J. Hemmer-Hansen, D. Bekkevold, M. I. Taylor, R. Ogden, M. T. Linborg, A. Cariani, G. E. Maes, E. Diopere, G. R. Carvalho, & E. E. Nielsen. 2011. Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources.* 11: 123-136.

Hernández, J.M. & L. González. 1976. Observaciones sobre el comportamiento de mitílidos chilenos en cultivo suspendido. I chorito (*Mytilus chilensis*), Hupe, 1854. *Inv. Pesq. Chile*, 22: 1-50.

Hilbish, T. J., A. Mullinax, S. I. Dolven, A. Meyer, R & K. Koehn. 2000. Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus spp.*): routes and timing of transequatorial migration. *Marine Biology.* 136: 69-77.

Hoffman J. I. & W. Amos. 2005. Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology.* 14:599-612.

Holderegger, R. & H. H. Wagner. 2008. Landscape genetics. *Bioscience* 58:199-207

Holsinger, K. E. & B. S. Weir. 2009. Genetics in geographically structured populations defining. Estimating and interpreting *F_{ST}*. *Nature Rev. Genetics.* 10: 639-650.

Inoue, K., J. H. Waite, M. Matsuoka, S. Odo & S. Harayama. 1995. Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and *M. trossulus*. *Biological Bulletin.* 189: 370-375.

Inoue, K., T. Odo, T. Noda, S. Nakao, S. Takeyama, E. Yamaha, F. Yamazaki & Harayama. 1997. A possible hybrid zone in the *Mytilus edulis* complex in Japan revealed by PCR markers. *Marine Biology.* 128: 91-95.

Jerez, G. & Figueroa, M. 2008. Desafíos y Perspectivas de la repoblación de moluscos bivalvos en Chile. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Ed: A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte. *Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007*, Puerto Montt, Chile. Roma. FAO. Vol. 12: 277-287.

Jacquet, J. & D. Pauly. 2008. Trade secrets: Renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy.* 32: 309-318.

Jarne, P. & P. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Tree* 11 (10): 424-429.

Jaramillo, J.R. & J.M. Navarro. 1995. Reproductive cycle of the Chilean ribbed mussel *Aulacomya ater* (Molina, 1782). *J. Shellfish Res.* 14(1): 165-171.

Jensen, L. F., M. M. Hensen, J. Carlsson, V. Loeschcke & K. L. Mensberg. 2005. Spatial and temporal genetic differentiation and effective population size of Brown trout (*Salmon trutta*, L.) in small Danish rivers. *Conservation Genetics*. 6: 615-621.

Jónsdóttir, O. D. B., A. K. Daniéldóttir & G. Nævdal. 2001. Genetic differentiation among Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in Icelandic waters: temporal stability. *ICES Journal of Marine Science*, 58: 114-122.

Jost, L. 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17: 4015-4026.

Kaeuffer, R., D. Réale, D. W. Coltman & D. Pontier. 2007. Detecting population structure using STRUCTURE software: effect of background linkage disequilibrium. *Heredity*. 99: 374-380.

Kijewski, T., J. W. Wijsman, H. Hummel, & R. Wenne. 2009. Genetic composition of cultured and wild mussels *Mytilus* from the Netherlands and transfers from Ireland and Great Britain. *Aquaculture*. 287: 292-296

Koreth, J., J. O'leary & J. McGee. 1996. Microsatellites and PCR Genomic Analysis. *J. Pathol.* 178: 239-248.

Krapivka, S., J. E. Toro, A. C. Alcapan, M. Astorga & P. Presa. 2007. Shell-shape variation along the latitudinal range of the Chilean blue mussel *Mytilus chilensis* (Hupe 1854). *Aquaculture Research* 38: 1770-1777.

Lado-Insua, T., M. Perez, A. P. Diz & P. Presa. 2011. Temporal estimated of genetic diversity in some *Mytilus galloprovincialis* populations by the prestige oil-spill. *Continental Shelf Research*. 31:466-475.

Lallias, D., R. Stockdale, P. Boudry, S. Lapégué & A. R. Beaumont. 2009. Characterization of ten microsatellite loci in the blue mussel *Mytilus edulis*. *J. of Shellfish Res.* 28: 547-551.

Larrain, M. A. 2012. Utilizacion de marcadores geneticos moleculares en calidad e inocuidad de alimentos, aplicacion de trazabilidad y denominacion de origen

geografico de *Mytilus Chilensis*. Tesis para optar al grado de doctor en ciencias y tecnología de los alimentos. Universidad de Santiago de Chile. Santiago de Chile. 101 pp.

Larrain, M. A., N.F. Diaz, C. Lamas, C. Uribe, C. Araneda. 2014. Traceability of mussel (*Mytilus chilensis*) in southern Chile using microsatellite molecular markers and assignment algorithms. Exploratory survey, *Food Res. Int.* 62:104-110.

Larsen, P. F., M. M. Hansen, E. E. Nielsen, L. F. Jensen & V. Loeschcke. 2005. Stocking impact and temporal stability of genetic composition in a brackish northern pike population (*Esox lucius* L.), assessed using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Heredity.* 95: 136-143.

Latch, E. K., G. Dharmarajan, J. C. Glaubitz, & O. E. Rhodes. 2006. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conserv Genet.* 7:295-302.

Lenstra, J. A., L. F. Groeneveld, H. Eding, J. Kantanen, J. Williams, E. L. Nicolazzi, J. Solkner, H. Simianer, E. Ciani, J. F. Garcia, M. Bruford, P. Marsan & S. Weigend. 2011. Molecular tools and analytical approaches for the characterization of ten microsatellite loci in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Shellfish Research.* 28: 547-551.

Li, J., G. Wang & Z. Bai, 2009. Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) estimated by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 287(3): 286-291.

Limborg, M. T., S. J. Helyar, M. De Bruyn. 2012. Environmental selection on transcriptome-derived SNPs in a high gene flow marine fish, the Atlantic herring (*Clupea harengus*). *Mol. Ecol.* 21:3686–3703.

Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. Zipursky, P. Matsudaira & J. Darnell. 1995. Molecular cell biology. *Third edition.* Scientific American Brooks. Inc. New York.

Lopez, M., P. Mallorquin & M. Vega. 2003. Tecnologías Moleculares de Trazabilidad Alimentaria. Informe de Vigilancia Tecnológica. Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica/Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

Lowe S., M. Browne, S. Boudjelais, M. De Poorter M. 2000. 100 of the world's worst invasive alien species: A selection from the global invasive species database. Published by The Invasive Species Specialist Group (ISSG), a

specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), pp. 12.

Mundo Acuicola Pesquero, 2013. Patagonia Mussel: La reinención de la miticultura chilena para conquistar los mercados mundiales. Disponible en: <http://www.mundoacuicola.cl/comun/?modulo=3&cat=1&view=1&idnews=318>.

Maldini, M. F. N. Marzano, G.G. Fortes, R. Papa & G. Gandolfi. 2006. Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. *Aquaculture* 261: 487-494.

Manel, S., O. Gaggiotti & R. Waples. 2005. Assignment methods: Matching biological questions techniques with appropriate. *Trends in Ecology & Evolution*, 20 (3): 136-142.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 27: 209-220.

Marin, A., T. Fujimoto & K. Arai. 2013. Genetic structure of the Peruvian scallop *Argopecten purpuratus* inferred from mitochondrial and nuclear DNA variation. *Marine Genomics* 9: 1-8.

Matschiner, M. & W. Salzburger. 2009. TANDEM: Integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*. 25(15): 1982-1983.

McDonald, J. H., R. Seen & R. K. Koehn. 1991. Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern Hemispheres. *Marine Biology*. 111: 323-333.

Mena, C., C. González, E. Clasing, & M. Garllardo. (2001). Variabilidad genética en *Aulacomya atra* (MOLINA, 1782) en el sur de Chile. *Revista Ciencia y Tecnología del Mar*, 24: 71-79.

Metzgar D., J. Bytof & C. Wills. 2000. Selection against frameshift mutations limits Microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Res*. 10: 72-80.

Milano, I., M. Babbucci, A. Cariani. 2014. Outlier SNP markers reveal fine-scale genetic structuring across European hake populations (*Merluccius merluccius*). *Mol. Ecol*. 23:118-135.

Millions, D. G. & B.J. Swanson. 2006. An application of Manel's model: detecting bobcat poaching in Michigan, *Wildl. Soc. Bull*. 34: 150-155.

Negrini, R., Nicoloso, L., P. Crepaldi, E. Milanese, R. Marino, D. Perini, L. Pariset, S. Dunner, H. Leveziel, J. L. Williams & P. Ajmone Marsan. 2008. Traceability of four European Protected Geographical Indication (PGI) beef products using Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) And Bayesian statistics. *Meat Science*. 80: 1212-1217.

Nielsen, E. E, M. M. Hansen & V. Loeschcke. 1997. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*. A comparison of genetic composition over 60 years. *Molecular Ecology* 6: 487-492.

Nielsen, E. E., B. R. MacKenzie, E. Magnussen & D. Meldrup. 2007. Historical analysis of Pan I in Atlantic cod (*Gadus morhua*): temporal stability of allele frequencies in the southeastern part of the species distribution. *Can. J. Fish Aquat Sci.* 64: 1448-1455.

Nikitina, T. & S. Nazarenko. 2004. Human Microsatellites: Mutation and Evolution. *Russ. J. Genet.* 4(10): 1065-1079.

Ogden, R. 2008. Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries*. 9: 462-472.

Ogden, R., N. Dawnay, R. McEwing. 2009. Wildlife DNA forensics- bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endang Species Res.* 9: 179-195.

Ogden, R. & A. Linacre. 2015. Wildlife forensic science: A review of genetic geographic origin assignment. *Forensic Science International: Genetics*. 18: 152-159.

Ouagajjou, Y., P. Presa, M. Astorga & M. Perez. 2011. Microsatellites of *Mytilus chilensis*: A Genomic Print of Its Taxonomic Status within *Mytilus Sp.* *Journal of Shellfish Research*. 30: 325-330.

Østergaard. S., M. M. Hansen, V. Loeschcke, E. E. Nielsen. 2003. Long-term temporal changes of genetic composition in brown trout (*Salmo trutta* L.) populations inhabiting an unstable environment. *Molecular Ecology* 12: 3123-3135.

Oyarzún, P. A., J. Toro, R. Jaramillo, R. Guiñez, C. Briones & M. Astorga. 2011. Ciclo gonadal de chorito *Mytilus chilensis* (Bivalvia: Mytilidae) en dos localidades del sur de Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 39(3): 512-525.

Oyarzun, P. A., J. Toro, O. Garrido, C. Briones & R. Guiñez. 2014. Differences in

sperm ultrastructure between *Mytilus chilensis* and *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mytilidae): could be used as a taxonomic trait?. *Lat. Am. J. Aquat.* 42(1): 172-179.

Oyarzún, P. A., J. E. Toro, J. I. Cañete, and J. Gardner. 2016. Bioinvasion threatens the genetic integrity of native diversity and a natural hybrid zone: smooth-shelled blue mussels (*Mytilus* spp.) in the Strait of Magellan. *Biol. J. Linn. Soc.* 117: 574-585.

Paetkau, D., W. Calvert, I. Stirling & C. Strobeck. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4(3): 347-354.

Palumbi, S. R., G. Grabowsky, T. Duda, L. Geyer & N. Tachino. 1997. Speciation and population genetic structure in tropical pacific sea urchins. *Evolution*, 51: 1506-1517.

Park, S. D. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the population genetic effects of selection Ph. D. Thesis. University of Dublin.

Plaza, H., Y. Ortúzar, M. Gonzalez, J. Aros. 2005. Estado de situación y perspectivas de la industria del Chorito. Puerto Montt, Chile. 67 pp.

Page, R. 1996. TreeView an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bioinformatics*. 12: 357-358.

Penney, R.W. & M. J. Hart. 1999. Distribution, genetic structure, and morphometry of *Mytilus edulis* and *M. trossulus* within a mixed species zone. *Journal of Shellfish Research*, 18: 367-374.

Pettitt R. G. 2001. Traceability in the food animal industry and supermarket chains. *Rev. Sci Tech.* 20:587-597.

Piry, S., A. Alapetite, J. Cornuet, D. Paetkau, L. Baudouin & A. Estoup. 2004. GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*. 95(6): 536-539.

Pizarro, L. M. 2008. Informe Final: Consultoría Innovación Tecnológica PTI Industria Mitilidos. Noviembre 2008. 85 pp.

Pompanon, F., A. Bonin, E. Bellemain & P. Taberlet. 2005. Genotyping Errors: Causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*. 6: 847-859

Potvin C. & L. Bernatchez L. 2001. Lacustrine spatial distribution of landlocked

Atlantic salmon populations assessed across generations by multilocus individual assignment and mixedstock analyses. *Molecular Ecology* 10: 2375-2388.

Poulsen, N.A., E. E. Nielsen, M. H. Schierup, V. Loeschke & p. Gronkjaer. 2006. Long-term stability and effective population size in North Sea and Baltic Sea cod (*Gadus morhua*). *Molecular Ecology*. 15: 321-331.

Presa, P. P. & A. Diz. 2002. Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus* spp). *Conservation Genetics*, 3: 441-443.

C.R. Primmer, C. R., M. T. Koskinen, J. Piironen. 2000. The one that did not get away: individual assignment using microsatellite data detects a case of fishing competition fraud, *Proc. R. Soc. B – Biol. Sci.* 267: 1699–1704.

Pritchard, J.K., M. Stephens & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.

Putman, A. & I. Carbone. 2014. Challenges in analysis an interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecology and Evolution*. 22: 4399-4428.

Queller, D. C. & K. Goodnight. 1989. Estimating Relatedness Using Genetic Markers. *Evolution*. 43 (2): 258-275.

Rannala, B. & J. L. Mountain. 1997. Detecting inmigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 94: 9197-9221.

Raymond, M. & F. Rousset. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86 (3): 248-249.

Rawson, P. D., K. L. Joyner, K. Meetze & T. J. Hilbish. 1996. Evidence for intragenic recombination within a novel genetic marker that distinguishes mussels in the *Mytilus edulis* species complex. *Heredity*, **77**: 599–607.

Rawson, P. D., Agrawal, V. & Hilbish, T. J. (1999). Hybridization between the blue mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* along the Pacific coast of North America: evidence for limited introgression. *Marine Biology*, 134 (1), 201-211.

Rego, I., Martínez, A., González-Tizón, A., Vieites, J., Leira, F. & Méndez, J. 2002. PCR technique for identification of mussel species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7): 1780-1784.

Reynolds, J., B. Weir, & C. Cockerham. 1983. Estimation of the coancestry coancestry coefficient: Basic for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105:

767-779.

Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43: 223-225.

Robainas, M. C. 2004. Genética poblacional del camarón rosado *Farfantepenaeus notialis* (Decapoda, Penaeidae): Variación espacio temporal de la diversidad y la estructura genética. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad La Habana. Cuba. 43 pp.

Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 8 (1): 103-106.

Ruiz M., E. Tarifeño, A. Llanos, C. Padgett & B. Campos. 2008. Efectos de la temperatura en el desarrollo embrionario y larval del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). *Rev. De Biol. y Ocean.* 43(1): 51-61.

Ruzzante, D. E., C. T. Taggart, R. W. Doyle & D. Cook. 2001. Stability in the historical pattern of genetic structure of Newfoundland cod (*Gadus morhua*) despite the catastrophic decline in population size from 1964 to 1994. *Conservation Genetics* 2: 257-269.

Santaclara, F., M. Espineira, G. Cabado, A. Aldasoro & N. Gonzalez-Lavin. 2006. Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 8461-8470.

Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature* 5: 62-70.

Schlötterer, C., & B. Harr, 2001. *Microsatellite Instability*. eLS. John Wiley & Sons, Ltd.

Schuelke, M. 2000. An economical method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*. 18: 233-234.

Selkoe, K. A., C. Henzler & S. Gaines. 2008. Seascape genetics and the spatial ecology of marine populations. *Fish and Fisheries*. 9 (4): 363-377.

SERNAPESCA, 2011 Anuario 2010 - Desembarque Total por Especie y Región año 2010.
http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fileinfo&id=5079. Fecha Consulta: 15.11.2013.

SERNAPESCA. 2014. Actividades de fiscalización efectuadas en materia de

pesca y acuicultura en el año 2013. https://www.sernapesca.cl/presentaciones/Informe_Fiscalizaci%C3%B3n_Sernapesca_2013_20140402.pdf. Fecha consulta: 10.04.2015.

SERNAPESCA. 2015. Informe actividades de fiscalización efectuadas en el año 2014.

https://www.sernapesca.cl/presentaciones/Informe_Fiscalizaci%C3%B3n_Sernapesca_2014_20150331.pdf. Fecha consulta: 05.06.2015.

Shahzad, U., M. A. Khan, M. J. Jaskani, I. A. Khan & S. s. Korban. 2013. Genetic diversity and population structure of *Moringa oleifera*. *Conserv. Genet.* 14: 1161-1172.

Shields, J. I., J. W. Heath & D. D. Heath. 2010. Marine landscape shapes hybrid zone in a broadcast spawning bivalve: introgression and genetic structure in Canadian west coast *Mytilus*. *Marine Ecology Progress Series.* 399: 211-223.

Storer, C. G., C. E. Pascal, S. B. Roberts, W. D. Templin, L. W. Seeb. 2012. Rank and Order: Evaluating the Performance of SNPs for Individual Assignment in a Non-Model Organism. *PLoS ONE.* 7: 1-13

Tarifeño, E., R. Galleguillos, J. Gardner, I. Lépéz, D. Arriagada, A. Llanos, S. Astete, S. Ferrada, S. Rodríguez & S. Gacitúa. 2005. Presencia de mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) (Bivalvia, Mollusca) en las costas de la Región del Biobío, Chile. In: *XI Congreso latinoamericano de Ciencias del Mar*. Viña del Mar, Chile.

Tarifeño, E., R. Galleguillos, A. Llanos-Rivera, D. Arriagada, S. Ferrada, C. Canales-Aguirre & M. Seguel. 2012. Erroneous identification of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) as the specie, *Mytilus chilensis* (Hupe 1854) in the bay of Concepcion, Chile. *Gayana* 76: 167-172.

Teixeira de Sousa J., S. Joaquim, D. Matias, R. Ben-Hamadou & A. Leitao. (2012) Evidence of non-random chromosome loss in bivalves: differential chromosomal susceptibility in aneuploid metaphases of *Crassostrea angulata* (Ostreidae) and *Ruditapes decussatus* (Veneridae). *Aquaculture.* 344, 239–241.

Toledo C., 2009. AMICHILE y ProChile avanzan en promoción del mejillón chileno, disponible en: http://www.chiloeweb.com/datos/noticias/Noticias.asp?No_Id=2009209003. Fecha consulta: 11.10.2013.

Toro, J.E. & D. Sastre.1995. Induced triploidy in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Hupe 1854), and performance of triploid larvae. *J Shellfish Res* 14:161-164.

Toro, J. E., A. Alcapán, A. Vergara & J. Ojeda. 2004. Heritability estimates of larval and spat shell height in the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) produced under controlled laboratory conditions. *Aquac Res.* 35:56-61.

Toro, J. E., L. Ojeda, A. Vergara, G. Castro & I. Alcapan. 2005. Molecular Characterization of the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) demonstrates evidence for the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* in Southern Chile. *Journal of Shellfish Research.* 24:1117-1121.

Toro J. E., G. Castro, J. Ojeda & A. Vergara. 2006. Allozymic variation and differentiation in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis*, along its natural distribution. *Gen. And Molec. Bio.* 29: 174-179.

Toro, M. A., J. Fernandez, A. Caballero. 2009. Molecular Characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science.* 120: 174-195.

Toth, G., Z. Gaspari & J. Jurka. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* 10: 967-981.

Troya A. M. 2012. Genética poblacional de la lagartija de lava endémica (*Microlophus bivittatus*) de la Isla de San Cristóbal e islote Lobos, Galápagos-Ecuador, mediante microsatélites: como parte de la línea base para el manejo y conservación. Tesis para optar al magister en Ecología con mención en Ecología Tropical y Manejo de Recursos Naturales. Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador. 110 pp.

Uriarte, I. 2008. Estado Actual del Cultivo de Moluscos Bivalvos en Chile. Estado Actual del Cultivo y Manejo de Moluscos Bivalvos y su Proyección Futura: Factores que Afectan su Sustentabilidad en América Latina. Ed: Ed: A. Lovatelli, A. Farías e I. *Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007.* Puerto Montt, Chile. Roma. FAO. Vol. 12: 61:75.

Vaha, J. P. & C. R. Primmer. 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Mol. Ecol.* 15: 63-72.

Vainola R. & P. Strelkov. 2010. *Mytilus trossulus* in Northern Europe. *Mar Biol.* 1-17.

Van De Castele, T., P. Galbusera & E. Matthysen. 2001. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology.* 10:1539-1549.

Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. Wills & P. Shipley. 2004. Micro-

- checker software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4: 535-538.
- Wasser, S. K., A. M. Shedlock, K. Comstock, E. A. Ostrander, B. Mutayoba, M. Stephens. 2004. Assigning African elephant DNA to geographic region of origin: applications to the ivory trade, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101: 14847-14852.
- Vera, M., B. G. Pardo, A. Pino-Querido, J. A. Álvarez-Dios, J. Fuentes, & P. Martínez. 2010. Characterization of single-nucleotide polymorphism markers in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture Research*, 41: 568-575.
- Wei, K., A. R. Wood & J. P. Gardner. 2013. Population genetic variation in the New Zealand greenshell mussel: locus-dependent conflicting signals of weak structure and high gene flow balanced against pronounced structure and high self-recruitment. *Mar. Biol.* 160: 931-949.
- Weir, B. S. & C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38: 1358 - 1370.
- Westfall, K. & J. A. Gardner. 2010. Genetic diversity of Southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Mytilidae) and the identification of non-indigenous taxa. *Biological Journal of the Linnean Society*. 101:898-909.
- Westfall, K. & J. A. Gardner. 2013. Interlineage *Mytilus galloprovincialis* Lmk. 1819 hybridization yields inconsistent genetic outcomes in the Southern hemisphere. *Biol. Invasions*. 15: 1493-1506.
- Wood, A. R., A. Baumont, D. O. Skibinski & G. Turner. 2003. Analysis of a nuclear-DNA marker for species identification of adults and larvae in the *Mytilus edulis* complex. *J. Mill. Stud.* 69: 61-66.
- Wright, S. 1965. Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 19, 395 - 420.
- Yu, H. & Q. I. Li. 2007. Development of EST-SSRs in the Mediterranean blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Molecular Ecology Notes*, 7(6):1308-1310.
- Zbawicka, M., A. Drywa, B. Śmietanka & R. Wenne. 2012. Identification and validation of novel SNP markers in European populations of marine *Mytilus* mussels. *Marine Biology*, 159: 1347-1362.

8. ANEXOS

ANEXO I Partidores microsatélites diseñados *de novo* para análisis de diversidad genética y trazabilidad en *M. chilensis*, número de acceso GeneBank, motivo repetido, pareja de secuencias partidoras, Tm (°C) y referencia.

Nuevo SSR	GenBank	Motivo repetido	Partidor FORWARD (5'-3')	Partidor REVERSE (5'-3')	Tm (°C)
<i>Mch-UCH01</i>	KJ018288	(AAC)10	ACGGTAAGTACAAGGCGAGATG	ATGAGGGCCTCAGGGAAGATT	57
<i>Mch-UCH02</i>	KJ018289	(GCTGA)5	GGTTTCGTTCCGGTAATGACTT	GCGATCAGACGCAGAGGTA	56
<i>Mch-UCH03</i>	KJ018290	(ATTGA)12	CTGTACAGAATGGCTCTCTT	TGCTTTGGGACCTGATTGT	54
<i>Mch-UCH04</i>	KJ018291	(AACG)11	GAAATAGGGAATGTGTCAAAGAGAT	GTGGCCATGTTGGCGATAAA	56
<i>Mch-UCH05</i>	KJ018292	(GCAA)9	CAAACAAGAAAGGGTAACAAGGCA	TCATCTATATGGCGGGAGGTAGAG	57
<i>Mch-UCH06</i>	KJ018293	(TTGA)6	CACTTGATTGATTGATCGATCTCT	GTGCGTGAGCTATTTGTCACT	56
<i>Mch-UCH07</i>	KJ018294	(GTCC)5	AGGACGAAGAGGAAAGTCAAGA	GAACTACCTTGACTGGCTTGACAC	58
<i>Mch-UCH08</i>	KJ018295	(ATCA)5	GCATGCTAAGAACCCCTGAAAG	TCTGACAACATACAAACATTCCC	53
<i>Mch-UCH09</i>	KJ018296	(GTCC)7	GGGGCGATTATGTTTCTTGGTC	GGACCGTGAAATTGGGGTCAAAG	59
<i>Mch-UCH10</i>	KJ018297	(TTC)6	CATTTGTATTGATGTGTGCATGCG	TTTTAATGCGGTCACCCTGCAA	58
<i>Mch-UCH11</i>	KJ018298	(TTC)5	ACATGTGTAGATGCGCTGTCTG	TCTGACAAGCGGTTTTGGAG	55
<i>Mch-UCH12</i>	KJ018299	(AAT)5	GCGATTATAACCCTGTGCGATT	GTCATAAGTATCCCCTGACATCT	53
<i>Mch-UCH13</i>	KJ018300	(AAT)5	ATCGGCTTAGCAGGGTGAAA	TCCACTTTTCTGTGGAAAGACT	57
<i>Mch-UCH14</i>	KJ018301	(GCG)5	GTCCGTCCGGTTAAAGTTTTGGTC	GAAGCATCCAGGTCTTCACCTTCT	59
<i>Mch-UCH15</i>	KJ018302	(ATA)7	GTGCACAGAAGACTAAGTGTATGA	GATCAAGAGTACCTAACACAACCCT	56
<i>Mch-UCH16</i>	KJ018303	(ATT)7	CATATGACACCGGAAGTAGCA	AGTGAATAGGGAGACAACCTCCTACA	57
<i>Mch-UCH17</i>	KJ018304	(GAA)9	TCTGACAAGCGGTTTTGGAG	ATTTTCAGTGAAGAACGTCTTGG	54
<i>Mch-UCH18</i>	KJ018305	(TGA)6	CATGCAGAAATCAGGCCATTG	CAGTACCACTTAATCCCTTCTCC	55
<i>Mch-UCH19</i>	KJ018306	(CAT)5	TGGGGCAGGTATGGACAAAA	TGAGTGTTATGGTTGCAAAGTTC	54
<i>Mch-UCH20</i>	KJ018307	(ATG)5	ACACAAACCGTCACCTAACCTG	TTCCTGACCGATGGCACAA	56

<i>Mch-UCH21</i>	KJ018308	(AGT)5	GATGGTTTCCGAAGATGCAA	CTCGCGGTTTATCGTAATCTCTTC	56
<i>Mch-UCH22</i>	KJ018309	(GAC)5	CTCCCAAATCAATCCCAACCTTC	CGTATCTCTCGGTTTTGGTTGTCC	57
<i>Mch-UCH23</i>	KJ018310	(CAT)5	ACGGAAATAGCTTCAGTGTCAAAGT	TGTCAATGTCAAGCATCAGACCT	57
<i>Mch-UCH24</i>	KJ018311	(GAC)5	CCCAAATCAATCCCAACCTTCCT	CTCTCGGTTTTGGTTGTCCAGTTT	58
<i>Mch-UCH25</i>	KJ018312	(AAT)6	TGGCCTTAGCAGGGTGAAA	CTAAATTTCTTTGGTGTGGAAAGAC	53
<i>Mch-UCH26</i>	KJ018313	(TTA)9	ACGCGGGAGAAAGAAGTCAA	AGCGACACGTCTTACGGTT	56
<i>Mch-UCH27</i>	KJ018314	(CGT)5	CTCTGCGGTCGTATAAAGCTG	CCAACCTTCCTTTTGTGGTCA	55
<i>Mch-UCH28</i>	KJ018315	(CGC)5	GACCTTTCAAGATACGCACATACG	TGACAGAAAGCTCGACATAGGG	56
<i>Mch-UCH29</i>	KJ018316	(CGA)6	TTACCCACGTCAGATTTGCTC	GGCCATGTGAGCTTTTCTCATC	56
<i>Mch-UCH30</i>	KJ018317	(AAT)6	GTGCCTTTGATACTTTGAACTGTCT	GCCAATGTAAGGTTACGGGTTAT	55
<i>Mch-UCH31</i>	KJ477056	(GTAT)8	CAAGAAGAATGTTTGTATACAG	CAGTAATGGTTCTTGTGATAT	60
<i>Mch-UCH32</i>	KJ477057	(ATTG)8	ATATGAGATGTGCTATGAAAG	GTGTCTGAACGTTATCAATAA	61
<i>Mch-UCH33</i>	KJ477058	(TCGT)11	CAGCTATAGTGAAACAATCAT	TAGAAAATAGGGAATGTGTAC	60
<i>Mch-UCH34</i>	KJ477059	(TTGA)9	ATGTTTATATCTACTTCCCTG	CTGTTATGAAAGTTCCACTAG	60
<i>Mch-UCH35</i>	KJ477060	(CGT)7	GTATATTGCTATCACGTCTG	CTAAAGTTATAGTGCGAAAAC	61
<i>Mch-UCH36</i>	KJ477061	(TAA)7	ATACAGTAAGGTCTTCCCT	ATGGGTCAACTATATATGTTG	60
<i>Mch-UCH37</i>	KJ477062	(TCT)6	CAAAGCAAGTTATATATCGAC	AACTCGTTGTCAATAGTAAAG	60
<i>Mch-UCH38</i>	KJ477063	(CCG)7	TATAGCTTTTAAGAAGTGAGC	TTAATCCTGGTCTGATTATAG	60
<i>Mch-UCH39</i>	KJ477064	(CGG)7	CCTATGAACTAAGTCTTTGAA	CACCTTTCAAATATAAAGC	61
<i>Mch-UCH40</i>	KJ477065	(ACA)7	GACTAGGTTGTCTCAGTGAA	TAGCTAACTGTGTAACCCTAC	60
<i>Mch-UCH41</i>	KJ477066	(ATT)5	CTCTGAACAATTGGTTTTTA	CTTTTGGTCAACCTATACTAG	60
<i>Mch-UCH42</i>	KJ477067	(GAC)6	CTTATATTAAGTTAGAGTGCG	CTCATCATTGTATTCTGACAT	60
<i>Mch-UCH43</i>	KJ477068	(GAC)6	AGTAGTTTCAGAGGAGAAGAT	GAGTTATGGTTCTTGAAAGAT	61
<i>Mch-UCH44</i>	KJ477069	(CTT)5	GGTTTATTATAGTGAAACCAG	TCTCATCCTAGTGCTCCTAC	63
<i>Mch-UCH45</i>	KJ477070	(GTC)5	ATAATGTCATGTGTCTGTCAG	GTAATAATCCTGAAACCATC	60
<i>Mch-UCH46</i>	KJ477071	(TTG)5	CTGAGCGATAGTAATAATTCT	CATAGCAACCTTAAAGTAAA	59
<i>Mch-UCH47</i>	KJ477072	(CGT)6	ATTTTCGTCGTATATTGCTAT	ATTCCTACATGTAAACTGTTG	60
<i>Mch-UCH48</i>	KJ477073	(GAC)5	GTAGTTTCAGAGGAGAAGATT	TGTCCTATATGTATGGAAAAC	60

<i>Mch-UCH49</i>	KJ477074 (TAT)5	ATATCTAAGATTTGACAACGG	CTTAGACAGATGCTTGTTTAT	60
<i>Mch-UCH50</i>	KJ477075 (ACA)7	GACTAGGTTGTCTCAGTGAA	GAAATCAACCTAGCTATATCA	60
<i>Mch-UCH51</i>	KJ477076 (CGT)9	GAATATATGTGCATTCACTGT	TTTTACTAAAGTTAGAGTGCG	61
<i>Mch-UCH53</i>	KT731049 (TC)7	TTCGATCTCTCCTCACCTTCT	AGAGCGAGCTGTGAATGAAT	67
<i>Mch-UCH56</i>	KT731050 (AT)6	TCTGTTTTTCAAGGGAGACAA	TGCTAACTGGCTCGACTCTT	63
<i>Mch-UCH57</i>	KT731051 (TA)6	TGGCAAATCATAACGCATCTT	CACATTTTTCGTGCATTGACA	62
<i>Mch-UCH58</i>	KT731052 (TA)6	TGGACAGTGATTTGTGTGCAT	GAGAGGCCACCAGAGATCAT	68
<i>Mch-UCH61</i>	KT731053 (TA)7	TTTTGCAGTATTTTGGCACA	GCCACATCTCCGTTATATCCT	68
<i>Mch-UCH62</i>	KT731054 (TA)6	TGTCGATATGTCTCGCTCTGA	CCACGTCAGGTATGTTGTCG	68
<i>Mch-UCH65</i>	KT731055 (AT)6	CTCTGACAGTGTTTGCATTT	TTTTCATGGTTCATTGGTCA	60
<i>Mch-UCH66</i>	KT731056 (AC)6	CGTAACCGGGCGTATAAAAA	CATGAACCTCAGCACAAAACA	57
<i>Mch-UCH67</i>	KT731057 (TA)6	CGGTTACAGTGCAGGTGTTT	CAGCGATAAGTGAGCAAGAAA	64
<i>Mch-UCH69</i>	KT731058 (TA)6	CATCCATGTTGGTGTTCTTG	TTTTCGGGCCTATTCATTTG	60
<i>Mch-UCH71</i>	KT731060 (AT)8	TAGGGGTTGCTTGAGCATAA	CAGTCCGTTACAATTTTGTGTTGA	60
<i>Mch-UCH73</i>	KT731062 (TA)6	AACCGTGACAGTAAGAGATGAGG	TGGACGGTACACGAAGACAA	57
<i>Mch-UCH75</i>	KT731063 (GA)6	AACAGGTGTGAGCGACAAGA	TCACACACGCTCTCCTCTCA	68
<i>Mch-UCH77</i>	KT731065 (AT)7	CCGTGGGCACTGTAGATTATG	GCTTTTGAGCAACAAGGACA	62
<i>Mch-UCH83</i>	KT731070 (AT)6	GGGTTCCATTTCCATTTCT	TGTACCCACGAGCCAACCTT	57
<i>Mch-UCH84</i>	KT731071 (AT)8	TGGACGACCTGAATACCAA	GGTGGGCATGTGTTACCTTT	63
<i>Mch-UCH85</i>	KT731072 (AG)6	TGCATATAGATGGATTCAACAAGG	AAGAATCCGTGGAGAACGTG	68
<i>Mch-UCH86</i>	KT731073 (AT)6	CAGAAAGTACCTCCCACGTCA	GGGTATGAAATTTCTTACATTGG	61
<i>Mch-UCH87</i>	KT731074 (TA)9	TTCACATTGCGATAAGACGTG	AACCGAGGTAAACGCATTA	67
<i>Mch-UCH88</i>	KT731075 (TA)7	GGGGAAAACTAACGGTCTT	AAATGGAGGCGAACAAAGAT	63
<i>Mch-UCH91</i>	KT731077 (AT)8	GTAGCCAGGCGTTGTCAAT	GATTGGAGGATCTGGGAAAA	63
<i>Mch-UCH92</i>	KT731078 (TA)6	GCCGAGGAGTACCAAATGAA	GAACCATCCCACGAAACAAG	68
<i>Mch-UCH93</i>	KT731079 (TA)6	TTCTGCAAAGCCAAGTAGACA	GTCAGTTCACATTGGTGCAA	60
<i>Mch-UCH96</i>	KT731080 (TA)6	CAACAACCTTTTGGTGACG	TACAGGACCGATAGCGATGA	66
<i>Mch-UCH97</i>	KT731081 (AT)7	ACCGTGGGCACTGTAGATTA	GCAACAGTTGATAGGTATTTCAAAG	66

<i>Mch-UCH98</i>	KT731082 (TA)8	AGGCAATCATAGGTTTGAACG	CGTGGAGAGAACATGCAAAG	66
<i>Mch-UCH99</i>	KT731083 (AG)6	CATGCATTTCTTTCCCTTCA	CAGAGCGCTTTGAATCAAGT	63
<i>Mch-UCH101</i>	KT731084 (AT)6	GGTATGTCATTTCTTGGGTTTCA	TCGTGTTGGGACAGGTAATG	64
<i>Mch-UCH102</i>	KT731085 (TA)9	TTTTGGTATTTGGAGTTGTTGTG	CCTTGCCTTGCTTTTGACAT	63
<i>Mch-UCH103</i>	KT731086 (AT)8	GCCCCTGGTCTGTTTTCAT	CAGTCGAACTTAGAAATAAATGTGC	62
<i>Mch-UCH104</i>	KT731087 (AT)6	GCAGTTCAAATGGCAGACAA	TTGCTTGTCTTGTGCATAACC	62
<i>Mch-UCH105</i>	KT731088 (TA)6	GTCCCATAACGAAGCTGGAT	CCGTAACTACAGAGGAACATTCA	64
<i>Mch-UCH108</i>	KT731090 (TA)6	GGTCGGGTTGGAGTAATGTA	TCAGTCGTGGTTCATCAACTT	64
<i>Mch-UCH109</i>	KT731091 (AT)6	TTCCAAGAATTGCTACCATCA	GGAGTATTCGAATTTATAGCAGATAC	57
<i>Mch-UCH110</i>	KT731092 (AT)6	TAGCCCCTCTCGCTGTTTT	AGTCCCGGATTAATAGAGAGTACC	61
<i>Mch-UCH111</i>	KT731093 (TA)6	GCAGGTGTTGCTCATTGTTG	TGAGACTTCCCGAGACATGTAG	61
<i>Mch-UCH112</i>	KT731094 (AT)6	TGAGATGGGGACATGATTGA	GGAAATCACATGACCGACAG	60
<i>Mch-UCH113</i>	KT731095 (TA)7	AATGGATTGCGGATGAGAAC	CTTCGACGACCATTCAAACA	63
<i>Mch-UCH114</i>	KT731096 (TG)8	GCGTCTGGCGTATCAAATTA	TGTTCCCTTCTCCTGCATT	63
<i>Mch-UCH115</i>	KT731097 (AT)7	ACCCTCTCTGCGATCTGAAT	GGCGTTAGCTTACTGCCTATG	63

ANEXO II Selección de las condiciones óptimas de amplificación de los loci SSR

Etapas 1

En el caso de secuenciar más de 1 individuo, alinear las secuencias con el software SEQUENCHER y diseñar partidores.

Mandar a hacer los partidores diseñados en dilución mínima. Luego de tener los partidores se amplifica el individuo con el que se realizó la detección de los locus SSR más un control negativo, se ajustan la composición de la mezcla y las condiciones de la reacción de PCR (gradientes de temperatura y tiempo de annealing).

Criterios de elección:

1. Amplificación nítida y clara en gel de agarosa al 1,8%.
2. Presencia de 1 o 2 bandas en agarosa (descartar cuando hay múltiples bandas que no pueden ser eliminadas).

Etapas 2

Para amplificar los loci que aprueban los criterios de la **etapa 1**, se manda a hacer el partidador forward con cola M13, siguiendo el protocolo descrito por Schuelke (2000). Se realiza un PCR agregando a la mezcla un partidador universal M13 marcado con una etiqueta fluorescente (VIC, FAM, PET, y NET), amplificando el individuo con el que se realizó la detección de los loci SSR, más 6 individuos elegidos al azar con un control negativo (usar tiras de 8 tubos de PCR). Se debe ajustar la composición de la mezcla y las condiciones de la reacción de PCR con estos nuevos partidores (gradientes de temperatura y tiempo de annealing).

Criterio de elección:

1. Amplificación nítida y clara en geles de agarosa (1,8%)
2. Presencia de 1 o 2 bandas en geles de agarosa (descartar cuando hay múltiples bandas que no pueden ser eliminadas)
3. Número de individuos amplificados debe ser ≤ 5

Etapa 3

Los amplificados de los loci que aprueban los criterios de la **etapa 2** se mandan a genotipar (tira de 8 tubos de PCR) por secuenciación y posteriormente se analiza el tamaño de los fragmentos analizando los archivos de salida del secuenciador con el software PEAK SCANNER o GENEMAPPER. Se debe anotar el tamaño del alelo en la tabla de resultados de esta etapa (6 individuos), con los mismos decimales que da el software utilizado.

Criterio de elección:

1. Fluorescencia con patrón claro, sin multipeack (dedos)
2. Elección de loci de preferencia polimórficos
3. Numero de lecturas exitosas de los individuos debe ser ≤ 5

Etapa 4

Los loci que pasaron con éxito la **etapa 3**, se amplifican en 36 individuos (poblaciones distintas), incluyendo los 6 individuos utilizados en la **etapa 2** más un control negativo. Se debe anotar el tamaño del alelo en la tabla de resultados de esta etapa (36 individuos), con los mismos decimales que da el software utilizado.

Criterio elección:

1. Corroborar lo establecido en las **etapas 2 y 3**

2. Ver presencia alelos nulos (n° de individuos no amplificados debe ser \leq 5%)

Etapa 5

Los loci que pasaron con éxito la **etapa 4**, se amplifican en todo los individuos de las poblaciones en estudio. Se debe anotar el tamaño del alelo en la tabla de resultados de esta etapa (individuos de las poblaciones), con los mismos decimales que da el software utilizado.

Posteriormente, se utiliza el software TANDEM considerando los individuos de las **etapas 2, 3 y 5** (6, 36 y todo los individuos) para redondear el tamaño de los alelos en número enteros con su motivo repetido correspondiente.

Etapa 6

Para evaluar la calidad del genotipado se comparan individuos hechos más de una etapa (los individuos de la **etapa 2** se compara con los de la **etapa 4** y los de la **etapa 3** con los de la **etapa 4**), para estimar la tasa de error de genotipado como lo describe Bonin *et al.*, 2004.

Las inconsistencias al comparar los genotipos se puede deber:

- a) **Descarte de alelo:** No se consideró el alelo por su tamaño (presencia de dos alelos en la lectura, estos no pueden tener una diferencia de tamaño de más de un 90%) o por presencia de tartamudeo en la lectura.
- b) **Alelo falso:** Considerar un artefacto como alelo
- c) **Contaminación:** Aparece un alelo en el control negativo
- d) **Diferencia en el genotipo:** Cuando se compara dos individuos y en uno aparece como homocigoto y en el otro como heterocigoto.
- e) **Lectura fallida:** Cuando se manda a genotipar un individuo y no da lectura. Considerar si se repite esta situación en todo los loci de ese grupo.

Etapa 7

Los individuos en los que se encontraron algún tipo de error de genotipado (evaluados en la **etapa 6**), se deben repetir su lectura o amplificación correspondiente.

ANEXO III Partidor forward con cola M13 diseñados para los loci microsatélites seleccionados para estandarización.
 N° acceso GenBank, Referencia y fluoróforo asignado.

SSR	N° acceso GenBank	Partidor Forward-M13 (5'-3')	Ref.	Fluoróforo
<i>Mch-UCH01</i>	KJ018288	TGAAAACGACGGCCAGTACGGTAAGTACAAGGCGAGATG	[1]	VIC
<i>Mch-UCH02</i>	KJ018289	TGAAAACGACGGCCAGTGGTTTTCGTTCCGGTAATGACTT	[1]	FAM
<i>Mch-UCH04</i>	KJ018291	TGAAAACGACGGCCAGTGAAATAGGGAATGTGTCAAAGAGAT	[1]	NED
<i>Mch-UCH07</i>	KJ018294	TGAAAACGACGGCCAGTAGGACGAAGAGGAAAGTCAAGA	[1]	NED
<i>Mch-UCH08</i>	KJ018295	TGAAAACGACGGCCAGTGCATGCTAAGAACCCCTGAAAG	[1]	PET
<i>Mch-UCH10</i>	KJ018297	TGAAAACGACGGCCAGTCATTTGTATTGATGTGTGCATGCC	[1]	VIC
<i>Mch-UCH11</i>	KJ018298	TGAAAACGACGGCCAGTACATGTGTAGATGCGCTGTCTG	[1]	VIC
<i>Mch-UCH12</i>	KJ018299	TGAAAACGACGGCCAGTGCATTATAACCCGTGTCGCATT	[1]	PET
<i>Mch-UCH15</i>	KJ018302	TGAAAACGACGGCCAGTGTGCACAGAAGACTAAGTGTATGA	[1]	PET
<i>Mch-UCH16</i>	KJ018303	TGAAAACGACGGCCAGTCATATGACACCGGAAGTAGCA	[1]	PET
<i>Mch-UCH18</i>	KJ018305	TGAAAACGACGGCCAGTCATGCAGAAATCAGGCCATTG	[1]	VIC
<i>Mch-UCH19</i>	KJ018306	TGAAAACGACGGCCAGTTGGGGCAGGTATGGACAAAA	[1]	FAM
<i>Mch-UCH20</i>	KJ018307	TGAAAACGACGGCCAGTACACAAACCGTCACCTAACCTG	[1]	NED
<i>Mch-UCH26</i>	KJ018313	TGAAAACGACGGCCAGTCTAAATTTCTTTGGTGTGGAAAGAC	[1]	VIC
<i>Mch-UCH28</i>	KJ018315	TGAAAACGACGGCCAGTGACCTTTCAAGATACGCACATACG	[1]	PET
<i>Mch-UCH30</i>	KJ018317	TGAAAACGACGGCCAGTGTGCCTTTGATACTTTGAACTGTCT	[1]	VIC
<i>Mch-UCH53</i>	KT731049	TGAAAACGACGGCCAGTTTCGATCTCTCCTCACCTTCT	[1]	VIC
<i>Mch-UCH56</i>	KT731050	TGAAAACGACGGCCAGTTCTGTTTTTCAAGGGAGACAA	[1]	VIC
<i>Mch-UCH57</i>	KT731051	TGAAAACGACGGCCAGTTGGCAATCATAACGCATCTT	[1]	PET
<i>Mch-UCH58</i>	KT731052	TGAAAACGACGGCCAGTTGGACAGTGATTTGTGTGCAT	[1]	NED
<i>Mch-UCH61</i>	KT731053	TGAAAACGACGGCCAGTTTTTGCAGTATTTTGGCACA	[1]	PET

<i>Mch-UCH62</i>	KT731054	TGAAAACGACGGCCAGTTGTCGATATGTCTCGCTCTGA	[1]	FAM
<i>Mch-UCH65</i>	KT731055	TGAAAACGACGGCCAGTCTCTGACAGTGTTTGCATTT	[1]	VIC
<i>Mch-UCH66</i>	KT731056	TGAAAACGACGGCCAGTCGTAACCGGGCGTATAAAAA	[1]	PET
<i>Mch-UCH67</i>	KT731057	TGAAAACGACGGCCAGTCGGTTACAGTGCAGGTGTTT	[1]	NED
<i>Mch-UCH69</i>	KT731058	TGAAAACGACGGCCAGTCATCCATGTTGGTGTTCCTG	[1]	FAM
<i>Mch-UCH71</i>	KT731060	TGAAAACGACGGCCAGTTAGGGGTTGCTTGAGCATAA	[1]	FAM
<i>Mch-UCH73</i>	KT731062	TGAAAACGACGGCCAGTAACCGTGACAGTAAGAGATGAGG	[1]	VIC
<i>Mch-UCH75</i>	KT731063	TGAAAACGACGGCCAGTAACAGGTGTGAGCGACAAGA	[1]	VIC
<i>Mch-UCH77</i>	KT731065	TGAAAACGACGGCCAGTCCGTGGGCACTGTAGATTATG	[1]	PET
<i>Mch-UCH83</i>	KT731070	TGAAAACGACGGCCAGTGGGTTCCATTTCCATTTCT	[1]	PET
<i>Mch-UCH84</i>	KT731071	TGAAAACGACGGCCAGTTGGACGACCTGAATACCAAA	[1]	NED
<i>Mch-UCH85</i>	KT731072	TGAAAACGACGGCCAGTTGCATATAGATGGATTCAACAAGG	[1]	NED
<i>Mch-UCH86</i>	KT731073	TGAAAACGACGGCCAGTCAGAAAGTACCTCCCACGTCA	[1]	NED
<i>Mch-UCH87</i>	KT731074	TGAAAACGACGGCCAGTTTTCACATTGCGATAAGACGTG	[1]	FAM
<i>Mch-UCH88</i>	KT731075	TGAAAACGACGGCCAGTGGGGAAAAACTAACGGTCTT	[1]	VIC
<i>Mch-UCH91</i>	KT731077	TGAAAACGACGGCCAGTGTAGCCAGGCGTTGTCAAT	[1]	FAM
<i>Mch-UCH92</i>	KT731078	TGAAAACGACGGCCAGTGCCGAGGAGTACCAAATGAA	[1]	PET
<i>Mch-UCH93</i>	KT731079	TGAAAACGACGGCCAGTTTCTGCAAAGCCAAGTAGACA	[1]	FAM
<i>Mch-UCH96</i>	KT731080	TGAAAACGACGGCCAGTCAACAACCTTTTGGTGACG	[1]	NED
<i>Mch-UCH97</i>	KT731081	TGAAAACGACGGCCAGTACCGTGGGCACTGTAGATTA	[1]	FAM
<i>Mch-UCH98</i>	KT731082	TGAAAACGACGGCCAGTAGGCAATCATAGGTTTGAACG	[1]	VIC
<i>Mch-UCH99</i>	KT731083	TGAAAACGACGGCCAGTCATGCATTTCTTTCCCTTCA	[1]	VIC
<i>Mch-UCH101</i>	KT731084	TGAAAACGACGGCCAGTGGTATGTCATTTCTTGGGTTTCA	[1]	PET
<i>Mch-UCH102</i>	KT731085	TGAAAACGACGGCCAGTTTTTGGTATTTGGAGTTGTTGTG	[1]	NED
<i>Mch-UCH103</i>	KT731086	TGAAAACGACGGCCAGTGCCCTGGTCTGTTTTCAT	[1]	FAM
<i>Mch-UCH104</i>	KT731087	TGAAAACGACGGCCAGTGCAAGTTCAAATGGCAGACAA	[1]	VIC
<i>Mch-UCH105</i>	KT731088	TGAAAACGACGGCCAGTGTCCATAACGAAGCTGGAT	[1]	PET
<i>Mch-UCH108</i>	KT731090	TGAAAACGACGGCCAGTGGTCGGGTTGGAGTAATGTA	[1]	NED

<i>Mch-UCH109</i>	KT731091	TGAAAACGACGGCCAGTTTCCAAGAATTGCTACCATCA	[1]	PET
<i>Mch-UCH110</i>	KT731092	TGAAAACGACGGCCAGTTAGCCCCTCTCGCTGTTTT	[1]	FAM
<i>Mch-UCH111</i>	KT731093	TGAAAACGACGGCCAGTGCAGGTGTTGCTCATTGTTG	[1]	VIC
<i>Mch-UCH112</i>	KT731094	TGAAAACGACGGCCAGTTGAGATGGGGACATGATTGA	[1]	NED
<i>Mch-UCH113</i>	KT731095	TGAAAACGACGGCCAGTAATGGATTGCGGATGAGAAC	[1]	PET
<i>Mch-UCH114</i>	KT731096	TGAAAACGACGGCCAGTGCCTGCTGGCGTATCAAATTA	[1]	FAM
<i>Mch-UCH115</i>	KT731097	TGAAAACGACGGCCAGTACCCTCTCTGCGATCTGAAT	[1]	NED
<i>MIT02</i>	EH663073	TGAAAACGACGGCCAGTGGACCATCTGCGTAGATTCA	[2]	PET
<i>Mgu1</i>	AF445370	TGAAAACGACGGCCAGTATCAGAAATGGCAAAGAAAAA	[3]	NED
<i>Mgu3</i>	AF445372	TGAAAACGACGGCCAGTAAACTAAAACTTCATCTAATCCC	[3]	FAM
<i>Mgu5</i>	AF445374	TGAAAACGACGGCCAGTACTTCTCCGGTAACATAATA	[3]	NED
<i>MGE003</i>	AJ624208	TGAAAACGACGGCCAGTAATAGAGGAGGAGGCTTC	[4]	FAM
<i>MGE004</i>	AJ624159	TGAAAACGACGGCCAGTATGGTTGAGCGGATGTGGT	[4]	VIC
<i>MGE005</i>	AJ623869	TGAAAACGACGGCCAGTAGACCAAGGTATTGCAACCATGTG	[1,4]	VIC
<i>MGE007</i>	AJ516476	TGAAAACGACGGCCAGTTTGTATGGGAAAGGGTATGA	[1,4]	PET
<i>MT203</i>	BV725482	TGAAAACGACGGCCAGTGTTTTCCGAATGGCGAGA	[5]	FAM
<i>MT282</i>	BV725484	TGAAAACGACGGCCAGTTGCCACATTGTTTTCAAGGA	[5]	NED

[1] Este estudio, [2] Vidal *et al.*, 2009; [3] Presa *et al.*, 2002; [4] Yu & Li, 2007; [5] Gardeström *et al.*, 2007.

ANEXO IV Elección de los 14 loci SSR, siguiendo los criterios del protocolo de estandarización y amplificación (ver ANEXO II)

Criterios de elección de loci SSR											
Locus	Etapa 1		Etapa 2			Etapa 3			Etapa 4		Etapa 5
	1	2	1	2	3	1	2	3	1	2	1
<i>Mch-UCH01</i>											
<i>Mch-UCH02</i>											
<i>Mch-UCH03</i>											
<i>Mch-UCH04</i>											
<i>Mch-UCH05</i>											
<i>Mch-UCH06</i>											
<i>Mch-UCH07</i>											
<i>Mch-UCH08</i>											
<i>Mch-UCH09</i>											
<i>Mch-UCH10</i>											
<i>Mch-UCH11</i>											
<i>Mch-UCH12</i>											
<i>Mch-UCH13</i>											
<i>Mch-UCH14</i>											
<i>Mch-UCH15</i>											
<i>Mch-UCH16</i>											
<i>Mch-UCH17</i>											
<i>Mch-UCH18</i>											
<i>Mch-UCH19</i>											
<i>Mch-UCH20</i>											
<i>Mch-UCH21</i>											
<i>Mch-UCH22</i>											
<i>Mch-UCH23</i>											
<i>Mch-UCH24</i>											
<i>Mch-UCH25</i>											
<i>Mch-UCH26</i>											
<i>Mch-UCH27</i>											
<i>Mch-UCH28</i>											
<i>Mch-UCH29</i>											
<i>Mch-UCH30</i>											
<i>Mch-UCH31</i>											

ANEXO V-a Genotipos de individuos de *M. chilensis* de 6 localidades de 2009

INDIVIDUOS	Mch-UCH01	Mch-UCH01	Mch-UCH02	Mch-UCH02	Mch-UCH11	Mch-UCH11	Mch-UCH12	Mch-UCH12	Mch-UCH15	Mch-UCH15	Mch-UCH18	Mch-UCH18	Mch-UCH20	Mch-UCH20	Mch-UCH23	Mch-UCH23	Mch-UCH30	Mch-UCH30	Mch-UCH104	Mch-UCH104	Mch-UCH110	Mch-UCH110	MT203	MT203	MT282	MT282	Mgu1	Mgu1
1QI09-01	152	155	386	401	203	203	304	307	357	357	191	194	251	251	222	222	198	198	251	251	188	188	212	212	359	369	173	173
1QI09-02	167	167	401	401	203	203	304	304	351	357	194	200	251	251	222	222	198	198	251	253	162	162	210	210	359	369	189	197
1QI09-03	188	188	401	401	203	206	304	304	354	354	194	194	251	251	222	225	198	198	251	253	192	192	212	212	359	359	189	189
1QI09-04	194	194	401	401	203	203	307	307	351	351	188	194	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	212	212	367	367	197	197
1QI09-05	155	167	401	411	203	206	304	304	0	0	194	194	251	251	222	222	198	198	251	255	162	190	204	206	0	0	0	0
1QI09-06	158	164	401	406	203	203	304	304	351	351	0	0	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	212	212	353	359	173	197
1QI09-07	158	164	406	406	194	203	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	198	198	253	253	188	190	206	206	359	359	173	173
1QI09-08	197	197	401	401	206	206	304	304	351	357	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	212	214	353	359	193	239
1QI09-09	176	203	401	411	206	206	304	304	351	351	188	197	251	251	222	222	198	198	249	249	0	0	214	214	367	367	179	179
1QI09-10	212	212	401	401	206	206	304	304	351	357	185	197	251	251	222	222	198	198	251	253	188	188	206	212	367	373	221	239
1QI09-11	149	167	401	401	203	203	304	304	345	351	191	191	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	204	212	347	353	175	181
1QI09-12	152	155	401	401	206	206	304	304	351	351	185	194	251	251	222	222	198	198	251	255	162	162	204	210	353	357	179	189
1QI09-13	167	224	401	401	203	203	304	304	351	354	194	194	251	251	222	225	198	198	253	253	190	190	0	0	353	365	0	0
1QI09-14	164	164	401	401	203	203	304	304	357	357	188	194	251	251	222	222	198	198	249	249	162	190	204	204	359	359	173	173
1QI09-15	152	209	401	401	203	206	0	0	351	351	185	185	251	251	222	222	201	201	251	253	162	162	206	206	353	353	173	173
1QI09-16	155	176	401	401	203	203	304	304	345	345	182	191	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	0	0	367	367	197	197
1QI09-17	188	188	401	401	203	206	313	313	354	357	194	194	251	251	222	222	198	198	227	249	190	190	206	210	359	369	175	179
1QI09-18	182	230	401	401	203	203	304	304	351	351	191	197	251	251	222	222	198	198	249	253	162	162	214	214	353	353	179	179
1QI09-19	161	230	401	401	206	209	307	310	351	357	188	197	251	251	222	222	198	198	251	253	162	162	210	226	367	367	175	175
1QI09-20	161	161	401	401	203	206	304	304	351	351	194	200	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	204	204	359	359	221	221
1QI09-21	158	158	401	401	203	206	307	307	351	351	188	206	251	251	222	222	198	198	251	253	188	188	220	220	353	353	175	221
1QI09-22	167	167	401	401	206	206	307	307	351	357	0	0	251	251	222	222	198	198	253	253	188	188	204	204	353	355	205	205
1QI09-23	152	152	401	401	206	206	310	310	351	357	194	200	251	251	222	222	198	198	253	253	162	166	0	0	365	365	0	0
1QI09-24	185	185	401	401	203	203	307	307	351	351	185	185	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	228	353	353	185	239
1QI09-25	185	185	401	401	203	206	0	0	351	351	185	194	0	0	222	222	0	0	253	253	188	188	0	0	359	365	175	187
1QI09-26	182	191	401	401	212	212	0	0	351	351	194	197	0	0	222	222	0	0	251	253	190	190	0	0	353	367	185	185

1QI09-27	185	191	401	401	206	206	304	304	351	351	191	200	251	254	222	225	198	198	253	253	162	190	204	204	365	375	223	223
1QI09-28	161	161	401	401	203	203	0	0	0	0	0	0	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	204	204	0	0	175	187
1QI09-29	161	161	401	401	203	203	310	310	351	351	185	194	251	251	222	225	198	198	253	253	190	190	210	210	353	353	187	187
1QI09-30	164	179	401	401	203	203	0	0	357	357	185	185	251	251	222	222	192	198	251	253	190	190	210	210	345	359	173	173
1QI09-31	167	167	406	406	203	206	307	307	351	357	185	194	251	251	0	0	192	198	251	251	190	190	212	212	365	367	0	0
1QI09-32	170	185	401	401	179	179	307	310	351	351	194	194	251	251	222	228	192	192	251	251	166	190	204	212	359	367	173	189
1QI09-33	158	167	391	401	203	212	0	0	357	357	194	194	0	0	222	222	0	0	251	253	188	190	0	0	353	353	197	197
1QI09-34	161	167	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	162	190	204	204	353	353	187	187
1QI09-35	176	176	401	401	203	206	304	304	351	351	185	194	251	251	222	225	198	198	251	253	162	192	216	216	353	359	173	197
1QI09-36	173	209	401	401	188	203	0	0	351	351	185	194	251	251	222	222	198	0	253	253	162	188	210	238	367	369	173	185
1QI09-37	167	191	401	401	200	203	304	304	351	357	185	194	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	206	222	353	365	173	223
1QI09-38	158	203	401	401	203	206	304	307	351	357	194	194	251	251	222	222	198	198	249	253	162	190	212	230	359	369	173	173
1QI09-39	164	170	401	401	203	203	0	0	351	357	194	197	251	251	222	225	198	198	251	253	162	190	228	228	367	367	0	0
1QI09-40	158	167	401	401	203	203	307	310	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	162	190	204	204	353	353	173	197
1QI09-41	140	167	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	225	198	198	253	253	162	190	206	226	359	367	197	217
1QI09-42	200	200	401	401	203	203	307	313	0	0	212	212	251	251	222	222	198	198	253	253	162	190	204	204	353	359	187	199
1QI09-43	230	230	401	401	203	203	304	304	351	354	191	197	251	251	222	222	198	198	251	255	190	190	206	206	359	367	197	197
1QI09-44	173	173	401	401	203	203	307	307	351	357	191	194	251	251	222	222	192	192	253	253	190	190	218	218	353	359	173	199
1QI09-45	146	146	0	0	203	203	304	307	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	251	188	190	204	204	359	365	173	173
1QI09-46	164	164	401	401	206	206	304	304	351	351	191	203	251	251	222	222	198	198	249	253	162	162	212	212	353	359	175	175
1QI09-47	173	173	401	401	206	206	0	0	351	354	188	197	251	251	222	222	198	198	253	253	188	190	204	204	353	367	0	0
1QI09-48	194	194	401	401	206	206	304	304	351	351	191	194	251	251	222	222	198	198	0	0	0	0	204	204	359	365	173	185
1QI09-49	164	164	401	401	206	206	313	313	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	164	164	214	214	365	369	181	239
1QI09-50	185	212	401	401	206	206	304	304	351	366	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	212	214	359	369	131	131
1PI09-01	143	200	401	411	206	206	307	307	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	162	162	204	204	353	367	189	189
1PI09-02	158	188	401	401	0	0	304	307	357	357	194	197	251	251	222	225	198	198	249	249	0	0	230	230	359	369	131	175
1PI09-03	164	164	401	401	194	206	307	307	0	0	194	197	251	251	222	222	198	198	251	251	188	188	206	230	353	369	187	187
1PI09-04	179	179	401	401	206	206	307	307	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	249	253	188	190	206	206	353	361	131	199
1PI09-05	191	191	401	401	203	206	304	307	357	357	206	206	251	251	222	222	198	198	249	253	188	190	204	206	353	359	131	239
1PI09-06	188	191	401	401	212	212	307	307	357	357	191	197	251	251	222	222	198	198	249	253	190	190	204	204	359	359	0	0
1PI09-07	164	206	401	406	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	0	0	249	249	188	190	204	204	353	367	175	189
1PI09-08	161	179	401	401	203	203	307	307	351	351	194	197	251	251	222	222	198	210	253	253	188	188	200	210	353	367	175	175
1PI09-09	158	206	401	401	206	206	304	304	357	357	191	194	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	206	212	353	353	0	0
1PI09-10	155	155	401	401	203	203	304	304	351	351	0	0	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	206	206	353	353	225	225
1PI09-11	158	158	401	406	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	162	162	212	212	367	367	173	205
1PI09-12	0	0	401	401	206	206	304	304	0	0	191	200	251	251	222	222	198	198	253	253	162	162	212	230	359	369	175	175

1PI09-13	164	164	401	401	203	203	304	304	351	351	194	200	251	251	222	222	198	198	253	253	162	188	210	210	359	367	175	239
1PI09-14	161	161	401	401	203	206	304	304	351	351	200	200	251	251	222	222	192	192	253	253	190	190	212	212	353	359	131	131
1PI09-15	161	161	0	0	203	206	304	304	357	357	191	191	251	251	222	222	198	198	251	253	188	188	206	210	353	353	175	175
1PI09-16	161	179	401	401	203	206	304	304	351	351	182	191	251	251	222	222	198	198	253	253	188	190	212	212	367	375	173	173
1PI09-17	143	182	406	411	200	203	0	0	348	357	185	197	251	251	222	225	198	198	251	251	188	188	206	228	359	369	131	173
1PI09-18	143	206	401	401	203	203	304	313	357	357	197	197	251	251	222	222	198	198	253	253	162	190	224	234	353	367	131	175
1PI09-19	203	215	401	401	206	206	304	304	351	351	188	197	251	251	222	222	198	210	253	257	162	162	204	204	353	359	131	173
1PI09-20	218	218	401	401	203	203	304	304	351	351	188	197	251	251	222	222	198	210	249	253	162	162	212	212	359	367	173	179
1PI09-21	161	161	401	401	203	206	307	307	351	351	188	197	251	254	222	222	198	198	251	253	188	188	210	210	353	353	131	175
1PI09-22	188	188	401	401	203	203	304	307	351	357	191	194	251	251	222	222	198	198	249	249	188	188	212	212	359	369	173	239
1PI09-23	164	170	401	401	203	206	304	304	354	354	0	0	251	251	222	222	198	198	249	249	190	190	252	252	353	359	207	207
1PI09-24	164	164	401	401	203	206	0	0	351	351	200	200	251	251	222	222	198	198	249	253	190	190	206	206	353	359	131	175
1PI09-25	149	149	401	401	203	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	225	198	198	249	253	190	190	210	228	359	367	0	0
1PI09-26	155	179	406	406	206	206	307	307	351	351	185	188	251	251	222	222	198	198	249	253	190	190	210	210	353	353	175	189
1PI09-27	206	206	396	401	194	206	304	307	357	357	230	230	251	251	222	225	198	198	249	253	162	162	204	210	353	367	131	175
1PI09-28	152	191	401	401	206	206	304	304	351	357	188	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	214	226	353	367	131	131
1PI09-29	149	188	401	401	206	206	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	204	248	359	359	0	0
1PI09-30	185	185	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	254	222	222	198	198	251	253	190	190	212	228	379	379	0	0
1PI09-31	164	164	401	401	206	206	304	313	351	351	188	194	251	254	222	222	198	198	251	253	162	162	212	212	359	367	217	217
1PI09-32	143	149	401	401	206	206	304	307	351	351	188	197	254	254	222	222	0	0	251	253	190	190	204	212	349	353	131	131
1PI09-33	131	170	401	401	203	203	304	304	351	354	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	212	228	353	359	173	173
1PI09-34	170	176	401	401	203	206	304	304	351	351	185	188	251	251	222	222	198	198	251	251	188	190	210	212	353	353	175	239
1PI09-35	161	161	401	401	203	203	304	304	357	357	230	230	251	251	222	225	198	198	251	251	162	162	204	210	353	369	131	173
1PI09-36	203	203	401	401	203	203	307	307	351	357	194	197	251	251	222	225	198	198	253	253	0	0	210	226	353	353	131	131
1PI09-37	167	179	401	401	206	206	304	307	351	351	191	191	251	251	222	225	198	198	253	253	162	188	204	248	359	365	0	0
1PI09-38	140	140	401	401	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	249	253	190	190	204	204	353	359	173	173
1PI09-39	143	164	401	401	206	206	304	304	357	357	185	191	251	251	222	222	198	198	251	253	188	188	204	212	353	365	131	185
1PI09-40	176	203	401	401	203	203	0	0	357	357	0	0	254	254	222	222	198	204	249	249	190	190	212	214	355	369	239	239
1PI09-41	170	182	0	0	203	203	304	304	351	351	200	200	251	251	222	222	198	198	251	255	188	188	218	234	369	369	223	223
1PI09-42	173	233	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	206	210	365	365	189	239
1PI09-43	167	182	401	401	203	206	304	313	354	354	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	210	353	353	131	223
1PI09-44	161	161	401	401	206	206	307	307	351	351	0	0	251	251	222	222	198	204	251	253	164	164	206	206	351	351	175	175
1PI09-45	0	0	401	401	0	0	304	304	351	351	194	194	251	251	0	0	198	198	253	261	188	190	206	210	359	369	173	173
1PI09-46	173	173	401	401	206	206	304	307	351	351	188	194	251	251	222	225	198	198	251	251	190	190	212	212	353	369	173	173
1PI09-47	188	188	0	0	203	206	304	304	351	351	0	0	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	202	214	365	365	177	177
1PI09-48	158	167	401	401	206	206	304	304	351	357	191	191	251	251	222	222	198	198	253	253	192	192	210	210	359	359	175	175

1PI09-49	158	179	401	401	206	206	304	307	351	351	191	194	251	251	222	225	198	198	251	251	0	0	204	212	353	367	131	175
1PI09-50	164	170	401	401	206	206	307	307	357	357	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	164	190	206	206	353	359	175	207
1LA09-01	158	158	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	212	212	353	367	131	131
1LA09-02	185	227	401	401	203	203	304	304	351	354	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	212	212	0	0	175	239
1LA09-03	248	251	401	401	206	206	0	0	351	351	191	197	251	251	222	225	198	198	251	253	162	188	206	206	353	353	175	175
1LA09-04	149	149	401	401	203	206	304	304	357	357	188	188	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	204	234	353	353	217	239
1LA09-05	158	158	401	401	206	206	304	304	351	351	188	188	251	251	222	222	198	198	253	253	162	190	206	242	369	369	187	187
1LA09-06	167	185	401	401	203	206	304	304	357	357	185	185	251	251	222	225	198	198	251	253	190	190	204	204	353	359	197	197
1LA09-07	167	182	401	401	206	206	304	307	357	357	194	197	0	0	222	222	198	198	251	251	188	190	236	236	353	353	189	189
1LA09-08	0	0	0	0	203	203	307	307	0	0	197	197	251	251	222	222	198	198	251	251	162	190	212	212	353	367	0	0
1LA09-09	161	170	401	401	206	206	313	313	357	363	188	188	251	251	222	222	198	198	253	253	188	188	222	222	369	369	197	197
1LA09-10	248	248	401	401	203	206	0	0	351	357	194	194	251	251	222	225	198	198	251	253	162	162	204	238	353	367	187	217
1LA09-11	164	191	401	401	203	206	304	304	357	357	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	206	242	353	367	131	239
1LA09-12	161	161	406	406	203	203	304	304	351	357	197	197	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	220	220	351	365	173	225
1LA09-13	158	158	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	162	162	212	212	365	365	131	189
1LA09-14	155	155	401	401	0	0	304	304	351	351	194	197	251	251	222	225	198	198	253	253	162	162	204	204	353	353	131	131
1LA09-15	161	161	401	406	206	206	304	304	351	351	182	191	251	251	222	225	195	198	253	253	190	190	212	212	369	369	0	0
1LA09-16	167	167	401	401	203	203	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	204	204	251	253	190	190	210	226	353	369	131	187
1LA09-17	161	203	401	401	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	249	253	190	190	210	210	359	359	131	175
1LA09-18	143	176	401	401	206	206	0	0	351	351	188	197	251	251	222	222	198	201	249	249	162	162	204	210	359	367	131	239
1LA09-19	176	176	401	401	206	206	304	307	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	253	253	162	190	210	242	359	367	131	175
1LA09-20	173	173	406	406	206	206	307	307	351	351	0	0	251	251	222	222	198	198	227	251	190	190	212	212	353	369	131	175
1LA09-21	140	140	401	401	203	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	188	188	206	226	353	353	175	175
1LA09-22	137	158	0	0	206	206	307	307	351	351	0	0	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	206	208	359	367	131	175
1LA09-23	161	194	401	401	194	203	304	304	357	357	194	197	0	0	222	222	198	204	249	253	190	190	204	210	359	359	0	0
1LA09-24	140	140	401	401	203	206	304	307	351	351	197	197	254	254	222	222	198	198	251	251	190	190	204	210	359	367	175	187
1LA09-25	158	188	401	401	203	206	304	304	351	351	191	197	251	251	222	222	198	210	253	253	190	190	204	214	359	369	131	239
1LA09-26	161	161	401	401	206	206	304	304	345	351	197	197	251	251	222	222	198	198	253	253	188	190	234	234	353	369	131	131
1LA09-27	155	185	401	401	0	0	304	304	351	351	185	194	251	251	222	222	0	0	249	253	162	162	208	218	353	367	213	223
1LA09-28	152	185	401	401	203	203	304	307	351	351	188	191	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	212	212	367	367	131	167
1LA09-29	158	158	401	401	206	206	0	0	351	351	191	191	251	251	222	222	198	198	249	253	190	190	206	206	353	359	173	173
1LA09-30	176	176	401	401	0	0	307	307	351	354	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	164	164	230	230	367	367	175	175
1LA09-31	164	164	401	401	203	203	304	304	351	357	191	191	251	251	222	222	198	198	253	253	164	188	210	210	367	367	175	175
1LA09-32	173	173	401	401	206	206	304	304	351	357	194	197	0	0	222	222	198	198	251	253	190	190	206	228	353	353	0	0
1LA09-33	149	152	401	401	206	206	307	307	357	357	197	197	251	251	222	222	198	210	253	253	188	190	238	238	0	0	131	173
1LA09-34	155	185	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	188	190	212	212	359	359	197	197

1LA09-35	167	167	401	401	0	0	0	0	357	357	197	197	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	218	218	353	353	191	191
1LA09-36	161	167	401	401	206	206	313	313	354	354	191	194	251	251	222	222	198	198	249	253	188	188	210	210	353	353	177	177
1LA09-37	164	173	401	401	206	206	304	304	351	351	188	188	251	251	222	222	198	198	251	261	162	162	210	210	353	369	189	197
1LA09-38	164	173	401	401	206	206	304	304	0	0	188	188	251	251	222	222	198	198	251	261	162	162	210	210	353	369	187	187
1LA09-39	155	155	401	401	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	188	190	228	228	351	353	0	0
1LA09-40	158	158	401	401	203	206	304	304	351	363	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	212	353	367	175	197
1LA09-41	170	170	401	401	206	206	307	313	357	357	185	200	251	251	222	222	198	198	251	251	162	162	212	212	353	353	175	175
1LA09-42	149	155	401	401	206	206	307	307	348	348	194	206	251	251	222	222	198	198	251	253	162	162	204	206	353	365	175	175
1LA09-43	164	164	416	416	200	203	304	304	354	354	194	194	251	251	222	222	198	198	253	255	190	190	204	204	359	373	189	189
1LA09-44	143	143	401	401	203	203	304	307	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	212	212	353	367	0	0
1LA09-45	143	143	401	401	203	203	304	304	351	357	197	197	251	251	222	222	198	198	253	253	188	190	212	212	0	0	175	175
1LA09-46	161	161	401	401	206	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	253	253	162	188	206	206	359	359	131	131
1LA09-47	167	167	0	0	200	206	304	307	351	363	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	162	162	204	234	353	367	189	189
1LA09-48	173	179	401	401	203	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	212	353	353	131	131
1LA09-49	215	215	401	401	203	206	0	0	351	351	191	194	0	0	222	222	198	198	253	253	164	190	204	212	359	359	173	189
1LA09-50	143	218	401	406	206	206	307	307	351	354	194	206	251	251	222	222	198	198	251	253	188	190	204	206	353	353	175	175
1CN09-01	155	155	401	401	200	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	162	162	204	206	359	359	225	225
1CN09-02	155	209	401	401	203	206	304	304	357	357	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	0	0	353	367	189	197
1CN09-03	176	176	401	406	203	206	304	304	351	357	194	200	251	251	222	225	210	210	251	253	188	190	226	226	367	367	197	197
1CN09-04	158	176	401	406	203	206	307	307	351	351	185	200	251	251	222	222	198	198	253	253	188	190	204	212	353	359	175	197
1CN09-05	158	176	401	406	194	206	313	313	357	357	197	200	251	251	222	222	198	198	253	253	164	188	204	206	353	359	175	197
1CN09-06	182	182	401	401	206	206	307	307	357	357	194	194	251	251	222	222	198	198	0	0	192	192	212	212	353	353	189	225
1CN09-07	140	170	401	401	203	206	304	307	348	348	191	191	251	251	0	0	195	198	253	261	164	164	214	214	353	353	131	179
1CN09-08	161	161	401	401	203	203	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	198	198	253	253	192	192	212	228	353	353	131	239
1CN09-09	161	179	401	401	203	206	304	304	0	0	200	200	251	251	222	234	198	210	251	251	164	164	208	224	359	369	201	201
1CN09-10	206	206	401	401	203	206	304	304	351	351	191	191	251	251	222	225	198	210	253	253	190	190	212	212	353	353	187	197
1CN09-11	176	182	401	401	203	203	304	313	351	357	176	185	251	251	222	222	198	210	249	249	190	190	212	212	353	359	193	193
1CN09-12	158	176	401	401	203	206	307	313	351	357	185	200	251	251	222	222	198	210	251	257	190	190	0	0	353	359	175	175
1CN09-13	152	173	401	401	0	0	304	307	357	357	197	197	251	251	222	222	198	198	253	253	192	192	212	212	359	369	215	215
1CN09-14	143	152	401	401	203	206	304	307	357	357	194	197	251	251	222	222	198	198	253	253	192	192	206	212	359	369	185	185
1CN09-15	167	167	401	401	206	206	304	304	351	357	0	0	251	251	222	222	198	210	253	253	192	192	204	204	353	353	239	239
1CN09-16	164	164	401	401	206	206	337	337	351	351	0	0	251	251	222	222	198	210	251	251	0	0	204	204	353	353	175	175
1CN09-17	164	164	401	401	203	206	304	337	351	351	194	194	251	251	222	222	198	210	249	253	162	188	204	204	359	365	173	187
1CN09-18	164	164	401	401	203	206	304	307	351	351	182	182	251	251	222	222	198	198	253	253	188	188	204	210	353	353	187	197
1CN09-19	158	215	401	401	200	203	337	337	354	357	191	191	251	251	222	234	198	198	249	249	190	190	204	204	359	367	173	207
1CN09-20	167	167	401	401	203	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	174	177	253	253	188	190	0	0	367	367	175	197

1CN09-21	143	179	401	401	203	206	0	0	351	351	197	197	251	251	222	222	210	210	251	253	190	190	212	232	359	359	175	175
1CN09-22	158	167	401	401	203	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	210	210	353	353	175	175
1CN09-23	191	191	401	401	203	206	304	304	351	354	191	194	251	251	222	222	0	0	251	253	170	190	204	214	353	353	173	197
1CN09-24	140	140	401	401	203	206	0	0	354	354	0	0	0	0	222	222	198	213	0	0	162	188	0	0	0	0	0	0
1CN09-25	164	173	401	401	203	206	304	337	351	351	188	197	251	251	222	225	180	180	253	253	162	190	218	226	353	353	175	217
1CN09-26	164	167	401	401	0	0	304	307	357	357	194	194	251	251	222	234	198	198	251	253	190	190	206	206	353	353	201	201
1CN09-27	173	179	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	164	164	224	224	353	365	173	197
1CN09-28	158	158	401	401	203	206	304	307	351	357	191	191	251	251	222	222	198	198	251	251	164	164	210	228	353	353	189	197
1CN09-29	152	170	401	401	200	200	304	304	351	354	185	191	251	251	222	222	198	198	251	251	162	162	222	222	359	367	189	199
1CN09-30	152	152	401	401	203	206	304	304	354	354	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	0	0	210	224	359	367	191	191
1CN09-31	158	188	401	401	203	206	304	307	357	357	191	191	251	251	222	225	198	198	251	253	192	192	0	0	353	365	175	199
1CN09-32	164	164	401	401	203	206	304	304	351	351	200	200	251	251	222	234	0	0	251	253	188	188	332	234	365	367	175	175
1CN09-33	152	197	401	401	203	203	304	304	354	354	194	194	251	251	222	222	198	210	251	253	190	190	206	212	353	369	0	0
1CN09-34	152	164	401	401	203	203	304	337	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	212	359	365	175	197
1CN09-35	167	188	401	401	203	206	304	337	354	354	194	203	251	251	222	222	198	198	251	253	162	162	206	206	353	365	189	197
1CN09-36	158	158	401	401	203	206	304	304	351	351	161	203	251	251	222	225	198	198	251	253	164	190	210	210	359	365	197	197
1CN09-37	164	164	396	396	203	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	204	365	367	0	0
1CN09-38	218	218	401	401	203	206	304	304	351	351	191	194	251	251	222	222	198	198	251	253	164	190	226	238	359	369	175	201
1CN09-39	167	200	401	401	200	200	304	304	354	354	191	191	251	254	222	222	198	198	251	253	190	190	204	204	359	369	187	187
1CN09-40	161	173	401	401	0	0	304	304	351	351	197	197	251	251	222	225	198	198	251	255	192	192	204	224	355	367	201	225
1CN09-41	161	161	401	401	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	195	198	251	253	162	162	206	210	359	369	219	239
1CN09-42	170	170	401	406	206	206	304	304	354	354	194	197	251	251	222	222	198	198	233	253	164	164	206	206	353	367	175	187
1CN09-43	158	185	401	406	206	206	304	304	351	354	185	191	251	251	222	222	198	198	227	251	190	190	212	212	367	369	197	197
1CN09-44	170	170	401	401	206	206	304	304	351	351	188	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	210	210	353	367	0	0
1CN09-45	170	176	401	401	203	206	304	304	351	351	185	194	251	254	222	225	198	198	253	253	190	190	212	212	353	373	175	175
1CN09-46	155	206	401	401	203	203	304	304	0	0	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	164	190	204	210	367	367	175	175
1CN09-47	170	176	391	391	206	206	304	304	351	357	197	200	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	0	0	359	365	175	199
1CN09-48	170	170	401	401	203	203	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	198	198	251	251	164	190	206	236	353	367	201	201
1CN09-49	161	161	401	401	203	212	304	304	357	357	197	197	251	251	222	225	198	198	251	253	190	190	204	204	359	369	131	239
1CN09-50	179	218	401	401	206	206	304	307	351	351	191	191	251	251	222	222	198	210	251	255	192	192	204	204	353	353	175	175
2CB09-01	179	179	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	188	190	204	206	353	367	197	197
2CB09-02	164	197	401	401	200	203	304	304	357	357	185	194	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	204	212	353	359	173	173
2CB09-03	155	155	401	401	197	206	0	0	351	357	0	0	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	204	226	353	367	197	197
2CB09-04	173	173	401	401	203	203	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	198	198	251	251	162	190	210	210	353	369	189	197
2CB09-05	152	152	401	401	206	206	304	304	357	357	197	197	251	251	222	225	198	198	251	253	0	0	206	214	353	353	0	0
2CB09-06	158	176	401	401	206	206	304	304	351	351	194	194	245	251	222	222	198	198	251	253	190	190	220	220	361	367	173	173

2CB09-07	140	140	401	401	206	206	304	304	351	357	191	191	251	251	222	222	198	201	251	253	190	190	206	206	367	367	173	173
2CB09-08	140	173	401	401	206	206	304	304	351	354	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	212	212	353	353	171	175
2CB09-09	164	173	401	401	206	206	304	304	351	351	188	188	251	251	222	225	198	198	253	253	188	188	204	204	353	365	191	201
2CB09-10	173	182	401	401	206	206	304	304	357	357	185	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	212	353	359	175	201
2CB09-11	158	158	401	406	203	203	307	307	0	0	203	203	251	251	222	222	198	198	0	0	190	190	204	206	353	371	175	175
2CB09-12	188	197	401	401	0	0	304	304	351	351	191	194	254	254	222	225	198	198	253	253	190	190	206	210	359	371	171	175
2CB09-13	200	200	401	401	203	206	0	0	351	351	188	188	0	0	222	222	198	198	251	253	190	190	210	224	353	365	0	0
2CB09-14	167	182	401	401	206	206	304	304	351	351	0	0	251	251	222	222	192	198	251	253	190	190	212	212	353	365	187	187
2CB09-15	149	149	391	391	203	206	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	198	201	251	253	190	190	204	224	353	371	189	189
2CB09-16	146	146	401	401	206	206	304	307	357	357	194	194	251	251	222	222	195	195	251	251	190	190	204	204	353	359	0	0
2CB09-17	188	188	401	401	200	200	304	313	357	357	197	197	251	251	222	222	192	192	251	251	190	190	204	206	359	369	173	173
2CB09-18	170	170	401	401	0	0	304	304	351	354	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	206	238	353	359	175	197
2CB09-19	188	188	401	401	203	206	304	304	357	357	191	191	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	204	204	353	353	173	203
2CB09-20	188	188	401	401	203	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	162	162	198	234	353	359	175	197
2CB09-21	164	164	401	411	206	206	304	316	357	357	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	214	214	353	359	199	199
2CB09-22	170	170	401	411	203	206	304	307	357	357	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	206	224	353	359	223	223
2CB09-23	155	155	401	401	203	206	304	304	351	357	188	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	232	359	359	197	197
2CB09-24	188	188	0	0	0	0	304	304	354	354	191	194	251	251	222	222	198	198	251	253	188	188	232	232	0	0	225	225
2CB09-25	140	140	401	401	203	203	0	0	357	357	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	210	210	353	359	173	173
2CB09-26	155	173	401	401	206	206	307	307	348	348	191	197	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	224	232	353	353	173	173
2CB09-27	164	164	401	401	203	206	304	304	0	0	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	214	214	359	367	239	239
2CB09-28	158	200	401	401	203	206	304	304	351	351	197	203	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	204	204	0	0	173	173
2CB09-29	164	164	401	411	206	206	307	307	351	351	185	197	251	251	222	225	198	210	251	251	188	188	204	204	353	353	175	175
2CB09-30	164	173	391	401	203	206	304	307	351	351	194	194	251	251	222	222	198	210	251	251	188	190	206	206	353	353	173	187
2CB09-31	0	0	401	401	203	206	304	304	357	357	200	200	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	222	222	353	359	175	175
2CB09-32	140	140	401	401	203	203	0	0	351	357	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	192	224	224	0	0	0	0
2CB09-33	197	197	396	396	206	206	304	304	357	357	185	185	251	251	222	222	198	210	251	253	190	190	204	204	359	367	173	221
2CB09-34	143	143	401	401	203	203	0	0	354	357	191	191	251	251	222	222	192	198	251	253	190	190	218	218	359	365	175	197
2CB09-35	164	164	401	401	0	0	304	232	351	351	188	191	251	251	222	222	198	198	251	253	192	192	210	210	359	369	173	223
2CB09-36	194	197	401	401	203	206	307	307	351	351	194	197	0	0	222	222	198	198	251	253	162	190	204	228	359	367	173	173
2CB09-37	179	179	401	401	206	206	304	304	351	351	188	194	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	212	212	359	359	0	0
2CB09-38	143	143	401	401	203	206	304	304	351	351	194	197	251	251	222	222	189	198	253	253	190	190	210	210	359	369	173	173
2CB09-39	164	179	401	401	203	206	304	313	357	357	188	194	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	218	222	353	367	173	173
2CB09-40	170	203	0	0	0	0	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	198	210	251	251	188	190	204	240	353	369	197	197
2CB09-41	173	209	401	401	203	203	304	304	351	357	200	200	251	251	222	222	198	198	251	251	190	168	204	224	353	353	173	173
2CB09-42	161	161	406	406	203	206	0	0	0	0	191	203	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	212	212	359	365	197	197

2CB09-43	140	140	401	401	203	203	304	307	351	351	197	197	251	251	222	225	198	198	251	251	190	190	216	216	353	353	173	173
2CB09-44	155	155	401	401	206	206	307	307	354	354	197	197	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	204	204	359	359	187	187
2CB09-45	188	188	401	401	206	206	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	198	198	251	251	162	188	204	220	353	359	187	187
2CB09-46	158	158	401	401	203	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	166	190	228	228	369	369	173	173
2CB09-47	158	158	401	401	203	206	304	304	357	357	194	194	251	251	222	222	195	195	251	253	190	190	214	214	353	369	173	173
2CB09-48	164	164	401	401	206	206	304	304	357	357	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	0	0	206	210	353	359	131	239
2CB09-49	182	182	401	401	206	206	304	307	354	354	0	0	251	251	0	0	198	198	251	255	190	190	204	204	353	353	175	175
2CB09-50	155	167	401	401	206	206	304	304	357	357	194	197	251	251	222	222	198	198	251	251	164	190	210	210	353	359	173	173
3IP09-01	167	197	401	401	203	203	304	304	351	354	191	194	251	251	222	222	189	198	251	251	190	190	212	212	353	359	175	175
3IP09-02	167	194	401	401	206	206	304	307	351	357	0	0	251	251	222	222	201	201	253	253	190	190	212	218	353	353	173	173
3IP09-03	188	188	411	411	206	206	304	304	372	372	194	194	251	251	222	225	195	195	253	253	162	162	216	222	353	367	173	173
3IP09-04	167	188	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	0	0	222	222	198	198	253	253	162	190	206	206	0	0	239	239
3IP09-05	185	185	401	401	203	203	310	310	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	206	206	353	353	0	0
3IP09-06	176	176	401	401	203	206	304	304	357	357	191	191	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	212	212	353	369	173	173
3IP09-07	170	176	401	401	203	203	307	307	351	354	194	194	251	251	222	222	192	192	251	251	190	190	212	212	355	367	0	0
3IP09-08	170	170	401	401	203	206	304	304	351	351	188	197	251	251	222	222	0	0	251	251	190	190	204	230	355	355	0	0
3IP09-09	197	197	401	401	206	206	304	307	357	357	191	194	251	251	222	222	198	198	251	253	0	0	204	214	353	353	175	175
3IP09-10	179	179	401	401	203	203	304	310	372	372	179	188	251	251	222	222	168	168	251	253	190	190	206	228	353	367	175	205
3IP09-11	182	182	401	401	203	203	0	0	354	357	194	197	251	251	222	222	189	189	251	253	190	190	206	206	353	369	191	191
3IP09-12	209	209	406	406	203	203	307	307	351	351	0	0	251	251	222	225	198	198	253	253	190	190	204	214	353	353	173	173
3IP09-13	152	152	401	401	206	206	0	0	0	0	191	194	251	254	222	222	0	0	251	253	190	190	204	210	367	367	173	173
3IP09-14	185	209	406	406	203	203	304	304	351	351	188	194	251	251	222	222	186	189	251	251	162	162	204	204	367	367	189	189
3IP09-15	155	167	401	401	206	206	304	304	351	351	194	200	251	251	222	225	198	198	253	253	190	190	232	244	367	367	175	175
3IP09-16	170	212	401	401	203	206	313	313	351	351	194	194	251	251	222	222	192	192	253	255	190	190	212	212	0	0	0	0
3IP09-17	197	197	401	401	203	203	304	304	351	357	200	200	251	251	222	222	198	198	251	251	162	162	210	230	353	353	173	181
3IP09-18	161	161	401	401	203	206	0	0	351	351	194	227	0	0	222	222	0	0	251	253	190	190	0	0	353	353	173	173
3IP09-19	161	224	406	406	203	206	304	304	354	357	182	191	251	251	222	222	189	198	251	253	188	190	206	206	353	365	0	0
3IP09-20	158	158	401	401	203	203	304	304	0	0	185	194	251	251	222	222	198	198	249	251	190	190	212	212	353	359	175	185
3IP09-21	209	221	411	411	203	206	307	310	351	351	185	194	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	212	242	353	353	175	217
3IP09-22	161	161	0	0	206	206	304	304	357	357	176	185	251	251	222	222	192	198	253	253	162	190	212	212	353	353	219	219
3IP09-23	179	179	401	401	203	203	307	307	351	354	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	162	162	232	232	353	353	0	0
3IP09-24	191	191	401	401	203	203	0	0	351	351	194	194	251	251	222	225	186	186	253	253	190	190	204	204	353	353	173	173
3IP09-25	179	179	406	406	203	206	304	304	0	0	185	194	251	251	222	222	198	198	253	253	162	162	230	232	353	365	181	207
3IP09-26	167	167	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	204	232	359	359	197	197
3IP09-27	170	170	401	401	206	206	304	304	351	351	194	197	251	251	222	222	189	198	251	253	162	190	206	206	367	367	189	189
3IP09-28	161	182	401	401	203	203	304	307	351	351	194	200	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	212	212	353	359	173	173

3IP09-29	197	197	406	406	203	206	304	313	354	357	194	197	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	210	210	367	369	207	207
3IP09-30	188	188	401	401	206	206	307	310	354	354	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	188	188	228	228	359	359	239	239
3IP09-31	161	161	401	401	203	203	304	304	351	357	191	200	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	204	204	359	367	175	175
3IP09-32	155	191	401	401	206	206	0	0	354	354	194	197	251	254	222	222	0	0	253	253	190	190	206	210	0	0	197	223
3IP09-33	164	164	401	401	206	206	304	307	351	351	185	194	251	251	222	222	180	180	251	253	188	190	212	224	373	373	175	239
3IP09-34	176	194	401	401	203	203	304	304	345	351	185	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	220	220	353	359	175	175
3IP09-35	188	188	416	416	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	204	353	359	173	199
3IP09-36	209	209	401	401	206	206	307	307	0	0	185	194	251	251	222	222	198	198	253	253	162	162	210	210	353	367	173	173
3IP09-37	209	209	401	401	206	206	304	304	351	357	194	200	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	212	212	369	369	0	0
3IP09-38	152	206	411	411	203	203	304	304	354	354	197	197	251	251	222	222	0	0	251	253	190	190	204	204	359	369	175	175
3IP09-39	188	188	406	406	203	206	0	0	354	357	194	200	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	204	214	353	353	0	0
3IP09-40	164	188	401	401	203	206	307	307	351	357	185	194	251	251	222	222	198	198	251	253	162	162	228	228	353	353	0	0
3IP09-41	206	206	401	401	203	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	0	0	251	253	162	190	212	238	353	359	175	175
3IP09-42	164	164	401	401	206	206	304	304	351	351	185	194	251	251	222	222	195	198	251	253	162	190	204	212	353	359	203	239
3IP09-43	176	176	401	401	206	206	304	304	351	357	185	194	251	251	222	222	195	198	253	253	162	162	204	204	359	359	173	189
3IP09-44	164	164	401	401	203	203	304	304	351	351	182	191	251	251	222	222	192	198	251	253	162	162	204	212	359	359	173	173
3IP09-45	164	197	401	401	203	206	304	304	351	357	188	197	251	251	222	225	198	198	251	251	190	190	212	228	353	353	175	175
3IP09-46	194	194	401	401	203	203	304	304	351	357	185	194	251	251	222	225	198	198	251	253	162	190	206	206	353	365	173	173
3IP09-47	191	191	401	401	203	206	304	304	351	351	0	0	251	254	222	222	198	198	251	253	162	162	204	226	353	367	173	173
3IP09-48	209	209	401	401	203	203	0	0	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	251	0	0	214	214	359	367	175	175
3IP09-49	164	194	401	401	203	203	307	307	357	357	191	203	251	251	222	222	198	198	251	255	162	190	226	226	359	367	181	181
3IP09-50	206	206	401	401	206	206	304	307	351	351	188	194	251	254	222	222	198	198	251	251	188	188	206	228	353	353	187	239

ANEXO V-b Genotipos de individuos de *M. chilensis* de 6 localidades de 2013

INDIVIDUOS	Mch-UCH01	Mch-UCH01	Mch-UCH02	Mch-UCH02	Mch-UCH11	Mch-UCH11	Mch-UCH12	Mch-UCH12	Mch-UCH15	Mch-UCH15	Mch-UCH18	Mch-UCH18	Mch-UCH20	Mch-UCH20	Mch-UCH23	Mch-UCH23	Mch-UCH30	Mch-UCH30	Mch-UCH104	Mch-UCH104	Mch-UCH110	Mch-UCH110	MT203	MT203	MT282	MT282	Mgu1	Mgu1
1QI13-01	164	182	396	396	203	206	304	304	351	357	191	191	251	251	222	225	198	198	249	249	162	190	214	222	351	351	207	239
1QI13-02	173	173	401	401	203	203	307	307	351	351	197	197	251	251	222	222	198	210	249	253	0	0	212	212	349	349	175	197
1QI13-03	173	173	401	401	203	206	304	307	345	345	194	194	251	251	222	225	198	198	251	251	188	188	204	212	351	351	175	223
1QI13-04	170	170	401	401	203	203	307	307	351	357	194	194	251	251	222	222	198	198	249	249	164	188	204	214	0	0	197	197
1QI13-05	242	242	401	406	203	203	313	313	348	348	194	194	251	251	222	222	198	198	251	255	164	164	204	206	351	351	175	187
1QI13-06	161	161	401	401	203	206	304	304	354	354	188	194	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	212	212	353	353	175	197
1QI13-07	212	212	401	401	203	203	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	164	190	204	236	353	353	131	197
1QI13-08	164	164	401	401	203	203	337	337	357	384	197	197	0	0	222	222	198	198	251	253	190	190	206	232	353	353	177	177
1QI13-09	158	158	396	401	203	203	304	304	351	351	185	194	251	251	222	225	198	198	251	253	162	190	204	204	353	353	131	173
1QI13-10	152	155	401	401	203	206	304	304	345	345	185	194	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	204	224	359	367	131	175
1QI13-11	170	170	401	401	203	203	0	0	345	345	0	0	251	251	222	222	198	198	249	253	188	188	204	222	361	369	173	187
1QI13-12	155	155	401	401	206	206	307	307	351	351	185	188	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	240	353	359	131	185
1QI13-13	152	152	396	396	203	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	212	212	355	355	131	185
1QI13-14	155	155	401	401	203	203	304	304	351	351	194	197	251	251	222	222	192	198	253	253	190	190	212	224	353	353	131	175
1QI13-15	158	158	401	401	200	203	304	310	357	357	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	164	190	206	212	353	361	131	175
1QI13-16	164	170	401	401	206	206	304	304	351	351	0	0	251	254	222	222	198	210	249	251	190	190	204	216	351	351	207	239
1QI13-17	158	161	396	396	206	206	304	304	357	357	194	200	251	251	222	225	198	210	251	253	188	190	0	0	359	359	185	239
1QI13-18	179	179	401	401	203	203	304	304	351	357	194	197	251	251	222	222	198	210	251	253	162	190	204	204	341	353	131	175
1QI13-19	143	143	401	401	194	203	304	304	363	363	191	197	251	251	222	225	198	198	249	253	162	190	214	214	359	367	131	173
1QI13-20	161	176	401	401	203	203	304	304	357	357	194	194	251	251	222	222	198	198	249	249	190	190	204	204	353	353	131	131
1QI13-21	164	182	401	401	206	206	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	198	210	253	255	190	190	204	204	359	369	173	239
1QI13-22	161	161	401	401	203	203	304	307	351	351	194	194	251	251	222	225	198	198	237	253	164	190	212	212	367	367	175	175
1QI13-23	161	176	401	401	206	206	304	307	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	192	192	204	204	353	359	131	131

1QI13-24	161	161	401	401	206	206	304	304	345	345	194	200	251	251	219	222	198	198	251	253	190	190	0	0	367	367	225	225
1QI13-25	152	152	401	401	203	203	304	304	351	351	194	200	251	251	222	222	198	201	253	253	190	190	204	204	353	353	185	185
1QI13-26	155	155	401	401	203	206	0	0	351	351	185	188	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	240	351	351	0	0
1QI13-27	161	173	401	401	206	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	0	0	190	190	210	210	341	341	131	175
1QI13-28	161	170	0	0	206	206	0	0	351	351	0	0	251	251	0	0	198	198	0	0	164	190	0	0	0	0	0	0
1QI13-29	164	164	401	401	203	206	304	304	351	351	194	197	251	251	222	225	198	198	251	253	190	190	210	210	353	367	175	175
1QI13-30	197	197	401	401	206	206	0	0	351	351	197	197	251	251	222	222	198	210	0	0	164	164	208	251	353	359	131	131
1QI13-31	167	167	401	401	203	203	307	307	351	351	0	0	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	206	210	353	353	175	197
1QI13-32	158	158	396	396	203	206	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	198	198	253	253	164	192	206	206	353	359	131	173
1QI13-33	167	170	401	401	203	203	304	304	351	351	197	197	251	251	222	225	198	210	251	253	190	190	212	212	0	0	173	239
1QI13-34	170	170	401	401	206	206	304	304	357	357	0	0	251	251	0	0	198	198	251	253	162	162	218	224	353	353	131	173
1QI13-35	152	167	401	401	203	206	304	304	351	357	194	197	251	251	222	225	198	198	251	253	188	188	212	212	359	359	173	173
1QI13-36	161	161	0	0	203	206	304	307	357	357	197	200	251	251	222	225	198	198	0	0	164	188	218	218	353	367	173	191
1QI13-37	182	182	401	401	206	206	304	304	351	351	0	0	251	254	222	222	198	198	251	253	190	190	204	204	367	367	175	175
1QI13-38	158	158	401	401	203	203	313	313	351	354	185	185	251	251	222	225	198	198	253	253	188	188	204	212	353	353	0	0
1QI13-39	173	197	401	401	203	206	307	307	351	351	194	194	251	251	222	225	198	198	251	253	190	190	210	216	359	379	189	189
1QI13-40	158	176	401	401	206	206	0	0	345	345	188	188	251	251	222	222	198	198	251	251	162	190	206	212	353	355	173	173
1QI13-41	143	143	401	401	203	203	304	304	351	351	185	185	251	251	0	0	198	198	251	251	190	190	204	212	365	367	197	197
1QI13-42	194	194	401	401	206	206	304	304	348	357	194	203	251	251	222	222	198	198	251	253	0	0	210	210	359	359	131	173
1QI13-43	179	179	401	401	203	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	225	198	198	251	253	162	162	204	204	355	367	131	173
1QI13-44	167	182	396	396	203	203	307	307	351	354	194	194	251	251	222	225	198	198	251	251	0	0	214	230	359	367	0	0
1QI13-45	185	185	401	401	203	203	307	307	351	357	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	162	162	210	222	353	353	175	175
1QI13-46	143	143	0	0	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	162	162	202	212	369	369	187	187
1QI13-47	161	164	401	401	203	206	304	307	351	357	194	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	0	0	359	367	131	175
1QI13-48	149	149	401	401	200	206	304	304	357	357	191	197	254	254	222	222	0	0	251	253	162	162	210	234	359	369	131	131
1QI13-49	140	152	401	401	203	203	304	304	351	351	191	194	251	251	222	222	0	0	253	253	162	190	210	228	365	369	203	203
1QI13-50	203	203	401	401	203	203	304	304	351	351	194	197	254	254	222	225	198	198	253	253	164	190	204	224	353	367	131	197
1PI13-01	170	170	401	401	203	206	307	307	357	357	191	191	251	251	222	225	198	198	251	253	162	190	204	210	359	369	177	177
1PI13-02	155	179	401	401	203	206	304	304	345	354	188	194	251	251	222	222	198	201	251	251	190	190	204	204	353	365	197	197
1PI13-03	167	167	401	401	203	206	307	310	351	351	188	197	251	254	222	222	198	198	251	251	190	190	228	228	353	359	0	0
1PI13-04	179	179	401	401	206	206	304	304	351	351	176	176	251	251	222	222	198	198	0	0	188	190	206	206	353	361	131	199
1PI13-05	158	158	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	189	198	251	253	164	190	204	226	353	365	131	179

1PI13-06	176	176	401	406	206	206	304	304	0	0	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	0	0	369	369	189	197
1PI13-07	152	152	401	401	203	203	307	310	351	357	194	194	251	251	222	222	189	198	251	251	192	192	204	230	0	0	0	0
1PI13-08	164	164	401	401	203	203	304	307	351	357	194	197	251	251	222	222	189	198	251	253	164	164	206	224	365	369	175	175
1PI13-09	152	152	401	401	203	206	304	307	351	351	194	194	0	0	222	225	198	210	251	253	164	190	204	204	365	369	173	197
1PI13-10	152	200	401	401	203	206	304	307	351	351	191	191	251	251	219	222	198	198	251	251	190	190	204	206	353	353	175	175
1PI13-11	173	191	401	401	206	206	304	304	351	351	185	185	251	251	222	222	174	198	253	253	190	190	206	210	353	359	131	131
1PI13-12	167	176	401	401	203	206	304	304	345	357	0	0	251	251	222	225	198	198	253	253	164	192	212	212	359	359	175	225
1PI13-13	170	176	396	401	203	206	304	304	354	357	197	197	251	251	219	222	198	198	251	253	190	190	204	222	359	371	131	175
1PI13-14	194	194	401	401	206	206	304	304	351	351	191	194	251	251	222	222	198	198	251	251	164	164	242	242	359	367	175	175
1PI13-15	161	185	401	401	203	206	310	310	357	357	194	197	251	251	222	222	198	198	251	251	192	192	204	204	353	359	131	175
1PI13-16	161	167	401	401	206	206	0	0	351	351	194	194	251	251	222	222	189	198	0	0	188	192	204	212	353	353	131	175
1PI13-17	179	179	401	401	203	203	304	337	348	348	179	179	251	251	222	225	174	198	251	253	188	190	212	226	353	353	131	239
1PI13-18	161	161	401	401	203	203	304	304	351	351	194	200	251	251	222	222	174	210	251	251	162	188	206	210	353	359	175	181
1PI13-19	158	173	401	401	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	225	198	198	251	253	162	190	206	224	365	365	131	173
1PI13-20	158	164	401	401	203	206	304	304	357	357	191	191	251	251	222	222	198	210	253	253	164	190	204	228	353	353	131	175
1PI13-21	140	143	401	401	203	206	304	304	348	348	200	200	251	251	222	225	198	198	251	251	188	190	218	222	351	351	131	191
1PI13-22	143	143	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	206	228	369	369	131	173
1PI13-23	179	179	401	401	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	225	198	210	251	253	192	192	204	206	353	353	131	175
1PI13-24	146	146	401	401	200	206	304	304	0	0	200	200	251	251	0	0	189	198	253	253	190	190	204	204	381	381	173	173
1PI13-25	176	176	0	0	203	203	337	337	348	348	194	194	251	251	222	225	198	198	251	253	162	162	210	226	353	369	131	239
1PI13-26	167	188	401	401	203	203	304	304	351	351	0	0	251	251	222	222	198	198	251	251	188	188	204	212	353	359	131	197
1PI13-27	158	158	401	401	206	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	225	198	198	253	253	162	162	204	212	365	365	173	173
1PI13-28	191	191	401	401	203	206	307	307	351	357	0	0	251	251	222	225	198	201	253	253	164	190	204	204	353	367	175	239
1PI13-29	170	182	401	401	206	206	304	304	351	351	185	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	206	206	0	0	131	175
1PI13-30	185	185	401	406	203	203	304	304	351	351	185	194	251	251	222	222	0	0	0	0	190	190	212	212	369	369	0	0
1PI13-31	179	179	401	401	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	192	192	228	228	353	353	225	225
1PI13-32	158	158	401	401	200	206	0	0	0	0	197	197	251	251	222	222	198	198	253	261	164	190	204	204	381	381	0	0
1PI13-33	188	188	401	401	206	206	313	313	348	348	0	0	251	251	222	225	198	201	253	253	192	192	206	206	351	351	131	175
1PI13-34	161	161	401	401	206	206	304	304	348	348	164	164	251	251	222	222	198	210	253	253	164	164	212	212	353	367	173	173
1PI13-35	143	167	401	401	203	203	304	304	348	354	0	0	251	251	222	222	198	198	251	253	164	190	222	222	351	351	131	177
1PI13-36	179	179	401	401	206	206	304	304	351	357	185	185	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	228	228	353	359	207	207
1PI13-37	158	179	401	401	203	203	307	307	351	351	185	185	251	251	222	225	198	198	251	253	190	190	206	226	353	353	201	201

1PI13-38	158	158	291	291	0	0	304	313	351	351	185	194	251	251	222	222	198	198	253	253	176	192	206	206	353	367	0	0
1PI13-39	176	176	401	401	203	206	313	313	351	351	0	0	251	254	222	222	198	198	227	251	190	190	212	212	359	365	131	131
1PI13-40	161	161	401	401	203	203	0	0	351	351	191	191	251	251	222	222	192	198	227	253	164	192	212	212	353	353	175	225
1PI13-41	161	161	401	401	203	212	304	337	351	351	0	0	251	251	222	222	198	198	253	255	190	190	204	212	353	367	177	239
1PI13-42	158	173	401	401	203	206	304	337	351	351	194	197	251	251	222	222	174	198	253	253	190	190	204	204	355	367	131	225
1PI13-43	158	239	401	401	203	203	304	304	351	357	194	194	251	251	222	225	198	198	251	253	188	188	204	218	359	369	175	175
1PI13-44	161	227	401	401	203	203	304	304	357	357	194	194	251	251	222	225	198	201	251	253	188	188	204	204	361	367	173	173
1PI13-45	143	143	401	401	203	203	304	304	351	357	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	188	188	212	212	359	365	131	225
1PI13-46	170	170	401	401	206	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	174	198	251	253	164	188	214	232	359	367	175	187
1PI13-47	170	185	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	254	222	222	198	198	251	253	188	192	204	204	353	367	131	175
1PI13-48	0	0	291	291	194	206	250	253	351	351	191	197	251	254	222	222	198	198	251	253	164	188	204	204	367	367	173	173
1PI13-49	161	182	401	401	203	203	250	250	351	351	191	194	251	254	222	222	198	201	253	253	164	188	204	212	359	367	123	131
1PI13-50	158	158	401	401	206	206	250	250	351	351	194	194	251	254	222	222	198	198	251	253	190	190	222	222	353	369	131	173
1LA13-01	158	158	291	291	206	206	304	304	348	351	185	185	251	251	222	222	198	210	251	253	164	190	204	204	351	351	131	173
1LA13-02	305	305	401	401	203	203	0	0	351	351	191	191	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	210	226	353	367	223	223
1LA13-03	191	206	401	401	203	206	292	307	351	357	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	192	192	214	214	353	359	189	201
1LA13-04	242	242	401	401	203	206	304	304	351	351	194	200	251	251	222	222	198	198	251	251	192	192	226	226	353	353	187	187
1LA13-05	167	173	0	0	206	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	204	237	253	192	192	206	206	359	367	197	197
1LA13-06	158	158	401	401	206	206	304	304	351	351	188	188	251	251	222	222	198	198	253	253	192	192	204	206	353	353	131	215
1LA13-07	167	218	401	401	203	203	304	304	351	351	194	197	251	251	222	225	198	198	251	253	192	192	212	212	353	367	175	175
1LA13-08	200	200	401	401	203	203	307	307	354	354	0	0	251	251	222	222	198	198	251	253	164	192	212	226	353	367	175	175
1LA13-09	242	242	401	401	206	206	304	304	354	354	191	191	251	251	222	222	198	198	0	0	164	164	210	226	359	371	131	175
1LA13-10	161	170	401	401	203	206	307	313	348	348	194	194	251	251	219	222	198	210	251	253	164	164	212	212	353	373	191	197
1LA13-11	161	161	401	401	206	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	210	251	253	164	164	210	230	359	371	131	199
1LA13-12	161	179	401	401	203	203	304	304	351	351	185	185	251	251	222	222	198	210	251	253	164	190	206	212	353	365	131	197
1LA13-13	191	191	406	406	206	206	304	304	0	0	194	197	251	251	222	225	198	210	235	253	162	162	204	204	369	369	175	175
1LA13-14	176	176	401	401	203	203	307	307	351	351	197	197	251	251	222	225	198	198	251	253	192	192	214	214	353	367	197	197
1LA13-15	197	197	401	401	206	206	307	307	351	357	194	194	251	251	222	222	198	198	0	0	164	192	210	210	353	359	189	189
1LA13-16	170	170	401	401	203	203	304	304	357	357	191	194	251	251	222	222	198	198	251	253	188	188	204	212	359	371	175	197
1LA13-17	140	140	401	401	0	0	304	304	351	351	194	194	251	251	222	225	198	198	251	251	188	188	206	230	353	359	131	207
1LA13-18	227	227	401	401	203	203	304	307	351	351	176	197	251	251	222	222	198	210	251	253	190	190	204	226	359	369	177	239
1LA13-19	173	173	401	401	203	203	304	307	351	357	185	185	251	251	222	222	198	210	251	253	188	188	204	212	359	369	175	175

1LA13-20	167	188	401	406	206	206	337	337	357	357	194	194	251	251	222	222	0	0	251	253	164	164	204	210	367	367	131	175
1LA13-21	176	176	401	401	203	206	304	304	354	357	194	197	251	251	222	222	177	198	251	251	164	164	210	210	353	353	131	197
1LA13-22	164	164	401	401	203	203	316	316	351	351	185	185	251	251	222	225	198	198	251	253	188	188	204	204	353	367	193	193
1LA13-23	143	143	401	401	206	206	304	304	348	357	197	200	251	251	222	222	198	201	251	253	164	192	210	210	345	353	175	175
1LA13-24	146	146	401	401	203	206	313	313	351	351	194	197	251	251	222	222	198	198	251	251	192	192	204	230	359	367	197	197
1LA13-25	155	167	401	401	203	206	0	0	351	351	194	194	0	0	222	222	198	198	251	253	190	190	204	206	359	359	173	173
1LA13-26	179	179	401	401	203	203	304	304	357	357	191	191	251	251	222	222	174	198	249	253	188	190	210	210	359	369	131	177
1LA13-27	158	167	401	401	0	0	304	304	351	351	191	200	251	251	222	222	198	198	251	253	162	192	204	204	359	369	173	173
1LA13-28	158	167	401	401	206	206	313	313	357	357	194	197	251	254	222	222	174	198	251	251	190	190	212	212	367	367	201	239
1LA13-29	143	143	401	401	203	203	304	304	357	357	197	197	251	251	222	222	198	198	253	253	192	192	222	222	353	353	131	175
1LA13-30	221	221	401	401	206	206	304	304	351	357	197	197	251	251	222	222	198	210	251	253	192	192	204	204	353	367	131	199
1LA13-31	161	191	401	401	203	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	251	192	192	224	224	345	353	175	175
1LA13-32	143	170	401	401	203	206	304	304	357	357	191	191	251	251	222	222	0	0	163	163	164	164	212	212	359	335	187	187
1LA13-33	158	158	401	401	203	203	304	304	348	348	0	0	251	251	0	0	198	198	251	253	190	190	224	224	353	353	175	199
1LA13-34	167	179	401	401	203	206	0	0	357	357	194	197	251	251	222	222	198	198	253	253	188	190	206	226	359	367	131	177
1LA13-35	161	161	396	396	206	206	304	304	351	351	194	197	251	251	222	222	201	201	253	253	162	190	220	220	353	359	0	0
1LA13-36	155	164	401	401	206	206	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	0	0	251	251	190	190	212	230	359	369	131	189
1LA13-37	200	200	401	401	206	206	304	304	351	357	194	194	251	251	222	225	198	198	253	253	190	190	204	230	345	367	173	173
1LA13-38	164	170	401	401	206	206	304	304	354	354	191	191	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	206	212	363	363	131	175
1LA13-39	218	218	401	401	206	206	0	0	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	251	164	164	204	214	359	369	0	0
1LA13-40	170	170	401	401	203	206	304	307	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	0	0	164	190	206	212	0	0	173	173
1LA13-41	155	164	401	401	203	203	310	310	351	351	197	197	251	251	222	225	198	198	253	253	0	0	204	204	353	355	175	175
1LA13-42	164	182	401	406	203	203	304	307	351	357	191	200	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	206	214	353	359	175	175
1LA13-43	200	200	401	401	206	206	304	304	357	357	197	197	251	251	222	222	198	198	0	0	190	190	204	206	353	359	173	173
1LA13-44	161	176	401	401	206	206	304	304	351	351	185	197	251	251	222	222	198	210	253	253	188	188	206	206	353	359	0	0
1LA13-45	155	158	0	0	206	206	313	313	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	0	0	164	190	224	224	359	369	173	173
1LA13-46	161	161	401	401	203	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	210	253	253	164	164	210	210	353	365	189	189
1LA13-47	161	161	401	401	206	206	0	0	354	354	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	164	164	206	206	365	369	175	175
1LA13-48	158	179	401	401	203	203	304	304	351	357	188	188	251	251	222	222	198	198	255	255	164	190	210	210	353	359	175	225
1LA13-49	179	200	401	401	200	203	313	313	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	164	164	204	232	353	353	131	131
1LA13-50	224	224	401	401	206	206	0	0	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	164	188	204	206	357	357	123	129
1CN13-01	167	194	401	401	206	206	304	304	351	351	188	188	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	210	210	359	367	189	189

1CN13-02	161	161	401	401	206	206	307	307	351	357	185	197	251	251	222	222	198	198	251	253	164	190	212	220	359	359	131	175
1CN13-03	173	173	401	401	194	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	164	190	204	206	0	0	189	189
1CN13-04	161	179	291	291	203	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	201	210	253	253	190	190	206	226	353	353	175	199
1CN13-05	161	185	401	401	203	206	313	313	351	351	206	206	251	251	222	225	198	198	251	253	192	192	210	210	359	367	187	187
1CN13-06	152	179	401	401	206	206	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	198	210	251	253	164	164	210	210	359	367	197	239
1CN13-07	152	152	401	401	206	206	0	0	348	348	194	197	251	251	222	222	198	198	253	253	188	188	204	220	353	369	0	0
1CN13-08	164	167	401	406	206	206	313	313	348	348	191	194	251	251	0	0	198	198	251	253	192	192	204	204	351	351	175	175
1CN13-09	161	188	401	401	206	206	304	304	357	357	194	197	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	212	212	359	359	131	175
1CN13-10	161	170	401	401	206	206	0	0	351	351	194	197	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	204	214	353	369	131	175
1CN13-11	164	170	401	401	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	210	251	253	162	190	210	210	353	353	173	173
1CN13-12	185	194	401	401	203	203	307	307	351	351	0	0	251	251	222	225	198	198	251	253	190	190	204	204	367	367	175	175
1CN13-13	197	197	0	0	203	203	307	307	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	164	164	204	218	353	353	175	239
1CN13-14	161	194	401	401	206	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	204	204	251	253	192	192	204	226	365	373	131	131
1CN13-15	161	203	401	401	206	206	307	307	351	351	194	197	251	251	222	225	198	198	251	253	192	192	204	220	353	353	175	175
1CN13-16	161	161	401	401	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	192	192	204	204	367	367	175	175
1CN13-17	176	176	401	401	0	0	307	307	357	357	185	191	251	251	225	225	198	198	253	253	162	190	210	210	0	0	197	239
1CN13-18	212	212	401	401	206	206	304	304	351	351	185	191	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	206	206	359	367	131	201
1CN13-19	143	179	401	401	203	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	249	253	190	190	212	212	353	359	173	173
1CN13-20	176	176	0	0	203	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	251	188	188	230	230	353	353	131	199
1CN13-21	155	206	401	401	206	206	304	304	357	357	197	197	251	251	222	222	174	174	251	251	164	164	204	206	353	361	131	205
1CN13-22	188	209	401	401	203	203	304	304	354	357	197	197	251	251	222	222	174	198	253	253	164	164	212	212	357	357	0	0
1CN13-23	161	188	401	406	203	203	304	304	351	357	185	191	251	251	222	222	198	198	251	253	164	190	204	204	369	369	197	225
1CN13-24	161	161	401	401	203	206	304	304	357	357	0	0	251	251	222	222	171	210	253	253	192	192	206	206	353	369	131	131
1CN13-25	164	200	401	401	203	206	304	304	348	348	191	191	251	251	222	225	198	198	251	253	190	190	204	226	359	371	131	239
1CN13-26	143	209	401	401	200	200	304	304	351	351	197	200	251	251	222	225	198	210	251	253	164	164	210	210	359	367	123	207
1CN13-27	158	158	401	401	194	203	304	304	351	351	188	188	251	251	222	222	198	198	251	253	188	190	212	230	0	0	123	207
1CN13-28	164	164	401	401	203	206	337	337	357	357	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	188	188	204	206	359	359	185	185
1CN13-29	167	167	401	411	203	203	304	304	354	357	167	200	251	251	222	222	198	198	239	253	188	188	204	222	353	353	175	175
1CN13-30	161	161	401	401	203	203	304	304	348	348	191	194	251	251	222	225	198	198	251	251	162	188	210	210	351	357	131	131
1CN13-31	161	161	401	401	194	206	304	304	357	357	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	164	188	222	222	353	359	0	0
1CN13-32	143	164	401	401	203	206	304	304	357	357	0	0	251	251	219	222	198	198	0	0	164	188	204	204	353	359	131	179
1CN13-33	203	203	401	401	203	203	304	304	348	348	194	197	251	251	222	222	198	198	253	253	162	190	214	214	357	369	199	239

1CN13-34	164	164	401	401	206	206	304	304	351	351	191	197	251	251	219	222	198	198	251	253	162	188	214	214	359	367	173	187
1CN13-35	161	161	401	401	206	206	304	307	357	357	188	188	251	251	222	225	198	198	251	253	188	188	204	238	353	353	175	187
1CN13-36	143	170	401	401	206	206	304	304	351	357	191	191	251	251	222	225	198	198	253	253	164	164	212	212	359	359	131	187
1CN13-37	182	182	401	401	203	206	304	313	351	351	191	203	0	0	222	222	198	198	251	253	188	188	212	218	353	353	131	175
1CN13-38	164	164	401	401	203	203	304	304	351	357	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	164	190	204	224	353	359	0	0
1CN13-39	0	0	401	401	203	203	304	307	351	351	197	197	251	251	222	225	198	198	253	253	164	190	204	204	359	359	175	175
1CN13-40	164	164	401	401	203	203	304	307	351	351	194	194	251	251	222	222	198	201	251	253	164	190	204	204	359	359	175	175
1CN13-41	167	167	401	401	206	206	304	304	351	351	194	200	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	206	210	359	369	173	173
1CN13-42	155	155	401	401	203	206	304	304	351	351	185	185	251	251	222	225	198	198	253	253	162	190	206	212	365	365	123	187
1CN13-43	179	179	401	401	206	206	304	304	351	357	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	162	190	206	212	365	365	185	197
1CN13-44	161	161	401	401	203	206	304	313	348	348	194	194	251	251	222	222	198	213	249	253	164	190	204	222	351	351	199	239
1CN13-45	188	188	401	401	200	200	304	304	348	348	200	200	251	251	222	225	198	198	251	253	164	190	204	212	357	367	131	197
1CN13-46	188	203	401	401	203	203	304	307	351	351	185	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	202	212	359	369	175	175
1CN13-47	164	176	401	401	203	206	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	198	198	251	251	188	190	204	212	353	353	175	175
1CN13-48	158	203	401	401	206	206	307	307	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	192	192	204	204	359	369	131	131
1CN13-49	161	161	401	401	203	206	310	310	351	351	194	200	251	251	222	222	198	201	251	253	164	164	206	210	359	369	173	181
1CN13-50	161	161	396	396	203	203	304	304	351	357	185	185	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	226	226	381	381	131	175
2CB13-01	185	206	401	401	203	203	310	310	351	351	194	197	251	251	222	225	198	210	237	249	162	190	204	204	353	369	123	131
2CB13-02	200	200	401	406	203	203	304	304	357	357	194	194	251	251	222	222	198	198	253	255	162	190	204	208	353	359	189	197
2CB13-03	182	191	401	401	206	206	307	310	351	351	191	191	251	251	222	222	198	210	253	253	190	190	0	0	353	353	175	187
2CB13-04	143	155	396	396	206	206	304	304	351	351	0	0	251	251	222	222	198	198	253	253	164	164	204	206	359	359	189	189
2CB13-05	167	167	401	401	203	203	304	304	354	354	191	191	251	251	222	222	174	198	249	249	164	188	0	0	367	367	0	0
2CB13-06	251	251	396	401	206	206	304	304	357	357	191	191	251	251	222	222	198	198	251	253	188	190	204	204	367	367	173	173
2CB13-07	170	170	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	254	222	222	198	198	251	251	164	190	204	212	0	0	175	175
2CB13-08	194	194	396	396	0	0	310	310	0	0	191	191	251	251	222	222	0	0	0	0	0	0	204	212	353	353	175	175
2CB13-09	194	194	401	401	203	206	304	304	351	354	197	197	251	251	222	225	198	198	251	251	190	190	210	210	359	359	173	173
2CB13-10	158	158	401	401	206	206	304	304	351	351	191	194	251	251	222	222	198	198	251	253	164	164	212	220	367	367	175	175
2CB13-11	197	197	401	401	203	203	304	304	351	357	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	164	164	204	214	361	361	187	187
2CB13-12	164	164	0	0	203	206	304	313	351	357	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	164	188	204	204	353	353	0	0
2CB13-13	164	194	401	401	206	206	304	313	348	348	185	185	251	251	222	222	198	198	251	251	162	188	204	204	357	379	175	175
2CB13-14	161	161	401	401	203	203	232	232	351	351	197	197	251	254	222	222	195	195	251	253	190	190	206	210	353	353	175	175
2CB13-15	158	197	401	401	206	206	304	304	357	357	188	188	251	251	222	222	210	210	251	253	188	188	218	228	353	367	187	201

2CB13-16	170	170	401	401	203	203	0	0	351	351	185	197	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	204	212	359	369	187	187
2CB13-17	0	0	401	401	203	203	304	307	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	206	206	353	359	123	207
2CB13-18	167	167	401	401	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	249	253	162	190	230	230	353	367	175	175
2CB13-19	140	140	396	396	206	206	307	307	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	249	253	190	190	204	234	359	359	173	173
2CB13-20	164	164	401	401	206	206	0	0	357	357	215	218	251	251	222	222	198	198	251	255	190	190	204	204	365	365	123	191
2CB13-21	212	212	401	401	0	0	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	206	214	353	355	131	173
2CB13-22	161	188	401	401	203	203	304	304	351	351	182	182	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	210	224	359	367	0	0
2CB13-23	143	164	401	401	203	203	313	313	0	0	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	188	190	0	0	359	367	175	175
2CB13-24	170	194	401	401	203	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	206	212	367	367	123	181
2CB13-25	173	173	406	406	206	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	229	253	190	190	0	0	355	367	189	223
2CB13-26	161	173	406	406	206	206	307	307	351	351	185	185	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	204	212	359	369	173	173
2CB13-27	167	182	401	401	203	203	0	0	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	210	355	355	0	0
2CB13-28	158	188	0	0	206	206	304	304	357	357	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	212	212	353	365	191	239
2CB13-29	164	164	401	401	206	206	307	307	351	351	185	197	251	251	222	222	198	198	249	249	188	188	204	204	353	353	175	175
2CB13-30	161	161	396	396	206	206	304	304	351	351	182	200	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	204	353	369	211	239
2CB13-31	158	158	386	386	203	203	304	304	351	351	194	197	251	251	222	222	213	213	251	253	190	190	212	220	365	365	175	187
2CB13-32	164	164	396	396	200	200	304	304	351	351	194	194	251	251	222	225	198	198	251	253	190	190	204	212	369	369	175	175
2CB13-33	182	182	401	401	206	206	307	310	351	357	191	194	251	251	222	222	198	198	253	261	162	162	216	222	353	353	197	239
2CB13-34	131	131	401	401	200	203	0	0	351	351	0	0	251	251	222	222	198	198	249	253	190	190	204	222	353	359	131	179
2CB13-35	152	152	401	401	203	203	304	304	351	351	233	236	251	251	222	222	198	198	249	249	190	190	212	212	359	359	131	175
2CB13-36	158	158	401	401	206	206	304	304	351	351	191	191	251	251	222	225	198	198	253	253	190	190	228	228	359	367	197	197
2CB13-37	152	164	396	396	203	203	304	304	357	357	191	197	0	0	222	222	198	198	249	253	162	190	214	224	353	367	173	197
2CB13-38	194	194	401	401	203	203	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	261	162	162	212	212	359	367	131	185
2CB13-39	155	185	401	401	206	206	310	310	351	351	191	200	251	251	222	222	198	198	251	251	162	162	206	206	365	367	197	197
2CB13-40	161	167	401	401	203	203	304	307	351	351	191	191	251	251	222	222	210	210	249	253	190	190	206	234	367	367	0	0
2CB13-41	152	152	401	406	206	209	304	307	0	0	0	0	251	251	222	222	198	210	253	253	162	190	206	212	367	367	173	173
2CB13-42	206	206	401	401	206	206	304	304	351	351	191	191	251	251	222	222	174	198	253	253	162	190	204	204	359	359	173	223
2CB13-43	161	185	401	401	203	203	304	304	351	357	191	191	251	251	222	222	177	198	251	253	178	178	204	204	365	365	123	123
2CB13-44	185	185	401	401	203	206	304	304	351	351	185	185	251	251	0	0	198	198	253	253	190	190	210	210	367	367	173	189
2CB13-45	0	0	0	0	203	203	304	304	0	0	191	194	251	251	222	222	198	198	253	261	0	0	204	204	0	0	175	175
2CB13-46	170	170	401	401	206	206	304	307	354	354	194	194	251	251	222	222	198	201	253	253	162	190	206	206	367	367	225	225
2CB13-47	194	194	401	401	203	203	304	304	351	351	197	197	251	251	0	0	198	198	251	253	190	190	204	204	367	367	175	197

2CB13-48	182	191	401	401	203	203	304	304	351	351	197	197	251	251	219	222	198	198	251	253	192	192	202	212	369	369	175	239
2CB13-49	155	155	386	406	206	206	307	307	351	351	194	197	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	204	214	365	367	173	173
2CB13-50	155	155	401	401	206	206	304	304	351	351	191	194	251	251	222	222	198	198	253	253	200	200	204	212	351	359	131	197
3IP13-01	143	143	401	401	203	203	307	307	351	351	191	191	251	251	222	222	198	198	253	253	162	162	206	206	359	369	175	175
3IP13-02	179	179	401	401	200	200	307	307	363	363	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	164	190	212	212	365	367	175	175
3IP13-03	182	209	401	406	203	203	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	253	253	0	0	212	212	353	353	189	189
3IP13-04	164	164	401	401	203	203	304	304	357	357	191	200	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	206	238	359	369	173	173
3IP13-05	170	173	401	401	206	206	307	310	351	351	191	197	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	212	212	0	0	175	175
3IP13-06	164	164	406	406	206	206	304	304	351	357	188	188	251	251	222	225	198	198	251	253	162	190	204	204	353	353	131	175
3IP13-07	164	164	401	401	203	206	304	307	351	351	0	0	251	251	222	222	198	198	253	253	164	190	224	224	353	353	175	175
3IP13-08	182	191	401	411	206	206	304	307	351	357	200	200	251	251	0	0	198	198	253	253	190	190	212	212	0	0	0	0
3IP13-09	212	212	406	406	206	206	307	307	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	212	212	367	367	181	181
3IP13-10	188	215	0	0	206	206	304	304	351	351	191	200	251	251	222	222	198	198	251	253	188	192	204	236	351	351	173	173
3IP13-11	158	200	401	401	203	206	313	313	351	351	185	185	251	254	222	222	198	198	251	253	162	162	204	204	351	351	215	215
3IP13-12	158	158	401	401	203	206	304	337	348	348	200	200	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	206	206	351	365	239	239
3IP13-13	164	164	396	401	203	206	0	0	357	357	188	197	251	251	222	225	198	198	249	249	190	190	204	212	359	373	197	223
3IP13-14	236	236	401	401	194	203	307	307	351	357	191	200	251	251	222	222	177	177	251	251	0	0	204	212	353	359	197	221
3IP13-15	197	197	401	401	203	203	304	304	351	351	197	197	251	254	222	222	198	198	251	253	188	190	210	210	353	359	211	221
3IP13-16	191	191	401	401	203	206	304	304	351	351	0	0	251	251	222	225	198	198	253	253	0	0	206	224	359	365	175	175
3IP13-17	173	173	401	401	203	203	304	307	351	351	194	194	251	251	222	222	198	201	253	253	190	190	204	206	367	367	173	173
3IP13-18	176	176	401	401	206	206	307	307	351	351	191	194	251	251	219	222	195	195	251	253	190	190	212	212	353	369	199	199
3IP13-19	164	164	406	406	203	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	195	198	0	0	162	162	0	0	0	0	0	0
3IP13-20	167	188	401	401	206	206	337	337	351	351	197	200	251	251	222	225	198	198	251	253	162	162	204	204	367	367	191	191
3IP13-21	158	170	401	406	194	206	337	337	357	357	194	203	251	251	222	225	198	213	251	253	190	190	214	236	353	353	189	199
3IP13-22	164	164	401	401	200	206	307	307	351	351	188	194	251	251	222	225	198	198	253	253	190	190	206	212	353	353	239	239
3IP13-23	170	191	401	401	191	203	304	313	351	351	197	197	251	251	222	222	174	198	0	0	0	0	230	230	353	367	175	175
3IP13-24	179	185	401	406	194	206	307	307	351	363	191	191	251	251	222	222	198	198	253	253	0	0	226	226	353	365	191	191
3IP13-25	179	188	406	406	206	206	307	310	357	357	0	0	248	251	222	222	198	198	253	253	192	192	204	212	359	367	175	175
3IP13-26	167	167	0	0	203	203	0	0	351	351	185	185	251	254	222	222	198	198	251	253	190	190	212	212	353	367	173	173
3IP13-27	170	182	401	401	206	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	225	198	198	251	253	162	190	206	230	353	365	0	0
3IP13-28	197	197	401	401	203	203	304	304	357	357	188	203	251	251	222	225	198	198	249	253	162	190	204	234	365	365	207	207
3IP13-29	203	221	401	401	194	203	304	304	354	354	191	200	251	251	222	225	0	0	0	0	162	190	210	240	353	353	187	197

3IP13-30	164	182	401	401	200	206	304	304	351	357	194	194	251	251	222	222	198	198	253	253	190	190	206	210	367	367	189	239
3IP13-31	164	164	401	401	203	203	0	0	351	351	194	200	251	251	219	222	198	198	251	253	162	162	204	228	359	375	173	219
3IP13-32	170	170	401	401	200	200	304	304	357	357	188	200	251	251	0	0	198	198	251	251	162	190	210	222	353	375	189	189
3IP13-33	0	0	401	406	206	206	304	304	345	357	197	197	251	251	222	225	198	198	251	251	190	190	204	204	349	359	175	175
3IP13-34	218	218	396	396	197	206	304	304	351	351	194	194	251	251	222	222	198	198	251	251	162	190	204	204	353	365	199	199
3IP13-35	182	182	0	0	197	206	304	304	342	351	194	200	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	206	206	365	367	179	197
3IP13-36	164	194	401	401	203	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	201	201	251	251	188	188	204	204	353	373	187	199
3IP13-37	179	215	0	0	203	206	337	337	351	351	194	200	251	251	222	222	198	198	249	249	190	190	206	206	353	355	243	243
3IP13-38	140	140	401	401	203	203	304	304	348	348	194	194	251	251	222	222	198	198	251	253	162	190	204	228	351	351	175	175
3IP13-39	164	179	401	401	203	206	307	313	351	351	200	200	251	251	222	222	198	198	251	253	190	190	218	226	359	371	175	175
3IP13-40	164	164	401	401	203	203	0	0	351	351	200	200	251	254	222	222	0	0	253	253	190	190	212	212	351	351	185	185
3IP13-41	0	0	401	401	203	206	304	307	351	351	197	197	251	254	222	222	198	198	251	251	162	162	212	212	351	351	207	207
3IP13-42	188	212	401	401	203	206	304	304	351	351	200	200	251	251	222	222	198	198	251	253	162	162	212	212	351	351	191	239
3IP13-43	206	206	401	401	203	203	307	310	351	351	197	197	251	254	222	222	198	198	251	253	190	190	204	204	359	377	175	199
3IP13-44	158	158	401	401	206	206	304	304	351	351	197	203	251	251	222	225	198	201	251	251	190	190	206	206	353	353	187	199
3IP13-45	182	200	401	401	203	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	253	188	188	204	204	365	367	199	239
3IP13-46	209	209	401	401	203	203	304	304	351	351	203	203	251	251	222	222	198	198	249	249	0	0	204	204	353	359	173	239
3IP13-47	161	176	396	401	203	206	304	304	348	357	197	197	251	251	222	222	198	198	251	251	164	190	210	210	365	365	187	187
3IP13-48	161	161	396	396	206	206	304	304	351	357	197	197	251	251	222	222	198	198	251	251	190	190	206	206	353	365	173	173
3IP13-49	143	182	401	401	203	206	307	307	351	357	197	197	251	254	219	222	198	198	0	0	164	188	206	212	353	367	131	175
3IP13-50	140	182	401	401	203	206	304	304	351	351	197	197	251	251	222	222	198	198	251	251	188	188	194	194	353	365	199	239

ANEXO VI Error de genotipo en los 33 individuos amplificados en dos oportunidades (columnas grises: Individuo primera vez amplificado; Columnas crema: Individuo segunda vez amplificado; Columnas blanca: Variación encontrada en amplificaciones realizadas (0 sin variación; 1 variación encontradas)

INDIVIDUOS	Mch-UCH01/VIC	Mch-UCH01/VIC	Mch-UCH01/VIC	Mch-UCH01/VIC	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2	Mch-UCH02/FAM	Mch-UCH02/FAM	Mch-UCH02/FAM	Mch-UCH02/FAM	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2	Mch-UCH11/VIC	Mch-UCH11/VIC	Mch-UCH11/VIC	Mch-UCH11/VIC	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2	Mch-UCH12/PET	Mch-UCH12/PET	Mch-UCH12/PET	Mch-UCH12/PET	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2	Mch-UCH15/PET	Mch-UCH15/PET	Mch-UCH15/PET	Mch-UCH15/PET	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2
1QI09-11	187	187	187	187	0	0	391	391	391	391	0	0	201	201	201	201	0	0	314	314	314	314	0	0	346	352	346	352	0	0
1QI09-26	196	196	196	196	0	0	391	391	391	391	0	0	210	210	210	210	0	0	314	314	0	0	1	1	352	352	352	352	0	0
1QI09-33	163	163	163	163	0	0	381	391	381	391	0	0	201	210	201	210	0	0	314	314	0	0	1	1	352	358	352	358	0	0
1PI09-02	148	148	148	148	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	314	317	314	317	0	0	358	358	358	358	0	0
1PI09-29	181	181	181	181	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	314	314	314	314	0	0	352	352	352	352	0	0
1PI09-50	157	157	157	157	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	317	317	317	317	0	0	358	358	358	358	0	0
1LA09-07	157	157	157	157	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	314	314	314	314	0	0	358	358	358	358	0	0
1LA09-11	148	148	148	148	0	0	391	391	391	391	0	0	201	204	201	204	0	0	314	314	314	314	0	0	358	358	358	358	0	0
1LA09-26	163	163	163	163	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	314	314	314	314	0	0	346	352	346	352	0	0
1CN09-01	166	166	166	166	0	0	391	391	391	391	0	0	198	201	198	201	0	0	314	314	314	314	0	0	352	352	352	352	0	0
1CN09-30	163	163	163	163	0	0	391	391	391	391	0	0	201	204	201	204	0	0	314	314	314	314	0	0	355	355	355	355	0	0
1CN09-45	160	160	160	160	0	0	391	391	391	391	0	0	201	204	201	204	0	0	314	314	314	314	0	0	352	352	352	352	0	0
2CB09-08	154	154	154	154	0	0	401	401	401	401	0	0	204	204	204	204	0	0	314	314	314	314	0	0	352	355	352	355	0	0
2CB09-18	151	151	151	151	0	0	391	391	391	391	0	0	201	201	201	201	0	0	314	314	314	314	0	0	352	355	352	355	0	0
2CB09-21	169	169	169	169	0	0	391	391	391	391	0	0	201	201	201	201	0	0	314	314	314	314	0	0	352	352	352	352	0	0
3IP09-03	139	139	139	139	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	314	314	314	314	0	0	352	352	352	352	0	0
3IP09-17	169	169	169	169	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	314	314	314	314	0	0	352	355	352	355	0	0

3IP09-44	163	163	163	163	0	0	391	401	391	401	0	0	204	204	204	204	0	0	314	332	314	332	0	0	358	358	358	358	0	0
1QI13-17	166	166	166	166	0	0	386	386	386	386	0	0	204	204	204	204	0	0	314	314	314	314	0	0	358	358	358	358	0	0
1QI13-25	148	148	148	148	0	0	391	391	391	391	0	0	201	201	201	201	0	0	314	314	314	314	0	0	352	352	352	352	0	0
1QI13-46	145	145	145	145	0	0	0	0	0	0	0	0	201	201	201	201	0	0	314	314	314	314	0	0	352	352	352	352	0	0
1PI13-04	157	157	157	157	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	314	359	314	359	0	0	352	352	352	352	0	0
1PI13-14	151	151	151	151	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	314	314	314	314	0	0	352	352	352	352	0	0
1PI13-35	145	145	145	145	0	0	391	391	391	391	0	0	201	201	201	201	0	0	314	314	314	314	0	0	352	358	355	355	1	1
1LA13-10	178	178	178	178	0	0	391	391	391	391	0	0	201	204	201	204	0	0	317	326	317	326	0	0	352	352	352	352	0	0
1LA13-23	193	193	193	193	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	314	314	314	314	0	0	349	358	349	358	0	0
1LA13-39	142	142	142	142	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	0	0	0	0	0	0	352	352	352	352	0	0
1CN13-07	160	160	160	160	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	0	0	0	0	0	0	349	349	349	349	0	0
1CN13-15	145	145	145	145	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	317	317	317	317	0	0	352	352	352	352	0	0
1CN13-28	217	217	217	217	0	0	391	391	391	391	0	0	201	204	201	204	0	0	359	359	359	359	0	0	358	358	358	358	0	0
2CB13-J1	151	151	151	151	0	0	391	391	391	391	0	0	201	201	201	201	0	0	323	323	323	323	0	0	352	352	352	352	0	0
2CB13-22	160	160	160	160	0	0	391	391	391	391	0	0	201	201	201	201	0	0	314	314	314	314	0	0	352	352	352	352	0	0
2CB13-33	163	163	163	163	0	0	391	391	391	391	0	0	204	204	204	204	0	0	317	323	317	323	0	0	352	358	352	358	0	0
N° de inv. que no coinciden					0	0					0	0					0	0					2	2					1	1
% de inv. que no coinciden					0	0					0	0					0	0					6,1	6,1					3,03	3,03
Individuo lectura fallida					0	0					0	0					0	0					2	2					0	0
% Individuo lectura fallida					0	0					0	0					0	0					6,1	6,1					0	0
Diferencia en el genotipo					0	0					0	0					0	0					0	0					1	1
% diferencia en el genotipo					0	0					0	0					0	0					0	0					3,03	3,03

ANEXO VI Continuación.

INDIVIDUOS

	Mch-UCH20/NED	Mch-UCH20/NED	Mch-UCH20/NED	Mch-UCH20/NED	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2	Mch-UCH23/FAM	Mch-UCH23/FAM	Mch-UCH23/FAM	Mch-UCH23/FAM	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2	Mch-UCH30/VIC	Mch-UCH30/VIC	Mch-UCH30/VIC	Mch-UCH30/VIC	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2	Mch-UCH104/VIC	Mch-UCH104/VIC	Mch-UCH104/VIC	Mch-UCH104/VIC	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2	Mch-UCH110/FAM	Mch-UCH110/FAM	Mch-UCH110/FAM	Mch-UCH110/FAM	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2
1QI09-11	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	248	248	248	248	0	0	187	187	187	187	0	0
1QI09-26	249	249	0	0	1	1	222	222	222	222	0	0	202	202	0	0	1	1	246	248	246	248	0	0	187	187	187	187	0	0
1QI09-33	249	249	0	0	1	1	222	222	222	222	0	0	202	202	0	0	1	1	246	248	246	248	0	0	185	187	185	187	0	0
1PI09-02	249	249	249	249	0	0	222	225	222	225	0	0	202	202	202	202	0	0	246	246	246	246	0	0	187	187	187	187	0	0
1PI09-29	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	248	248	248	248	0	0	189	189	189	189	0	0
1PI09-50	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	248	248	248	248	0	0	163	187	163	187	0	0
1LA09-07	237	249	0	0	1	1	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	248	246	248	0	0	185	187	185	187	0	0
1LA09-11	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	248	246	248	0	0	161	187	161	187	0	0
1LA09-26	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	248	248	248	248	0	0	185	187	185	187	0	0
1CN09-01	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	248	246	248	0	0	0	0	161	161	1	1
1CN09-30	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	248	248	248	248	0	0	163	163	163	163	0	0
1CN09-45	249	252	249	252	0	0	222	225	222	225	0	0	202	202	202	202	0	0	248	248	248	248	0	0	187	187	187	187	0	0
2CB09-08	249	249	249	249	0	0	222	225	222	225	0	0	202	202	202	202	0	0	248	248	248	248	0	0	163	163	163	163	0	0
2CB09-18	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	246	246	246	0	0	163	163	163	163	0	0
2CB09-21	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	0	0	196	202	1	1	246	248	246	248	0	0	161	161	161	161	0	0
3IP09-03	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	248	248	248	248	0	0	187	187	187	187	0	0
3IP09-17	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	248	246	248	0	0	187	187	187	187	0	0
3IP09-44	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	248	246	248	0	0	163	187	163	187	0	0
1QI13-17	249	249	249	249	0	0	222	225	222	225	0	0	202	214	202	214	0	0	246	248	246	248	0	0	185	187	185	187	0	0

1QI13-25	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	205	205	202	205	1	0	248	248	248	248	0	0	187	187	187	187	0	0
1QI13-46	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	248	246	248	0	0	187	187	187	187	0	0
1PI13-04	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	248	246	248	0	0	185	187	185	187	0	0
1PI13-14	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	246	246	246	0	0	163	163	163	163	0	0
1PI13-35	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	248	246	248	0	0	163	187	163	187	0	0
1LA13-10	249	249	249	249	0	0	219	222	219	222	0	0	202	205	202	217	0	1	246	248	246	248	0	0	163	163	163	163	0	0
1LA13-23	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	205	0	1	246	248	246	248	0	0	163	185	163	185	0	0
1LA13-39	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	246	246	246	0	0	163	163	163	163	0	0
1CN13-07	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	248	248	248	248	0	0	163	163	163	163	0	0
1CN13-15	249	249	249	249	0	0	222	225	222	225	0	0	202	202	202	202	0	0	246	248	246	248	0	0	185	187	185	187	0	0
1CN13-28	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	246	246	246	0	0	185	185	185	185	0	0
2CB13-01	249	249	249	249	0	0	222	225	222	225	0	0	202	214	202	214	0	0	232	246	232	246	0	0	163	187	163	187	0	0
2CB13-22	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	246	246	246	246	0	0	187	187	187	187	0	0
2CB13-33	249	249	249	249	0	0	222	222	222	222	0	0	202	202	202	202	0	0	248	256	248	256	0	0	163	163	163	163	0	0
Nº de inv. que no coinciden					3	3					0	0					4	5					0	0					1	1
% de inv. que no coinciden					9,1	9,1					0	0					12,1	15,2					0	0					3,0	3,0
Individuo lectura fallida					3	3					0	0					3	3					0	0					1	1
% Individuo lectura fallida					9,1	9,1					0	0					9,1	9,1					0	0					3,0	3,0
Diferencia en el genotipo					0	0					0	0					1	2					0	0					0	0
% diferencia en el genotipo					0	0					0	0					3,0	6,1					0	0					0	0

ANEXO VI Continuación.

INDIVIDUOS

	<i>MT203/FAM</i>	<i>MT203/FAM</i>	<i>MT203/FAM</i>	<i>MT203/FAM</i>	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2	<i>MT282/NED</i>	<i>MT282/NED</i>	<i>MT282/NED</i>	<i>MT282/NED</i>	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2	<i>Mgu1/NED</i>	<i>Mgu1/NED</i>	<i>Mgu1/NED</i>	<i>Mgu1/NED</i>	Variación Alélica 1	Variación Alélica 2
1QI09-11	190	198	190	198	0	0	345	351	345	351	0	0	170	176	170	176	0	0
1QI09-26	190	190	0	0	1	1	351	363	351	363	0	0	180	180	180	180	0	0
1QI09-33	198	210	0	0	1	1	351	351	351	351	0	0	192	192	192	192	0	0
1PI09-02	214	214	214	214	0	0	357	367	357	367	0	0	170	194	170	194	0	0
1PI09-29	190	230	190	230	0	0	357	357	357	357	0	0	182	182	182	182	0	0
1PI09-50	192	192	192	192	0	0	351	355	351	355	0	0	170	204	170	204	0	0
1LA09-07	218	218	218	218	0	0	351	357	351	357	0	0	182	190	182	190	0	0
1LA09-11	192	224	192	224	0	0	355	363	355	363	0	0	130	192	130	192	0	0
1LA09-26	216	216	216	216	0	0	351	365	351	365	0	0	130	130	130	130	0	0
1CN09-01	190	192	190	192	0	0	357	363	357	363	0	0	216	216	216	216	0	0
1CN09-30	196	208	196	208	0	0	357	363	357	363	0	0	184	194	184	194	0	0
1CN09-45	198	198	198	198	0	0	351	369	351	369	0	0	170	170	170	170	0	0
2CB09-08	200	206	200	206	0	0	351	363	351	363	0	0	184	194	184	194	0	0
2CB09-18	196	212	196	212	0	0	351	351	351	351	0	0	170	176	170	176	0	0
2CB09-21	190	196	190	196	0	0	351	357	351	357	0	0	170	170	170	170	0	0
3IP09-03	198	198	198	198	0	0	351	351	351	351	0	0	166	170	166	170	0	0
3IP09-17	192	220	192	220	0	0	351	355	351	355	0	0	170	190	170	190	0	0
3IP09-44	198	198	198	198	0	0	351	355	351	355	0	0	192	192	192	192	0	0
1QI13-17	0	0	0	0	0	0	355	367	355	367	0	0	180	190	180	190	0	0

1QI13-25	190	190	190	190	0	0	363	363	363	363	0	0	180	180	180	180	0	0	
1QI13-46	188	198	188	198	0	0	365	365	365	365	0	0	182	192	182	192	0	0	
1PI13-04	192	192	192	192	0	0	351	357	351	357	0	0	192	210	192	210	0	0	
1PI13-14	224	224	224	224	0	0	355	363	355	363	0	0	170	170	170	170	0	0	
1PI13-35	206	206	206	206	0	0	351	351	351	351	0	0	172	172	172	172	0	0	
1LA13-10	198	198	198	198	0	0	351	369	351	369	0	0	184	190	184	190	0	0	
1LA13-23	196	196	196	196	0	0	351	351	343	351	1	0	170	170	170	170	0	0	
1LA13-39	190	198	190	198	0	0	355	365	355	365	0	0	170	170	170	170	0	0	
1CN13-07	190	204	190	204	0	0	351	365	351	365	0	0	0	0	0	0	0	0	
1CN13-15	190	204	190	204	0	0	351	351	351	351	0	0	170	170	170	170	0	0	
1CN13-28	190	192	190	192	0	0	351	351	351	351	0	0	180	208	180	208	0	0	
2CB13-01	192	192	192	192	0	0	351	365	351	365	0	0	180	190	180	190	0	0	
2CB13-22	196	208	196	208	0	0	355	363	355	363	0	0	190	210	190	210	0	0	
2CB13-33	200	206	200	206	0	0	351	363	351	363	0	0	190	190	190	190	0	0	
<hr/>																			
N° de inv. que no coinciden	17					2	2					1	0					0	0
% de inv. que no coinciden	1,98%					6,06	6,06					3,03	0					0	0
<hr/>																			
Individuo lectura fallida	11					2	2					0	0					0	0
% Individuo lectura fallida	1,28%					6,06	6,06					0	0					0	0
<hr/>																			
Diferencia en el genotipo	6					0	0					1	0					0	0
% diferencia en el genotipo	0,70%					0	0					3,03	0					0	0

ANEXO VII Frecuencias alélicas para los 14 loci SSR en *Mytilus* spp de localidades del sur de Chile en los años 2009 y 2013.

		Localización del Muestreo											
locus	Alelos	Localidades 2009						Localidades 2013					
		1QI09	1PI09	1LA09	1CN09	2CB09	3IP09	1QI13	1PI13	1LA13	1CN13	2CB13	3IP13
Mch-UCH01	131	-	1,04	-	-	-	-	-	-	-	-	2,08	-
	137	-	-	1,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	140	1,00	2,08	4,08	3,00	9,18	-	1,00	1,02	2,00	-	2,08	3,13
	143	-	5,21	6,12	2,00	4,08	-	6,00	6,12	5,00	4,08	2,08	3,13
	146	2,00	-	-	-	2,04	-	-	2,04	2,00	-	-	-
	149	1,00	4,17	4,08	-	2,04	-	2,00	-	-	-	-	-
	152	5,00	1,04	2,04	7,00	2,04	3,00	7,00	5,10	-	3,06	5,21	-
	155	4,00	3,13	7,14	4,00	8,16	2,00	7,00	1,02	4,00	3,06	6,25	-
	158	7,00	6,25	12,24	11,00	8,16	2,00	10,00	15,31	10,00	3,06	8,33	6,25
	161	8,00	12,50	12,24	8,00	2,04	8,00	14,00	12,24	12,00	25,51	8,33	3,13
	164	10,00	12,50	7,14	13,00	14,29	9,00	8,00	3,06	6,00	13,27	11,46	19,79
	167	14,00	3,13	9,18	8,00	2,04	6,00	5,00	6,12	7,00	6,12	6,25	3,13
	170	2,00	5,21	3,06	10,00	5,10	6,00	9,00	7,14	7,00	3,06	7,29	6,25
	173	5,00	3,13	7,14	4,00	8,16	-	6,00	3,06	3,00	2,04	3,13	3,13
	176	4,00	2,08	5,10	8,00	1,02	6,00	3,00	8,16	5,00	5,10	-	3,13
	179	1,00	7,29	1,02	4,00	5,10	6,00	4,00	12,24	6,00	5,10	-	6,25
	182	2,00	3,13	1,02	3,00	4,08	3,00	5,00	2,04	1,00	2,04	5,21	9,38
	185	7,00	2,08	5,10	1,00	-	3,00	2,00	4,08	-	2,04	5,21	1,04
	188	4,00	7,29	1,02	2,00	11,22	10,00	-	3,06	1,00	6,12	2,08	4,17
	191	3,00	4,17	1,02	2,00	-	5,00	-	3,06	4,00	-	2,08	4,17
	194	4,00	-	1,02	-	1,02	5,00	2,00	2,04	-	3,06	10,42	1,04
	197	2,00	-	-	1,00	5,10	8,00	3,00	-	2,00	2,04	3,13	4,17
	200	2,00	1,04	-	1,00	3,06	-	-	1,02	7,00	1,02	2,08	2,08
	203	2,00	4,17	1,02	-	1,02	-	2,00	-	-	5,10	-	1,04
	206	-	5,21	-	3,00	-	5,00	-	-	1,00	1,02	3,13	2,08
	209	2,00	-	-	1,00	1,02	10,00	-	-	-	2,04	-	3,13
	212	3,00	-	-	-	-	1,00	2,00	-	-	2,04	2,08	3,13
	215	-	1,04	2,04	1,00	-	-	-	-	-	-	-	2,08
	218	-	2,08	1,02	3,00	-	-	-	-	3,00	-	-	2,08
	221	-	-	-	-	-	1,00	-	-	2,00	-	-	1,04
224	1,00	-	-	-	-	1,00	-	-	2,00	-	-	-	
227	-	-	1,02	-	-	-	-	1,02	2,00	-	-	-	
230	4,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
233	-	1,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,08	
239	-	-	-	-	-	-	-	1,02	-	-	-	-	
242	-	-	-	-	-	-	2,00	-	4,00	-	-	-	
248	-	-	3,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
251	-	-	1,02	-	-	-	-	-	-	-	2,08	-	
305	-	-	-	-	-	-	-	-	2,00	-	-	-	

ANEXO VII Continuación

Localización del Muestreo													
locus	Alelos	Localidades 2009						Localidades 2013					
		1QI09	1PI09	1LA09	1CN09	2CB09	3IP09	1QI13	1PI13	1LA13	1CN13	2CB13	3IP13
Mch-UCH02	291	-	-	-	-	-	-	-	4,08	2,08	2,08	-	-
	386	1,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,19	-
	391	1,02	-	-	2,00	3,13	-	-	-	-	-	-	-
	396	-	1,06	-	2,00	2,08	-	11,70	1,02	2,08	2,08	13,83	6,52
	401	90,82	91,49	91,49	91,00	88,54	79,59	87,23	92,86	91,67	92,71	75,53	79,35
	406	5,10	5,32	6,38	5,00	3,13	12,24	1,06	2,04	4,17	2,08	7,45	13,04
	411	2,04	2,13	-	-	3,13	6,12	-	-	-	1,04	-	1,09
	416	-	-	2,13	-	-	2,04	-	-	-	-	-	-
Mch-UCH11	179	2,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	188	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	191	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00
	194	1,00	2,08	1,09	1,06	-	-	1,00	1,02	-	3,06	-	4,00
	197	-	-	-	-	1,11	-	-	-	-	-	-	2,00
	200	1,00	1,04	2,17	6,38	3,33	-	2,00	2,04	1,04	4,08	3,13	6,00
	203	56,00	41,67	36,96	44,68	36,67	55,00	57,00	48,98	43,75	39,80	46,88	42,00
	206	35,00	53,13	59,78	46,81	58,89	45,00	40,00	46,94	55,21	53,06	48,96	45,00
	209	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,04	-
	212	3,00	2,08	-	1,06	-	-	-	1,02	-	-	-	-
Mch-UCH12	232	-	-	-	-	1,14	-	-	-	-	-	2,17	-
	250	-	-	-	-	-	-	5,32	-	-	-	-	-
	253	-	-	-	-	-	-	1,06	-	-	-	-	-
	292	-	-	-	-	-	-	-	1,14	-	-	-	-
	304	62,20	67,02	70,45	73,96	78,41	68,60	71,11	67,02	68,18	72,92	69,57	58,70
	307	23,17	29,79	23,86	13,54	17,05	22,09	21,11	11,70	13,64	16,67	15,22	26,09
	310	8,54	-	-	-	-	5,81	1,11	4,26	2,27	2,08	8,70	3,26
	313	6,10	3,19	5,68	4,17	2,27	3,49	4,44	5,32	10,23	6,25	4,35	4,35
	316	-	-	-	-	1,14	-	-	-	2,27	-	-	-
	337	-	-	-	8,33	-	-	2,22	5,32	2,27	2,08	-	7,61
Mch-UCH15	342	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00
	345	3,19	-	1,04	-	-	1,09	10,00	2,13	-	-	-	1,00
	348	-	1,04	2,08	2,08	2,13	-	3,00	11,70	6,12	14,00	2,17	5,00
	351	68,09	65,63	63,54	57,29	50,00	58,70	60,00	65,96	59,18	60,00	75,00	68,00
	354	6,38	5,21	7,29	16,67	9,57	14,13	4,00	3,19	9,18	2,00	5,43	2,00
	357	21,28	28,13	22,92	23,96	38,30	21,74	20,00	17,02	25,51	24,00	17,39	20,00
	363	-	-	3,13	-	-	-	2,00	-	-	-	-	3,00
	366	1,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	372	-	-	-	-	-	4,35	-	-	-	-	-	-
	384	-	-	-	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-
Mch-UCH20	245	-	-	-	-	1,04	-	-	-	-	-	-	-
	248	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00
	251	99,00	93,00	97,83	97,96	96,88	95,83	93,88	93,88	98,98	100,00	97,96	92,00
	254	1,00	7,00	2,17	2,04	2,08	4,17	6,12	6,12	1,02	-	2,04	7,00

ANEXO VII Continuación

Localización del Muestreo													
locus	Alelos	Localidades 2009						Localidades 2013					
		1QI09	1PI09	1LA09	1CN09	2CB09	3IP09	1QI13	1PI13	1LA13	1CN13	2CB13	3IP13
Mch-UCH18	161	-	-	-	1,06	-	-	-	-	-	-	-	-
	164	-	-	-	-	-	-	-	2,33	-	-	-	-
	167	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,06	-	-
	176	-	-	-	1,06	-	1,06	-	2,33	1,04	-	-	-
	179	-	-	-	-	-	1,06	-	2,33	-	-	-	-
	182	1,06	1,11	1,04	2,13	-	2,13	-	-	-	-	3,19	-
	185	14,89	4,44	4,17	6,38	5,32	11,70	9,09	10,47	9,38	9,57	8,51	4,26
	188	6,38	10,00	12,50	2,13	8,51	5,32	5,68	2,33	4,17	6,38	2,13	6,38
	191	12,77	16,67	10,42	23,40	20,21	9,57	10,23	12,79	15,63	15,96	23,40	10,64
	194	45,74	33,33	38,54	30,85	32,98	48,94	43,18	46,51	28,13	34,04	30,85	21,28
	197	10,64	18,89	30,21	21,28	24,47	10,64	26,14	15,12	37,50	23,40	25,53	31,91
	200	4,26	8,89	1,04	9,57	4,26	7,45	4,55	5,81	4,17	6,38	2,13	20,21
	203	1,06	-	-	2,13	4,26	1,06	1,14	-	-	1,06	-	5,32
	206	1,06	2,22	2,08	-	-	-	-	-	-	2,13	-	-
	212	2,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	215	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,06	-
	218	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,06	-
	227	-	-	-	-	-	1,06	-	-	-	-	-	-
230	-	4,44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
233	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,06	-	
236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,06	-	
Mch-UCH23	219	-	-	-	-	-	-	1,06	2,04	1,02	2,04	1,04	3,13
	222	91,84	90,82	95,00	87,76	94,90	94,00	82,98	83,67	91,84	84,69	94,79	85,42
	225	7,14	9,18	5,00	8,16	5,10	6,00	15,96	14,29	7,14	13,27	4,17	11,46
	228	1,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	234	-	-	-	4,08	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mch-UCH30	168	-	-	-	-	-	2,27	-	-	-	-	-
171		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,00	-	-
174		-	-	-	1,04	-	-	-	5,10	2,13	3,00	2,04	1,04
177		-	-	-	1,04	-	-	-	-	1,06	-	1,02	2,08
180		-	-	-	2,08	-	2,27	-	-	-	-	-	-
186		-	-	-	-	-	3,41	-	-	-	-	-	-
189		-	-	-	-	1,00	6,82	-	5,10	-	-	-	-
192		6,45	2,08	-	-	4,00	6,82	1,04	1,02	-	-	-	-
195		-	-	1,02	2,08	4,00	4,55	-	-	-	-	2,04	3,13
198		91,40	92,71	92,86	79,17	85,00	71,59	90,63	78,57	81,91	85,00	84,69	88,54
201		2,15	-	1,02	-	2,00	2,27	1,04	5,10	3,19	3,00	1,02	4,17
204		-	2,08	3,06	-	-	-	-	-	1,06	2,00	-	-
210		-	3,13	2,04	13,54	4,00	-	7,29	5,10	10,64	5,00	7,14	-
213		-	-	-	1,04	-	-	-	-	-	1,00	2,04	1,04

ANEXO VII Continuación

Localización del Muestreo													
locus	Alelos	Localidades 2009					Localidades 2013						
		1QI09	1PI09	1LA09	1CN09	2CB09	3IP09	1QI13	1PI13	1LA13	1CN13	2CB13	3IP13
Mch-UCH104	163	-	-	-	-	-	-	-	2,22	-	-	-	
	227	1,02	-	1,00	1,04	-	-	2,13	-	-	-	-	
	229	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,02	-	
	233	-	-	-	1,04	-	-	-	-	-	-	-	
	235	-	-	-	-	-	-	-	1,11	-	-	-	
	237	-	-	-	-	-	-	1,09	-	1,11	-	1,02	-
	239	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,02	-	-
	249	8,16	19,00	7,00	5,21	-	1,00	10,87	-	1,11	2,04	12,24	7,61
	251	30,61	27,00	29,00	36,46	58,16	51,00	38,04	42,55	46,67	42,86	32,65	45,65
	253	57,14	51,00	60,00	52,08	40,82	46,00	47,83	53,19	45,56	54,08	47,96	46,74
	255	3,06	1,00	1,00	2,08	1,02	2,00	2,17	1,06	2,22	-	2,04	-
257	-	1,00	-	1,04	-	-	-	-	-	-	-	-	
261	-	1,00	2,00	1,04	-	-	-	1,06	-	-	3,06	-	
Mch-UCH110	162	26,04	21,28	27,00	11,46	8,33	29,17	18,09	7,00	4,08	9,00	15,63	25,00
	164	2,08	3,19	4,00	15,63	1,04	-	12,77	17,00	29,59	24,00	9,38	4,55
	166	2,08	-	-	-	1,04	-	-	-	-	-	-	-
	168	-	-	-	-	1,04	-	-	-	-	-	-	-
	170	-	-	-	1,04	-	-	-	-	-	-	-	-
	176	-	-	-	-	-	-	-	1,00	-	-	-	-
	178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,08	-
	188	15,63	25,53	16,00	10,42	10,42	6,25	11,70	17,00	13,27	18,00	9,38	10,23
	190	51,04	47,87	53,00	44,79	75,00	64,58	54,26	43,00	28,57	35,00	59,38	56,82
	192	3,13	2,13	-	16,67	3,13	-	3,19	15,00	24,49	14,00	2,08	3,41
	200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,08	-
MT282	335	-	-	-	-	-	-	-	1,02	-	-	-	
	341	-	-	-	-	-	-	3,19	-	-	-	-	
	345	1,04	-	-	-	-	-	-	-	3,06	-	-	
	347	1,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	349	-	1,00	-	-	-	-	2,13	-	-	-	1,06	
	351	-	2,00	2,13	-	-	-	10,64	6,25	2,04	5,32	1,04	13,83
	353	30,21	37,00	41,49	39,80	43,62	46,81	34,04	33,33	32,65	27,66	22,92	30,85
	355	1,04	1,00	-	1,02	-	3,19	4,26	1,04	1,02	-	4,17	1,06
	357	1,04	-	-	-	-	-	-	-	2,04	5,32	1,04	-
	359	27,08	24,00	19,15	22,45	27,66	20,21	18,09	16,67	24,49	28,72	20,83	12,77
	361	-	1,00	-	-	1,06	-	2,13	2,08	-	1,06	2,08	-
	363	-	-	-	-	-	-	-	-	2,04	-	-	-
	365	10,42	6,00	4,26	9,18	6,38	3,19	2,13	10,42	3,06	5,32	9,38	14,89
	367	18,75	14,00	19,15	17,35	9,57	18,09	15,96	12,50	14,29	11,70	29,17	15,96
	369	7,29	11,00	12,77	9,18	8,51	6,38	6,38	12,50	10,20	10,64	8,33	3,19
	371	-	-	-	-	3,19	-	-	1,04	3,06	1,06	-	1,06
	373	1,04	-	1,06	1,02	-	2,13	-	-	1,02	1,06	-	2,13
	375	1,04	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,13
	377	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,06
379	-	2,00	-	-	-	-	1,06	-	-	-	1,04	-	
381	-	-	-	-	-	-	-	4,17	-	2,13	-	-	

ANEXO VII Continuación.

Localización del Muestreo

locus	Alelos	Localidades 2009					Localidades 2013						
		1QI09	1PI09	1LA09	1CN09	2CB09	3IP09	1QI13	1PI13	1LA13	1CN13	2CB13	3IP13
MT203	194	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,04
	198	-	-	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-
	200	-	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	202	-	1,00	-	-	-	-	1,09	-	-	1,00	1,09	-
	204	30,68	19,00	18,00	27,27	28,00	21,43	30,43	33,67	24,00	31,00	38,04	26,53
	206	12,50	17,00	13,00	13,64	12,00	15,31	7,61	16,33	16,00	12,00	13,04	19,39
	208	-	-	2,00	1,14	-	-	1,09	-	-	-	1,09	-
	210	11,36	18,00	15,00	12,50	13,00	7,14	11,96	4,08	16,00	16,00	7,61	7,14
	212	20,45	23,00	25,00	20,45	10,00	23,47	20,65	18,37	15,00	16,00	18,48	25,51
	214	9,09	3,00	1,00	3,41	7,00	5,10	5,43	1,02	6,00	5,00	4,35	1,02
	216	2,27	-	-	-	2,00	1,02	2,17	-	-	-	1,09	-
	218	2,27	1,00	3,00	1,14	3,00	1,02	4,35	2,04	-	2,00	1,09	1,02
	220	2,27	-	2,00	-	3,00	2,04	-	-	2,00	3,00	2,17	-
	222	1,14	-	2,00	2,27	3,00	1,02	3,26	6,12	2,00	4,00	2,17	1,02
	224	-	1,00	-	5,68	7,00	1,02	4,35	2,04	6,00	1,00	2,17	3,06
	226	2,27	2,00	2,00	4,55	1,00	3,06	-	4,08	7,00	5,00	-	3,06
	228	3,41	4,00	3,00	2,27	3,00	7,14	1,09	8,16	-	-	3,26	2,04
	230	1,14	4,00	2,00	-	-	3,06	1,09	1,02	5,00	3,00	2,17	3,06
	232	-	-	-	1,14	4,00	5,10	1,09	1,02	1,00	-	-	-
	234	-	2,00	4,00	1,14	1,00	-	1,09	-	-	-	2,17	1,02
	236	-	-	2,00	1,14	-	-	1,09	-	-	-	-	2,04
	238	1,14	-	3,00	1,14	1,00	1,02	-	-	-	1,00	-	1,02
	240	-	-	-	-	1,00	-	2,17	-	-	-	-	1,02
	242	-	-	3,00	-	-	1,02	-	2,04	-	-	-	-
	244	-	-	-	-	-	1,02	-	-	-	-	-	-
	248	-	2,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
252	-	2,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
332	-	-	-	1,14	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mgu1	123	-	-	-	-	-	-	1,11	1,06	3,26	6,67	-	
	129	-	-	-	-	-	-	-	1,06	-	-	-	
	131	2,27	23,86	23,86	3,26	1,11	-	26,09	27,78	17,02	21,74	6,67	2,13
	167	-	-	1,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	171	-	-	-	-	2,22	-	-	-	-	-	-	-
	173	25,00	18,18	5,68	4,35	37,78	32,93	15,22	15,56	13,83	8,70	17,78	12,77
	175	10,23	23,86	26,14	27,17	15,56	26,83	20,65	23,33	26,60	28,26	27,78	24,47
	177	-	2,27	2,27	-	-	-	2,17	4,44	3,19	-	-	-
	179	6,82	1,14	-	1,09	-	-	-	1,11	-	1,09	1,11	1,06
	181	2,27	-	-	-	-	4,88	-	1,11	-	1,09	1,11	2,13
	185	5,68	1,14	-	2,17	-	1,22	5,43	-	-	3,26	1,11	2,13
	187	7,95	2,27	7,95	6,52	7,78	1,22	4,35	1,11	4,26	6,52	7,78	5,32
	189	5,68	5,68	10,23	5,43	3,33	6,10	2,17	1,11	6,38	4,35	5,56	6,38
	191	-	-	2,27	2,17	1,11	2,44	1,09	1,11	1,06	-	2,22	5,32
	193	1,14	-	-	2,17	-	-	-	-	2,13	-	-	-
	197	14,77	-	9,09	18,48	15,56	3,66	9,78	5,56	10,64	5,43	10,00	4,26
199	2,27	1,14	-	3,26	2,22	1,22	-	1,11	3,19	4,35	-	10,64	
201	-	-	-	8,70	2,22	-	-	2,22	2,13	1,09	1,11	-	

ANEXO VII Continuación

Localización del Muestreo

locus	Alelos	Localidades 2009						Localidades 2013					
		1QI09	1PI09	1LA09	1CN09	2CB09	3IP09	1QI13	1PI13	1LA13	1CN13	2CB13	3IP13
Mgu1	203	-	-	-	-	1,11	1,22	2,17	-	-	-	-	-
	205	2,27	1,14	-	-	-	1,22	-	-	-	1,09	-	-
	207	-	3,41	-	1,09	-	3,66	2,17	2,22	1,06	2,17	1,11	4,26
	211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,11	1,06
	213	-	-	1,14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	215	-	-	-	2,17	-	-	-	-	1,06	-	-	2,13
	217	1,14	2,27	2,27	1,09	-	1,22	-	-	-	-	-	-
	219	-	-	-	1,09	-	2,44	-	-	-	-	-	1,06
	221	4,55	-	-	-	1,11	-	-	-	-	-	-	2,13
	223	3,41	3,41	1,14	-	3,33	1,22	1,09	-	2,13	-	2,22	1,06
	225	-	2,27	1,14	4,35	2,22	-	2,17	6,67	1,06	1,09	2,22	-
	239	4,55	7,95	5,68	5,43	3,33	8,54	5,43	4,44	2,13	6,52	4,44	9,57
	243	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,13

ANEXO VIII Ranking de los loci según el criterio seleccionado para estimar su grado informativo

F_{ST} outliers 95% IC		PIC ≥ 0,5		N° de alelos/locus ≥ 10		BELS Max asignación*	
2009	2013	2009	2013	2009	2013	2009	2013
<i>Mgu1</i>	<i>Mch-UCH02</i>	<i>Mch-UCH01</i>	<i>Mch-UCH01</i>	<i>Mch-UCH01</i>	<i>Mch-UCH01</i>	<i>Mch-UCH01</i>	<i>Mch-UCH01</i>
	<i>Mch-UCH110</i>	<i>Mgu1</i>	<i>Mgu1</i>	<i>Mgu1</i>	<i>Mgu1</i>	<i>Mgu1</i>	<i>MT282</i>
		<i>MT203</i>	<i>MT203</i>	<i>MT203</i>	<i>MT203</i>	<i>Mch-UCH110</i>	<i>Mgu1</i>
		<i>Mch-UCH18</i>	<i>MT282</i>	<i>MT282</i>	<i>MT282</i>	<i>Mch-UCH18</i>	<i>Mch-UCH18</i>
		<i>MT282</i>	<i>Mch-UCH18</i>	<i>Mch-UCH18</i>	<i>Mch-UCH18</i>	<i>MT203</i>	<i>MT203</i>
		<i>Mch-UCH110</i>	<i>Mch-UCH110</i>	<i>Mch-UCH30</i>	<i>Mch-UCH30</i>	<i>MT282</i>	<i>Mch-UCH110</i>
		<i>Mch-UCH15</i>	<i>Mch-UCH104</i>		<i>Mch-UCH104</i>	<i>Mch-UCH30</i>	<i>Mch-UCH30</i>
		<i>Mch-UCH104</i>	<i>Mch-UCH15</i>		<i>Mch-UCH12</i>		<i>Mch-UCH104</i>
							<i>Mch-UCH15</i>

*Los loci fueron descartados cuando la medida de rendimiento fue menor a 0,75 en el programa BELS (Bromaghin, 2008).