



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Agronómicas
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos

ESTABLECIMIENTO DE LA LINEA DE BASE DE LA VARIABILIDAD GENÉTICO-POBLACIONAL DEL RECURSO CAMARÓN DE ROCA, *RHYNCHOCINETES* *TYPUS*, H. MILNE EDWARDS 1837

Directores de Tesis

DR. CRISTIÁN ARANEDA TOLOSA
DR. RICARDO GALLEGUILLOS
GONZALEZ

Tesis presentada como parte de
los requisitos para optar al
grado de Magíster en Ciencias
de la Acuicultura.

CECILIA ALEJANDRA OÑATE BUSTOS
Biólogo

SANTIAGO – CHILE

2012



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Agronómicas
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos

ESTABLECIMIENTO DE LA LINEA DE BASE DE LA VARIABILIDAD GENÉTICO-POBLACIONAL DEL RECURSO CAMARÓN DE ROCA, *RHYNCHOCINETES* *TYPUS*, H. MILNE EDWARDS 1837

Directores de Tesis

DR. CRISTIÁN ARANEDA TOLOSA
DR. RICARDO GALLEGUILLOS
GONZALEZ

Tesis presentada como parte de
los requisitos para optar al
grado de Magíster en Ciencias
de la Acuicultura.

CECILIA ALEJANDRA OÑATE BUSTOS

Biólogo

SANTIAGO – CHILE

2012

UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Agronómicas
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos

ESTABLECIMIENTO DE LA LINEA DE BASE DE LA VARIABILIDAD GENÉTICO-POBLACIONAL DEL RECURSO CAMARÓN DE ROCA, *RHYNCHOCINETES* *TYPUS*, H. MILNE EDWARDS 1837

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al grado de
Magíster en Ciencias de la Acuicultura.

CECILIA ALEJANDRA OÑATE BUSTOS
Biólogo

COMISIÓN DE TESIS:

Calificaciones

FIRMA

Directores de Tesis

Sr. Cristián Araneda Tolosa
Biólogo, Dr. Ciencias Biomédicas

Sr. Ricardo Galleguillos González
Profesor de Estado, PhD Cs

Profesores Evaluadores/Consejeros

Sr. David Véliz, PhD

Sr. Nelson F. Díaz
Profesor de Estado, Dr. Sc.M Biología

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Marco Retamal que mediante el proyecto Fondef D08I1160 “Cultivo de Camarón de Roca (*Rhynchocinetes typus*) en la Región de Bio-Bio” se inició este trabajo de tesis.

Al Doctor Ricardo Galleguillos por su constante apoyo, confianza y disposición tanto en lo académico como en permitirme utilizar las instalaciones de su laboratorio ACUIGEN en la Universidad de Concepción.

A Sandra Ferrada y Cristian Canales por su gentileza a enseñarme a realizar los análisis genéticos y colaboración en corregir mis escritos.

Al Doctor Cristian Araneda por su orientación y constante aliento durante la realización de este trabajo.

Al Doctor Nelson F. Díaz por permitirme terminar esta tesis.

A mis Padres
Ana María y Raúl

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|---|------|
| AGRADECIMIENTOS | i |
| DEDICATORIA | ii |
| INDICE DE CONTENIDOS | iii |
| INDICE DE TABLAS | v |
| INDICE DE FIGURAS | vi |
| INDICE DE ANEXOS | vii |
| ABREVIATURAS | viii |
| RESUMEN | ix |
| ABSTRACT | x |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Reseña Sobre el Estado Actual de la Pesca y Acuicultura..... | 1 |
| Biología del Camarón de Roca (<i>Rhynchocinetes typus</i>): Distribución, Hábitat, Antecedentes Reproductivos y de su Pesquería..... | 2 |
| La Genética en la Conservación de Recursos..... | 3 |
| Marcadores Moleculares..... | 4 |
| Genética en la Acuicultura de Crustáceos..... | 5 |
| Estructura espacial y dinámica poblacional en invertebrados costeros..... | 6 |
| Hipótesis..... | 10 |
| Objetivos..... | 10 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 11 |
| Obtención de Material Biológico..... | 11 |
| Conservación, Mantenimiento y Toma de Muestras..... | 12 |
| Extracción y Cuantificación de ADN Genómico..... | 12 |
| Marcadores RAPD para Caracterización Molecular..... | 12 |
| - Reacción RAPD..... | 12 |
| - Selección de Partidores..... | 12 |
| - Análisis de Datos y Estadísticos..... | 13 |
| Marcadores COI para Caracterización Molecular..... | 15 |
| - Electroforesis en gel de Agarosa..... | 15 |
| - Análisis de las secuencias del gen <i>COI</i> mitocondrial..... | 15 |
| RESULTADOS | |
| Aislamiento de ADN..... | 16 |
| Selección RAPD-PCR..... | 16 |
| - Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para RAPD..... | 16 |
| - Perfiles Electroforéticos de los Marcadores RAPD Seleccionados..... | 17 |
| Análisis Estadísticos de Marcadores RAPD..... | 19 |
| - Descriptores Genéticos Poblacionales..... | 19 |
| - Test de Homogeneidad Genética..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| - Estructuración Poblacional y Flujo Génico..... | 22 |
| - Identidad y Distancias Genéticas..... | 23 |
| Análisis Estadísticos de Marcadores COI..... | 25 |
| - Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para <i>COI</i> | 25 |
| - Alineamiento y Caracterización de las secuencias..... | 25 |
| - Análisis de Diversidad Genética..... | 27 |
| - Estructuración y Diferenciación Poblacional..... | 28 |
| - Análisis de Distancia Genética, Test de Mantel y Red de Haplotipos..... | 28 |
| DISCUSIÓN..... | 30 |
| Diversidad Genética..... | 30 |
| Heterogeneidad Genética..... | 30 |
| Diferenciación Genética..... | 31 |
| SUGERENCIAS..... | 33 |
| CONCLUSIONES..... | 34 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 35 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----------|
| Tabla 1. Caracterización de los loci RAPD-PCR para cada localidad muestreada de <i>R. typus</i> . Tamaño (pb), número de muestras analizadas (N) y frecuencias alélicas..... | 20 |
| Tabla 2. Test de Homogeneidad/heterogeneidad Genética entre las poblaciones analizadas de <i>R. typus</i> Valores, G_2 , y valores P asociados con su respectivo error estándar..... | 21 |
| Tabla 3: Matriz de probabilidades combinadas para cada comparación por pares..... | 22 |
| Tabla 4. Valores estimados de G_{ST} , F_{ST} (θ) y Nm asociados a sus respectivas desviaciones estándar para las distintas localidades y total..... | 23 |
| Tabla 5. Identidad (sobre diagonal) y distancia (bajo diagonal) Genética de Nei (1972) entre las localidades muestreadas de <i>R. typus</i> | 23 |
| Tabla 6. Matriz de distancia geográfica* en kilómetros lineales entre las localidades muestreadas de <i>R. typus</i> | 24 |
| Tabla 7. Caracterización y contenido de bases de las secuencias analizadas (valores promedio para cada localidad)..... | 26 |
| Tabla 8. Índices de Diversidad COI , diversidad genética (H), número promedio de diferencias a pares (k), sitios polimórficos (s) y diversidad nucleotídica (π) de cada localidad..... | 27 |
| Tabla 9. Haplotipos totales y distribución de los haplotipos para <i>Citocromo Oxidasa I</i> en las tres localidades muestreadas de <i>R. typus</i> | 27 |
| Tabla 10. Valores de F_{ST} entre las tres poblaciones de <i>R. typus</i> muestreadas estimados usando el gen COI | 28 |
| Tabla 11. Distancias genéticas Nei (1972) para el marcador COI entre las localidades muestreadas..... | 28 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Ejemplar <i>Robustus</i> de la especie en estudio en su ambiente natural, Zapallar Región de Valparaíso..... | 3 |
| Figura 2. Zonas de Muestreo de <i>R. typus</i> en el norte chico, centro y sur del país..... | 11 |
| Figura 3. ADN genómico perteneciente a 18 individuos tomados al azar de <i>R. typus</i> en un gel de agarosa al 1%. | 16 |
| Figura 4. Perfil electroforético de RAPD – PCR con el partidor UBC625 en 18 muestras de <i>Rhynchocinetes typus</i> , provenientes de la localidad de Chome, región del Bio Bio..... | 17 |
| Figura 5. Perfil electroforético de RAPD – PCR con el partidor UBC639 en 18 muestras de <i>Rhynchocinetes typus</i> , provenientes de la localidad de Chome, región del Bio Bio..... | 17 |
| Figura 6. Perfil electroforético de RAPD – PCR con el partidor UBC660 en 18 muestras de <i>Rhynchocinetes typus</i> , provenientes de la localidad de Chome, región del Bio Bio..... | 18 |
| Figura 7. Perfil electroforético de RAPD – PCR con el partidor UBC696 en 18 muestras de <i>Rhynchocinetes typus</i> , provenientes de la localidad de Chome, región del Bio Bio..... | 18 |
| Figura 8. Perfil electroforético de RAPD – PCR con el partidor UBC785 en 18 muestras de <i>Rhynchocinetes typus</i> , provenientes de la localidad de Chome, región del Bio Bio..... | 19 |
| Figura 9. Dendograma (algoritmo UPGMA) construido a partir de las distancias genéticas (Nei, 1972), entre las localidades analizadas. Al inicio de cada grupo se indica el porcentaje de repetibilidad de las ramas..... | 24 |
| Figura 10. Representación gráfica del test de Mantel comparando las matrices de distancia genética de Nei (1972) (2) y geográfica entre las tres localidades de <i>R. typus</i> analizadas. (1)..... | 24 |
| Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de Producto de PCR del fragmento de <i>COI</i> . Carril M: Marcador de masa, Carril 1-5: Producto PCR de <i>R. typus</i> | 25 |
| Figura 12. Porción del alineamiento múltiple de secuencias del gen <i>COI</i> . Los códigos de las secuencias de <i>R. typus</i> corresponden a las siguientes localidades Ch=Chome, Z= Zapallar y, MC y HC = Guayacán..... | 26 |
| Figura 13. Red de Haplotipos de las secuencias analizadas en la tres localidades muestreada para <i>R. typus</i> | 29 |

INDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo I. Antecedentes adicionales de la especie..... | 44 |
| Anexo II. Protocolo Extracción de ADN (Modificado de Taggart <i>et al.</i> , 1992)..... | 45 |
| Anexo III. Condiciones Finales de Amplificación..... | 47 |
| Anexo IV. Ciclo de Amplificación..... | 48 |
| Anexo V. Matriz de Datos RAPD Para Software TFPGA (Miller, 1997)..... | 49 |
| Anexo VI. Matriz de Datos Utilizada en Software GenePop..... | 53 |

ABREVIATURAS GENERALES

| | |
|-------------------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ADN _{mt} | Ácido desoxirribonucleico mitocondrial |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| RAPD | ADN polimórfico amplificado al azar |
| COI | Citocromo Oxidasa subunidad I |
| AMOVA | Análisis de la Varianza Molecular |
| Kg | Kilogramo |
| µg | Microgramo |
| M | Molar |
| mM | Mili molar |
| µM | Micro molar |
| µL | Microlitro |
| ng | Nanogramo |
| nm | Nanometro |
| pb | Pares de bases |
| FD | Factor de dilución |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| TBE | Tampón Tris, borato y EDTA |

RESUMEN

La creciente demanda mundial de productos pesqueros y el estancamiento de la pesca extractiva, ha llevado a la acuicultura a la búsqueda de nuevas especies para ser cultivadas. Nowadays, en la región del Bío Bío se potencia al Camarón de Roca como recurso cultivable. La presente investigación genera información base para desarrollar su cultivo, estableciendo parámetros de diversidad genética de sus poblaciones naturales y determinando su grado de estructuración genética. Para ello se utilizaron marcadores moleculares tipo RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) y el gen mitocondrial de la Citocromo Oxidasa subunidad I (*COI*).

Las zonas de muestreadas fueron Guayacán (29°58'0,02"S, 71°21'0,312"W), Zapallar (32°33'01,5"S, 71°27'35,6"W) y Chome (36°46'26"S; 73°12'47"W). De un total de 186 individuos colectados, 170 fueron genotipados con 5 primer RAPD identificándose 34 fragmentos polimórficos. En cuanto a *COI* se analizaron 54 secuencias que contienen 18 haplotipos. Los resultados de los estadísticos genéticos en el caso de los marcadores RAPD (G_{ST} , $F_{ST}(\theta)$ y Nm) al comparar todas las poblaciones fueron de 0,0425, 0,0486 y 11,27 respectivamente, observándose además identidades genéticas de Nei de 0,926 (Chome-Guayacán), 0,952 (Zapallar-Guayacán) y 0,966 (Chome-Zapallar). Para el caso de *COI*, el índice de diversidad genética total fue de 0,786. El estadístico F_{ST} fluctuó entre -0,029 y -0,017, las correlaciones de distancias genéticas con las geográficas mediante pruebas de Mantel resultaron ser bajas 0,32 (RAPD) y 0,62 (*COI*). En el análisis network usando la aproximación Median Joining, se observa una forma de estrella, patrón consistente con una expansión poblacional geográfica reciente. Los análisis realizados indican que no hay presencia de estructuración genética entre las localidades muestreadas.

Este estudio es una primera aproximación al conocimiento a nivel genético de esta especie y su estructura poblacional. El análisis de la estructura genética poblacional brindó información importante con respecto a la forma en que se encuentra distribuida la diversidad genética dentro y entre las áreas muestreadas y que estaría apoyando la hipótesis de que no existe estructuración poblacional a una escala geográfica, no obstante para tomar decisiones de manejo en esta especie se recomienda incluir un mayor número de localidades a lo largo de la distribución de la especie. La información aquí expuesta nos permite inferir además la forma de plantear futuros programas de selección asistida por marcadores (MAS) en esta especie.

ABSTRACT

The growing global request for sea food and the decrease of capture fisheries, aquaculture has led to the search for new species for cultivate. Actually, the rock shrimp (*Rhynchocinetes typus*) in the Bío Bío is enhanced as the resource rock shrimp cultivation. This research generates basic information to develop this commodity, determining parameters of genetic diversity in natural populations and their degree of genetic structuring. For this objective we used molecular markers RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) and the mitochondrial gene Cytochrome Oxidase Subunit I (*COI*).

The areas sampled were Guayacán (29 ° 58'0, 02 "S, 71 ° 21'0, 312" W), Zapallar (32 ° 33'01, 5 "S, 71 ° 27'35, 6" W) and Chome (36 ° 46'26 "S, 73 ° 12'47" W). From a total of 186 individuals collected, 170 were genotyped with 5 RAPD primers identifying 34 polymorphic fragments. Regarding *COI* 54 sequences were analyzed containing 18 different haplotypes. The results of genetic analysis in the case of RAPD markers (G_{ST} , F_{ST} (θ) y N_m) when comparing all populations were 0.0425, 0.0486, and 11.27 respectively, also the observed Nei genetic identities were 0.926 (Chome-Guayacán), 0.952 (Zapallar-Guayacán) y 0.966 (Chome-Zapallar). For the case of *COI*, the total genetic diversity index was 0.786. The F_{ST} statistic ranged between -0.029 and -0.017, genetic correlations with geographic distances using Mantel tests were found to be low 0.32 (to RAPD markers) and 0.62 (*COI* gene). In network analysis using Median Joining approximation, there is a star-shaped pattern consistent with a recent geographic population expansion. Analyses indicate no presence of genetic structure among localities sampled.

This study is a first approach to knowledge at the genetic level of this species and its population structure. Analysis of population genetic structure provided important information regarding the manner in which genetic diversity is distributed within and between sampled areas, that would support the hypothesis that there is no population structure at a geographical scale, however to take management decisions in this species is recommended to include a greater number of locations along the distribution of the species. The information presented also allows us to infer how to approach future programs of marker assisted selection (MAS) in this species.

INTRODUCCIÓN

Reseña Sobre el Estado Actual de la Pesca y Acuicultura.

La pesca y la acuicultura son una fuente importante de ingresos y medios de subsistencia para cientos de millones de personas en todo el mundo, así, la demanda mundial de productos pesqueros ha aumentado significativamente en las últimas décadas, pasando de un consumo per cápita de 11 Kg • persona año⁻¹ en 1970 a 17 Kg en 2007. Las cifras preliminares para 2008 indican un incremento adicional del consumo anual per cápita hasta los 17,1 Kg. En 2009, como consecuencia de las condiciones económicas inciertas, la demanda se mantuvo sin cambios y se prevé que el consumo per cápita haya permanecido estable (FAO, 2010). Si bien, la pesca extractiva se ha estancado durante la década pasada como consecuencia de los límites de explotación en los caladeros, la contribución de la acuicultura a la producción total de la pesca de captura y la acuicultura continuó aumentando y pasó del 34,5 % en 2006 al 36,9 % en 2008. En el período 1970-2008 la producción acuícola de pescado comestible aumentó a un ritmo anual medio del 8,3 %, mientras que la población mundial aumentó en promedio un 1,6 % anual. El resultado combinado del desarrollo de la acuicultura en todo el mundo y la expansión de la población mundial es que el suministro per cápita medio anual de pescado comestible procedente de la acuicultura para el consumo se multiplicó por diez y pasó de 0,7 Kg en 1970 a 7,8 Kg en 2008, lo que supone un incremento medio del 6,6 % anual (FAO, 2010). La producción de especies marinas o dulceacuícolas en condiciones controladas es, por otro lado, enormemente diversa en comparación con los animales domésticos tradicionales, existiendo en la actualidad más de 600 especies explotadas en la acuicultura mundial (FAO, 2012). Esta tendencia, lejos de atenuarse, se acentúa, y entre las prioridades de la Unión Europea (UE) para este sector, además de la estabilización y el crecimiento de la cantidad de especies consolidadas, se incluye la domesticación de nuevas especies para diversificar la creciente demanda de mercado (Martínez, 2005).

Con el creciente interés mundial de desarrollar la acuicultura se están llevando a cabo considerables esfuerzos en Europa, Asia, Norte, Centro y Sudamérica para cultivar intensamente cinco grupos de especies: salmónidos, langostinos, camarones, langostas, ostras y ostiones (San Feliú 1987, Dupré 1992). Debido a la creciente necesidad de desarrollar sistemas de producción que permitan un uso racional y sostenido de las distintas especies acuícolas, en Chile se han establecido numerosos programas para desarrollar la acuicultura (Jiménez-Badillo, 2006, Pérez-Sánchez *et al.*, 2005), que han conducido a la búsqueda de especies nativas que presenten características adecuadas para su cultivo y que puedan ser empleadas como alternativa a la introducción de especies exóticas (Arias-Rodríguez *et al.*, 2006). De hecho actualmente existen diversos programas nacionales para su fomento, “Hacia una acuicultura de nivel mundial (HUAM)” y el “Programa para la Diversificación de la Acuicultura Chilena (PDACH)” impulsados por FONDEF son dos ejemplos de ello, que muestran el interés nacional en la acuicultura como una actividad prioritaria. En este contexto, el camarón de roca es una de las especies nativas que se

pretende potenciar en acuicultura, existiendo en estos momentos un proyecto FONDEF en ejecución preocupado de establecer las bases y parámetros de densidad y alimentación de estos organismos en cautiverio.

Biología del Camarón de Roca (*Rhynchocinetes typus*): Distribución, Hábitat, Antecedentes Reproductivos y de su Pesquería.

El camarón de roca, *Rhynchocinetes typus*, perteneciente al grupo de los decápodos, se encuentra desde la bahía de San Vicente, Chile (36° 44' 37" S – 73° 9' 7" W) por el Sur hasta Lobos de afuera, Perú (6° 57' 0" S - 80° 42' 0" W) por el norte y habita ambientes rocosos hasta los 30 metros de profundidad. Esta especie tiene un ciclo reproductivo no sincronizado, lo que genera una reproducción continua a lo largo del año (Correa y Thiel 2003). Algunos autores sugieren que el camarón de roca migra a aguas poco profundas (Vásquez y Castilla 1982) cuando se reproducen, sin embargo, Correa y Thiel (2003) tras examinar la población durante todo el año sugieren que la migración reproductiva es de menor importancia o no migra para reproducirse como otros crustáceos carideos. Dupré *et al.* (2008) describen por primera vez el desarrollo larval de un representante de la familia *Rhynchocinetidae* en aguas del Pacífico suroriental, determinaron siete estados de zoea que ocurren a través de 10 mudas sucesivas.

Como antecedente anexo, Torres (1983), reportó que los machos de esta especie presentan dos morfos diferentes: uno que fue llamado *typus*, pequeño, muy parecido a la hembra y otro llamado *robustus*, que alcanza tamaños mucho mayores alcanzando un mayor desarrollo de sus pinzas y de sus maxilípedos, Torres alude a que se debería a diferencias genéticas, pero lo único que se sabe hasta ahora, es que los machos *robustus* antes de llegar a esta fase pasan por los estadíos *typus* e *intermedius*, todos los *robustus* inician su madurez sexual en el estado *typus*, pero se desconoce si todos los *typus* tienen el potencial para llegar a *robustus* o si son sólo algunos *typus* los que llegan a *robustus* (Matín Thiel, Académico depto. Biología Marina, Facultad de Ciencias del Mar, U. Católica de Norte, com.pers). Por lo tanto, la única evidencia concreta de esto es que todos los *robustus* han pasado por el estado *typus*. Investigaciones hechas en la Universidad Católica de Norte, sugieren que los machos *robustus* aparentemente establecen territorios definidos, cuevas particulares entre las piedras, y las hembras estarían siendo atraídas a estos lugares. Los machos *robustus*, de gran tamaño, defienden efusivamente a las hembras durante el apareamiento. Por ejemplo, si algún otro macho *robustus* quiere arrebatársela a la hembra, el macho residente realiza una serie de señales visuales para evitar enfrentamientos directos con el macho "intruso", y si el mensaje es claro, el macho más grande se quedará con las hembras. Ahora bien, si el macho es de similar tamaño, se enfrentarán, ambos toman las pinzas de su oponente y luego lanzan arponazos frontales con ambos maxilípedos, que pueden dañar seriamente al oponente o incluso matarlo. Los machos *typus* no enfrentan a los machos *robustus* sino que espera su oportunidad y se aparean con la hembra la mayor cantidad de veces posible.

El camarón de roca constituye un recurso económico de importancia en Chile, especialmente en la Región de Valparaíso donde es explotado para su consumo,

principalmente por pescadores artesanales (Martínez y Arana 1983, Martínez *et al.*, 1988, Dupré *et al.*, 1992) alcanzando un precio de cinco mil pesos el Kg vivo en la caleta de Zapallar, región de Valparaíso (Carlos Allende, pescador artesanal, com.pers). Registros de SERNAPESCA en 2011 indican que en 2010 su captura alcanzó las 8 toneladas, siendo esta exclusiva de la Región de Valparaíso.

Hasta el momento sólo se han realizado estudios sobre su biología reproductiva que se refieren a la fecundidad (Dupré, 1981) estructura y ultraestructura espermática (Dupré y Barros 1983), interacción gamética (Barros *et al.*, 1986: Gómez y Dupré, 2002), desarrollo larval (Dupré *et al.*, 2008). El resto de los estudios se refiere a su pesquería (Martínez y Arana 1983), crecimiento (Martínez *et al.*, 1988) y reclutamiento de juveniles (Vásquez y Castilla 1982), no existiendo en estos momentos ningún estudio publicado relacionado con la genética de estos organismos.



Figura 1. Ejemplar *Robustus* de la especie en estudio en su ambiente natural, Zapallar Región de Valparaíso. Foto gentileza de C. Araneda.

La Genética en la Conservación de Recursos.

El uso de la genética, y particularmente de los marcadores moleculares, en las áreas de la ecología y la evolución no ha dejado de crecer en las últimas décadas. El ámbito de la conservación biológica no es una excepción y este proceso ha dado origen a la disciplina de la genética de la conservación. Los antecedentes de esta disciplina se pueden retrotraer a las preocupaciones tempranas por el mantenimiento de la diversidad genética en especies explotadas (Godoy, 2009). Evaluar el estado de conservación genético de las poblaciones y proponer medidas para preservar la diversidad genética y prevenir los riesgos de naturaleza genética para la persistencia de las poblaciones son sus objetivos centrales, y para esto los marcadores moleculares han resultado enormemente útiles (Godoy, 2009).

La diversidad genética constituye la materia prima que permite a las poblaciones adaptarse a los cambios del medio ambiente. En las poblaciones aparecen constantemente variantes genéticas por medio de las mutaciones o por flujo de material genético proveniente de otras poblaciones (Pérez, 1993). Así, se crean formas alternativas o alelos de un gen (o secuencia de ADN), cuya presencia es una indicación de variación genética.

Las poblaciones de muchas especies terrestres y acuáticas están a menudo subdivididas en subpoblaciones o demos, que en ocasiones han desarrollado diferenciación genética y adaptación a ambientes locales. Por lo tanto, la pérdida de uno o más de estos demos reduce la diversidad genética total de la especie y puede ocasionar la pérdida de variantes genéticas únicas (Pérez, 1993).

A nivel de conservación se han propuesto varias metas, una de estas es que la conservación de la biodiversidad, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos sea, entre otras cosas, mediante un acceso adecuado a esos recursos y a una transferencia apropiada de las tecnologías pertinentes, teniendo en cuenta todos los derechos sobre esos recursos y a estas tecnologías, así como mediante una financiación apropiada (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad, 2010). El análisis de la diversidad genética permite no sólo conocer el acervo génico existente en los sistemas biológicos, sino también establecer las bases para prevenir riesgos de extinción de especies y con ello preservar la biodiversidad (García, 2010). La pérdida de diversidad genética es ocasionada por la deriva genética y la consanguinidad, especialmente en las poblaciones de tamaño pequeño, y también por la eliminación selectiva de genotipos específicos (Frankham *et al.*, 2002). En teoría, toda actividad o proceso que exploten selectivamente tipos individuales o reduzca considerablemente el tamaño de la población, modificará la estructura genética de las poblaciones naturales (Smith, 1996).

Los estudios genético-poblacionales, se utilizan como herramientas en el objetivo de la conservación de los recursos genéticos, además buscan comparar diferencias entre individuos de una misma especie y tratar de establecer relaciones de proximidad entre ellos a nivel de sus poblaciones (Boto, 2010), existiendo para este fin marcadores moleculares presentes en ADN nuclear y mitocondrial.

Marcadores Moleculares.

Un tipo de marcador basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son los marcadores RAPD (Araneda *et al.*, 2005). Los fragmentos RAPD son heredados de forma mendeliana y pueden ser obtenidos de cualquier especie aun sin contar con información de la secuencia de ADN (Williams *et al.*, 1992). Con la técnica de RAPD-PCR se busca amplificar pequeñas secuencias de ADN de los individuos de las poblaciones en estudio, para usarlos como marcadores genéticos que pueden compararse a través de las poblaciones por medio de métodos estadísticos (Williams *et al.*, 1990). En el patrón de fragmentos RAPD amplificados se identifican secuencias que son constantes (monomórficas) o que cambian entre los individuos (polimórficas). Estos análisis permiten estimar niveles de

variación entre alelos, en sub-poblaciones de un área geográfica determinada (García *et al.*, 1999). Los RAPD son usualmente marcadores dominantes con polimorfismos entre individuos definidos por la presencia o ausencia de un fragmento. De acuerdo con Tingey y del Tufo (1993), cada partidor dirigirá la amplificación de varios loci discretos en el genoma, permitiendo detectar polimorfismo entre individuos. El número y tamaño de los fragmentos amplificados dependerá de la secuencia de nucleótidos del partidor y el contenido del ADN de la especie. El número de fragmentos amplificados puede ser muy alto dada la gran cantidad de partidores disponibles, al igual que el número de amplicones producido por cada uno. Sin embargo, también existen partidores que no muestran amplificación en determinados genomas, el protocolo es relativamente rápido y fácil de realizar (Araneda, 2003). Estos marcadores poseen la desventaja de que debido a su naturaleza dominante hay pérdida de información genética, los polimorfismos RAPD no son extrapolables a otras especies, e incluso dentro de poblaciones de una misma especie, además poseen baja reproducibilidad. No obstante, se siguen usando en muchos laboratorios, ya que ofrecen una manera rápida y fácil de detectar posibles marcadores moleculares de muchos loci y a un bajo costo.

Otro tipo de marcador molecular muy utilizado en diversos estudios de caracterización de especies son los que encontramos dentro del ADN mitocondrial (ADN_{mt}). Entre las propiedades de estos marcadores se puede mencionar su facilidad para obtenerlo y para ser diferenciado del ADN nuclear. Además, es un genoma haploide, heredado por vía materna sin que ocurra recombinación (Brown *et al.*, 1979, 1982). Algunas regiones del ADN mitocondrial poseen una alta tasa de mutación, lo que hace que su evolución en los vertebrados sea cuatro veces más rápida que en la mayoría de los genes nucleares (Vences *et al.*, 2005, Rubinoff 2006). Un marcador basado en ADN_{mt} utilizado extensamente en estudios poblacionales es el gen de la citocromo c oxidasa I (*COI*), este marcador de aproximadamente 600 pb resulta ser adecuado para realizar estudios a nivel intraespecífico (Awise 2000, Hebert *et al.*, 2003a, Vences *et al.*, 2005, Rubinoff 2006). Según estas características, podríamos encontrar variabilidad intraespecífica en las secuencias de este gen en el genoma mitocondrial del camarón de roca y así utilizarlo como un marcador genético para establecer diferencias dentro de las localidades en estudio. En este sentido, cabe decir que el análisis de secuencias de ADN nuclear o de ADN mitocondrial proporciona información ligeramente diferente y complementaria (Boto, 2010). En el último tiempo, la necesidad y posibilidad de un estudio más directo del material genético, ha permitido incrementar cada vez más el uso de marcadores moleculares de ADN (Oines, 2005), dado que presentan un mayor poder de resolución y eficiencia para detectar las diferencias de variabilidad genética entre poblaciones o individuos (Awise, 2000). La variabilidad del ADN_{mt} se ha utilizado para estudiar la estructura genética de las poblaciones de vertebrados e invertebrados marinos (Ovenden, 1990; Vietes *et al.*, 2006).

Genética en la Acuicultura de Crustáceos.

El progreso que ha mostrado la acuicultura de especies de crustáceos en las últimas décadas se ha basado principalmente en el mejoramiento de tecnologías de cultivo para producir semillas y su crecimiento en condiciones controladas hasta la talla de cosecha. Para que

continúe el desarrollo de la Acuicultura de estos organismos, se hace necesario incorporar principios y tecnologías provenientes de la genética. Para lograr esto Fujino en 1981 ya consideraba tres etapas: 1) la descripción de las características de los recursos genéticos o poblacionales silvestres utilizando varios tipos de marcadores genéticos. 2) el desarrollo de tecnologías para mejoramiento genético y 3) la identificación de problemas relacionados con la conservación de los recursos genéticos (Von Brand-Skopnik y Ibarra-Humphries 2001).

La genética de crustáceos empezó a cobrar importancia en los últimos años, con un desarrollo más reciente y menor que el que se ha observado en peces e incluso bivalvos. En crustáceos podemos considerar que estamos en la primera de las etapas mencionadas por Fujino (1981), lo que se demuestra con la escasez de trabajos publicados en las diversas bases de datos existentes, sobre todo para camarón de roca.

La caracterización molecular de las especies acuícolas es además un pre-requisito imprescindible de los futuros programas de mejoramiento genético, pues permite detectar regiones del genoma (polimorfismos) que diferencian unos individuos de otros (Trigiano y Caetano-Anollés, 1998), pero más que eso, permite determinar la estructura genética de las poblaciones en su ambiente natural.

La estructura genética de las poblaciones se ha estudiado en términos de estadísticos-F, desde que Wright (1978) propusiera medir la desviación de las frecuencias genotípicas mediante los parámetros F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} . Actualmente, la estimación de parámetros puede realizarse haciendo uso de la información molecular presente en las poblaciones que forman la muestra con el método conocido como Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). Existen varios estimadores de la variabilidad genética que se emplean cuando se trabaja con secuencias de ADNmt, siendo las más frecuentes: diversidad haplotípica (π) y diversidad nucleotídica (η) (Fontdevila, 1999).

Estructura espacial y dinámica poblacional en invertebrados costeros.

Para establecer relaciones entre los resultados que se obtienen con los estudios moleculares tenemos como antecedentes que los crustáceos decápodos presentan ciclos vitales complejos, que comprenden en general fases larvarias planctónicas y fases postlarvarias bentónicas, lo que determina que su distribución espacial y dinámica de poblaciones se encuentre en estrecha relación tanto con procesos de dispersión larvaria, mediados por factores físicos, como de selección de hábitat ligados a los patrones de movimientos y migraciones en estadíos postlarvarios (Botsford *et al.*, 1994; 1998; Corgos, 2004).

En peces de arrecife y otros invertebrados marinos sésiles o de escasa movilidad que habitan áreas intermareales o submareales al igual que *R. typus*, la abundancia y estructura de las poblaciones depende en primer lugar de procesos oceanográficos que determinan el aporte de larvas hacia los hábitats adecuados (Botsford, 2001; Botsford *et al.*, 2001; Corgos, 2004), y en segundo lugar de procesos que afectan a las fases juveniles, especialmente predación y canibalismo, dependientes de la densidad y de la disponibilidad

de hábitats adecuados como refugio (Botsford, 1995; Luppi *et al.*, 2002). La estructura espacial que genera la heterogeneidad del hábitat junto con los procesos de dispersión larvaria y selección de hábitat pueden dar lugar a la generación de una estructura metapoblacional (Botsford *et al.*, 1994; Botsford, 1995), constituida por subpoblaciones postlarvarias locales cuya dinámica depende de: 1) el aporte de larvas planctónicas, 2) los procesos locales de crecimiento y mortalidad y 3) los movimientos de dispersión y migratorios entre zonas. El conocimiento de los procesos de reclutamiento (definido como la aparición de fases postlarvarias iniciales en hábitats bentónicos; Booth y Brosnan, 1995), del comportamiento individual (movimientos y selección de hábitat) y de la distribución a distintas escalas y sus cambios estacionales, presenta una gran importancia para la comprensión de la estructura poblacional, la interconexión y factores de regulación de las distintas poblaciones locales (Corgos, 2004).

El término y el concepto “metapoblación” en sentido estricto fue introducido por Levins (1969, 1970), pero hasta los años 90 no se generalizó el uso de este término. El modelo de metapoblación propuesto por Levins (1970) incluye tres supuestos: 1) las poblaciones locales son equivalentes en tamaño y en grado de aislamiento, 2) las dinámicas poblacionales internas de las poblaciones locales son asíncronas, y 3) la tasa de intercambio de individuos entre poblaciones locales es demasiado baja para afectar a la dinámica de las poblaciones locales (Corgos, 2004). El modelo de Levins ignora la dinámica de las poblaciones locales (Gaines y Lafferty, 1995), centrándose en procesos de extinción/recolonización y el grado de aislamiento de cada población local (Gaines y Lafferty, 1995; Hanski, 1998), por lo que proporciona un marco inapropiado para la dinámica metapoblacional de las especies marinas, ya que no se ajusta a los ciclos biológicos de la mayoría de organismos marinos (Corgos, 2004). Es más, en el medio natural las poblaciones que cumplen estrictamente los supuestos de Levins son escasos (Harrison y Taylor, 1997) o no existen (Grimm *et al.*, 2003; Hanski y Simberloff, 1997), por lo que los supuestos más específicos como la 1), (las poblaciones locales son equivalentes en tamaño y en grado de aislamiento) se podrían flexibilizar sin cambiar el concepto. Hanski y Simberloff (1997) proponen un modelo metapoblacional formado por una serie de poblaciones locales abiertas conectadas mediante intercambio de individuos. Para la mayoría de invertebrados marinos la migración entre poblaciones se produce mediante la dispersión larvaria. Smedbol *et al.*, (2002) añadieron que las metapoblaciones deben comprender una serie de poblaciones locales semiindependientes, de las cuales al menos una debe tener una probabilidad de extinción mayor que cero. De este modo, en el medio marino sería imposible, en la mayoría de los casos decidir si una población presenta estructura metapoblacional, y muchos investigadores (tanto en ecología terrestre como marina), asumen que cualquier distribución de los hábitats de adultos en parcelas es una “metapoblación” (Grimm *et al.*, 2003). La dinámica metapoblacional en crustáceos decápodos se ha analizado desde el punto de vista de la dispersión larvaria como determinante de la conectividad de las poblaciones locales postlarvarias (Botsford, 1995; Botsford *et al.*, 1994, 1998; Gaines y Lafferty, 1995). Por el contrario, la estructura espacial de las fases postlarvarias se ha analizado escasamente (Corgos, 2004) ya que las especies costeras, presentan una serie de peculiaridades biológicas que afectan tanto a los métodos de evaluación como a los sistemas de gestión (Freire, 2007; Orensanz *et al.*, 2005). En

particular, estas especies presentan una elevada persistencia espacial, por lo que la mezcla dinámica no es aplicable, y presentarían por tanto una estructura metapoblacional meroplanctónica, que en este sentido invalidaría la aplicación de la unidad de stock a la escala en que se produce la explotación. Así, los procesos biológicos y pesqueros deben ser analizados a una combinación de escalas, adquiriendo especial relevancia los niveles locales (Freire, 2007).

Los estudios genético-poblacionales han demostrado, que aunque en el ambiente marino las barreras físicas que dificultan la dispersión de las especies son difíciles de distinguir y las poblaciones pueden mezclarse, ya sea por la dispersión de sus larvas o por la libre migración de los adultos (Grantham *et al.*, 2003; Robainas, 2004), en este medio pueden existir poblaciones genéticamente estructuradas a diferentes escalas geográficas (Planes *et al.*, 1998; Robainas, 2004; Taylor y Hellberg 2003). Esta tendencia ha sido descrita para especies ampliamente distribuidas como el arenque y el bacalao (Knutsen *et al.*, 2003; Ruzzante *et al.*, 2001; Shaw *et al.*, 1999) y para otras, como los camarones, caracterizadas por estadios larvales complejos que facilitan su dispersión a merced de las corrientes marinas (Robainas, 2004; Sponaugle *et al.*, 2002). Sin embargo, estudios de flujo génico, que sugieren que muchas poblaciones marinas son homogéneas incluso a escalas espaciales grandes, circulaciones de mesoescala, que minimizan la dispersión a larga distancia favoreciendo la retención, o la existencia de especies endémicas alrededor de islas aisladas, denotan que dichas poblaciones pueden ser sistemas más ‘cerrados’ de lo que se creía (Cowen *et al.*, 2000). De hecho, no parece que un organismo que tenga fase planctónica (independientemente de su duración) presenta mayores fluctuaciones en su población al compararlo con organismos que no posean dicha fase (Eckert, 2003). El estudio del transporte larvario en metapoblaciones (y por ende de flujo génico) tiene importancia por sus implicaciones a la hora de gestionar los recursos (Hanski, 1998) y así conservar el patrimonio genético de estos.

La dinámica de una población natural está controlada por los procesos de reclutamiento, crecimiento individual y mortalidad, y por la variabilidad temporal y espacial de estos procesos. Ello determina que una población esté constituida por una secuencia de generaciones, cuyo patrón está ajustado mediante interacciones biológicas y condiciones físicas del medio (Brey y Gage, 1997). En cuanto a la dinámica de las poblaciones del camarón de roca, esta no se conoce con exactitud por lo que tendremos como referencia la dinámica de la mayoría de las poblaciones de invertebrados marinos, con énfasis en los crustáceos decápodos. Podemos decir por lo tanto, que poseen una movilidad intermedia, sus ciclos vitales son complejos, la relación stock-reclutamiento es evidente sólo en niveles de stock muy bajos, posee agregaciones espaciales a diferentes escalas y están conformadas por metapoblaciones meroplanctónicas (Freire, 2007). El reclutamiento postlarvario depende de la supervivencia larvaria (reservas energéticas, alimento disponible, abundancia y solapamiento espacial de predadores y por supuesto también de las condiciones ambientales que afectan supervivencia y crecimiento), mecanismos físicos de transporte a hábitats de asentamiento adecuados (Procesos oceanográficos y comportamiento). La regulación del tamaño de la población de adultos depende del reclutamiento postlarvario, la supervivencia de juveniles (capacidad de carga en hábitat de juveniles,

predación/canibalismo), y la depensación (reducción del éxito reproductivo, reducción supervivencia postlarvaria) (Caley *et al.*, 1996).

La especie en estudio tiene poco o nulo conocimiento a nivel genético por lo que la presente investigación es una primera aproximación al conocimiento de este ámbito y tiene como objetivo analizar la estructura genética poblacional, determinar la diversidad genética dentro y entre las distintas localidades además de generar información base necesaria para establecer los cimientos de futuros programas de cultivo y mejoramiento genético del camarón de roca.

Hipótesis

El recurso camarón de roca (*Rhynchocinetes typus*) presenta una larva pelágica de varios estadios; considerando que esta le permitiría migrar y dispersarse a través de grandes distancias geográficas, se espera que no exista estructuración genética poblacional en las localidades analizadas.

Objetivos

Objetivo general:

Establecer la línea de base de la variabilidad genético poblacional de esta especie caracterizando mediante marcadores moleculares, nucleares y mitocondriales en poblaciones naturales de *R. typus* presentes en tres localidades a lo largo del rango de distribución de la especie en Chile.

Objetivos Específicos:

1. Estimar la cantidad de diversidad genética que presentan las distintas poblaciones de *R. typus*.
2. Determinar los patrones de distribución de esta diversidad genética.
3. Evaluar si existe correlación genético-geográfica de las poblaciones de camarón de roca

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de Material Biológico.

Los ejemplares de camarón de roca fueron obtenidos desde su medio natural desde las localidades de Guayacán ($29^{\circ}58'0,02''\text{S}$, $71^{\circ}21'0,312''\text{W}$), Zapallar ($32^{\circ}33'01,5''\text{S}$, $71^{\circ}27'35,6''\text{W}$) y Chome ($36^{\circ}46'26''\text{S}$; $73^{\circ}12'47''\text{W}$). Para tal efecto se contó con aportes logísticos del proyecto Fondef D08I1160 “Cultivo de Camarón de Roca (*Rhynchocinetes typus*) en la Región de Bio-Bio”.



Figura 2. Zonas de Muestreo de *R. typus* en el norte chico, centro y sur del país

Conservación, Mantenimiento y Toma de Muestras

Los ejemplares fueron almacenados en primera instancia a una temperatura de -80°C. Para efecto de realizar los análisis se extrajo tejido muscular del cefalotórax, el que fue conservado en alcohol 100 %. Las muestras de tejido fueron almacenadas en el laboratorio de AcuiGen ubicado en el departamento de Oceanografía de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

Extracción y Cuantificación de ADN Genómico

La extracción de ADN de los individuos utilizados en los análisis se hizo por el método del fenol cloroformo de acuerdo a Taggart *et al.* (1992) – modificado (ver anexo II). Se evaluó la integridad de los extractos obtenidos mediante el análisis de 3 µl del “stock” en electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, el cual se visualizó con bromuro de etidio en un trans-iluminador. La concentración del ADN “stock” fue cuantificada en un eppendorf® BioPhotometer con un factor de dilución (FD) de 40 en una cubeta de 1000 µl utilizando la siguiente ecuación: $[\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}] = A_{260} \times \text{FD}/20$. Sólo el ADN que presentó una razón de absorbancia 260/280 nm igual o superior a 1,7 y que se visualizó íntegro en el gel de agarosa fue utilizado y diluido a $6 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (solución de trabajo) en agua libre de nucleasas. El ADN de las muestras que no cumplía con dichas características se eliminó y se procedió a re-extraer.

Marcadores RAPD para Caracterización Molecular

Reacción RAPD

La búsqueda de marcadores RAPD para la caracterización genético-poblacional se hizo utilizando 60 ejemplares representativos de cada localidad. Las condiciones de amplificación se basaron en los procedimientos descritos por Williams *et al.* (1990). las que se fueron estandarizando de acuerdo a los resultados. Las reacciones de RAPD se amplificaron en termocicladores MJ Research® Modelos PTC-100 y PTC-200.

Selección de Partidores

Se evaluó la amplificación de 300 diferentes partidores de 10 bases de las series 500 - 600 y 700 obtenidos desde el centro de síntesis de la Universidad de Columbia Británica (Canadá), de estos fueron escogidos cinco, que fueron los que presentaron mayor número de fragmentos amplificados, mejor definición y reproductibilidad. Los partidores usados y sus respectivas secuencias fueron: UBC625 (5'-CCGCTGGAGC-3'), UBC639 (5'-ATC GAGCACC-3'), UBC660 (5'-AGACGCCGAC-3'), UBC696 (5'-CGGACATGGC-3') y UBC785 (5'-CACCCAACCA-3') (ver condiciones en anexo III.a y IV.a). Los amplicones fueron sometidos a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % a 80 v por aproximadamente 4 h en tampón TBE 0,5x (Tris-borato 0,45 M; EDTA 10 mM pH 8,0), a

continuación fueron visualizados con bromuro de etidio [$5\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$] en un transiluminador y fotografiados con cámara Olympus 5060.

Análisis de Datos y Estadísticos

El análisis de los marcadores RAPD para las tres localidades estudiadas fue realizado utilizando dos software de análisis genético: Tools for Population Genetic Analysis, TFPGA, v1.3 (Miller, 1997) y POPGENE v1.31 (Yeh et al., 1999) cuyas matrices para cada software se encuentran en los anexos V y VI.

El tamaño de los fragmentos obtenidos con las amplificaciones se estimó por comparación con el patrón de un estándar de tamaño de 100 pb (Invitrogen®). Los patrones de bandas obtenidas se analizaron visualmente en base a presencia o ausencia de fragmentos con el objetivo de construir una matriz binaria, codificando “1” como presencia de fragmento y “0” como su ausencia (Toro *et al.*, 2004).

El patrón de fragmentos obtenidos por medio de la técnica RAPD-PCR se analizó como marcadores genéticos suponiendo que cumplen las siguientes condiciones:

- Se trata de marcadores dominantes que segregan de forma mendeliana,
- Las frecuencias genotípicas de los alelos cumplen con el principio de Hardy-Weinberg,
- Todos los alelos recesivos (“ausencia de fragmento”) son idénticos en estado (es decir, provienen de mutaciones idénticas); lo mismo ocurre con los alelos dominantes (“presencia de fragmento”).

Debido a que los marcadores dominantes no permiten verificar empíricamente el equilibrio de Hardy-Weinberg, el porcentaje de fragmentos no amplificados en un locus dado, entrega la frecuencia del homocigoto recesivo (q^2). Por lo tanto los datos ingresados para un organismo diploide y las frecuencias génicas se obtuvieron a partir de la expansión de Taylor, con exacto ajuste a las muestras observadas recomendado para marcadores dominantes y que considera que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para reducir el sesgo asociado con el análisis de marcadores dominantes, del conjunto de datos obtenidos, se eliminan aquellos loci cuyas frecuencias del alelo recesivo sea menor a $3/n$ ($q^2 < 3/n$), donde n es el número de individuos analizados en la población (Lynch y Milligan, 1994). Con el programa TFPGA (Miller, 1997) se aplicó un prueba exacta de diferenciación poblacional analizando la distribución de los alelos en las distintas localidades muestreadas y la hipótesis nula que planteada (H_0) corresponde a que “la distribución alélica es idéntica a través de las poblaciones”. Este test se realiza a partir de una tabla de contingencia con una aproximación de cadena Markov Monte Carlo y se estima un valor global sin sesgo de *P-value* para determinar la existencia de diferencias significativas sobre todos los loci, a través del test exacto de Fisher (Raymond y Rousset, 1995; Guo y Thompson, 1992).

Para corregir los valores de significancia (*P-value*) provenientes de las múltiples comparaciones realizadas para cada loci RAPD y para cada población en estudio, se aplicó una corrección de Bonferroni (Sokal y Rohlf, 2001). Esta técnica estadística ajusta el nivel

de significancia en relación al número de pruebas estadísticas realizadas simultáneamente sobre un conjunto de datos. El nuevo nivel de significancia ajustado para cada prueba se calcula dividiendo el error global de tipo I predeterminado por el experimentador ($\alpha = 0.05$) por el número de pruebas realizadas.

En el caso del programa POPGENE (Yeh et al., 1999), este permite analizar la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones naturales para datos diploides de marcadores dominantes. Con este programa se calcularon las frecuencias génicas, diversidad génica (Nei, 1973), distancia (D) e identidad (I) genética de Nei (1972, 1978) para todos los pares de combinaciones de poblaciones muestreadas, el estadístico G_{ST} para todos los loci, el cual es un equivalente multialélico del Índice de Fijación F_{ST} (Nei, 1973, Wright, 1951). Para cada G_{ST} se realizó un test χ^2 de acuerdo con la fórmula $\chi^2 = F_{ST} 2n$, con $(s - 1) (k - 1)$ grados de libertad, donde s denota el número de localidades y k el número de alelos (Grijalva-Chon *et al.*, 1996). Se estimó el flujo génico, o número de migrantes por generación, entre poblaciones (Nm) a partir de G_{ST} bajo el supuesto de un modelo de población isla, donde se asume que todas las poblaciones analizadas tienen el mismo tamaño efectivo poblacional, los individuos migran desde una población a otra con la misma tasa sin considerar las distancias geográficas entre las poblaciones (Slatkin y Barton, 1989). Junto con esto, para un análisis visual de los resultados se construyó un dendrograma a partir de la matriz de la distancia genética de Nei (1978) utilizando el método de agrupamiento UPGMA (unweighted pair-group method using an arithmetic average). Para probar la homogeneidad/heterogeneidad de las frecuencias génicas a través de las poblaciones se realizó una prueba de homogeneidad de G^2 , el cual está basado en tablas de contingencia (Sokal y Rolfh 2001).

Para evaluar la correlación entre la matriz de distancia genética de Nei (1978) y la matriz de distancia geográfica lineal entre las localidades analizadas (calculada con el software Google Earth) se utilizó la prueba de Mantel (Mantel, 1967).

Marcadores COI para Caracterización Molecular.

Se utilizaron 20 ejemplares de cada localidad para evaluar la amplificación del gen, pero paralelamente se hizo un análisis de rarefacción para ir determinando el tamaño muestral (n) durante el análisis, dependiendo de la diversidad de *COI* en esta especie. La amplificación del marcador *COI* se llevó a cabo por medio de los partidores universales (Folmer *et al.*, 1994): LCO1490 (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3') y HCO2198 (5-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3') (ver condiciones en anexo III.b y IV.b).

Electroforesis en gel de Agarosa.

Se evaluó la amplificación de *COI* por medio de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en tampón TE 0.5X y se estimó la concentración del producto de PCR de *COI*, por medio de un marcador de masa de 1Mb (Invitrogen®). Luego los amplicones se enviaron a la empresa MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur) para su purificación y posterior secuenciación.

Análisis de las secuencias del gen COI mitocondrial.

Las secuencias fueron alineadas con el programa Bioedit (Hall, 1999) adoptando el criterio de homología posicional de los nucleótidos, y posteriormente se corrigió en forma visual las bases no reconocidas por el secuenciador. A partir del alineamiento se estimó los parámetros de diversidad de las secuencias analizadas para determinar la variabilidad genética presente en las localidades en estudio. Estos fueron: Proporción de sitios variables (S), Número de haplotipos (K), Diversidad de haplotipos (H), Diversidad nucleotídica (π). Para tal efecto se usó el software DnaSP v.5. Para determinar la presencia de estructuración poblacional se calculó el índice F_{ST} por pares de localidades con el programa computacional Arlequín versión 3.0 (Excoffier *et al.*, 2005). Para determinar diferencias significativas se utilizó 10.000 permutaciones. Posteriormente se evaluó las relaciones entre haplotipos con la aproximación Median Joining (MJ) para identificar grupos de haplotipos más cercanamente emparentados mediante el programa NETWORK 4.1.09 (Bandelt *et al.*, 1999).

RESULTADOS

Aislamiento de ADN.

Se aisló ADN genómico de un total de 186 individuos. 60 individuos de Chome, y Zapallar y 66 individuos de Guayacán. La integridad y pureza de una alícuota de ADN genómico de *R. typus* se aprecia por el alto peso molecular sin muestras de degradación o contaminación en el gel de agarosa (Fig. 3).

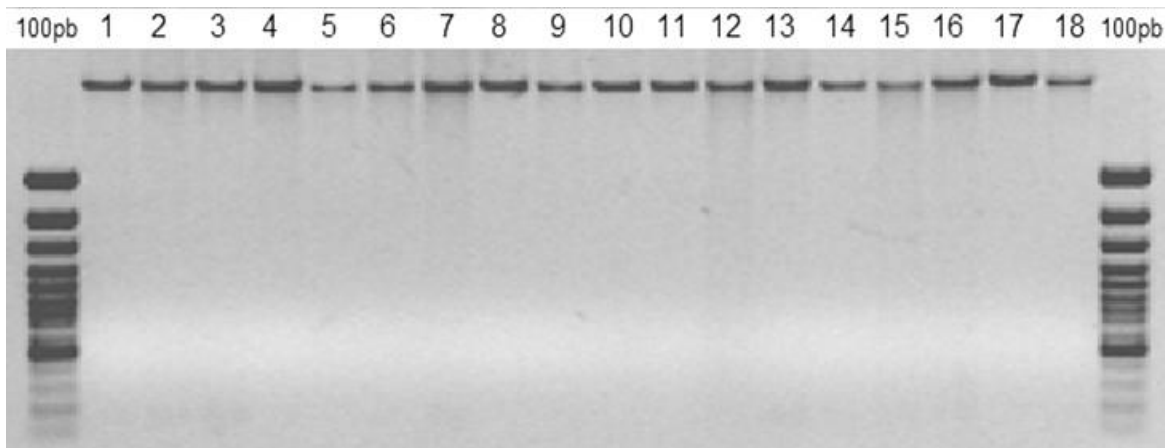


Figura 3. ADN genómico perteneciente a 18 individuos tomados al azar de *R. typus* en un gel de agarosa al 1%. En los extremos se muestra el estándar de tamaño de 100 pb.

Selección RAPD-PCR

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para RAPD

De los 300 partidores probados, 95 resultaron PCR positivos, generando de uno a ocho fragmentos claramente diferenciables, con un tamaño aproximado entre 400 y 2000 pares de bases (pb).

Los cinco partidores utilizados generaron 34 loci polimórficos, amplificando entre seis y ocho marcadores RAPD, cuyos fragmentos fueron enumerados en orden de movilidad electroforética, por ejemplo, para el partidador UBC625 el fragmento 6 corresponde a 625-6 (ver ejemplo en Tabla 1).

Perfiles Electroforéticos de los Marcadores RAPD Seleccionados

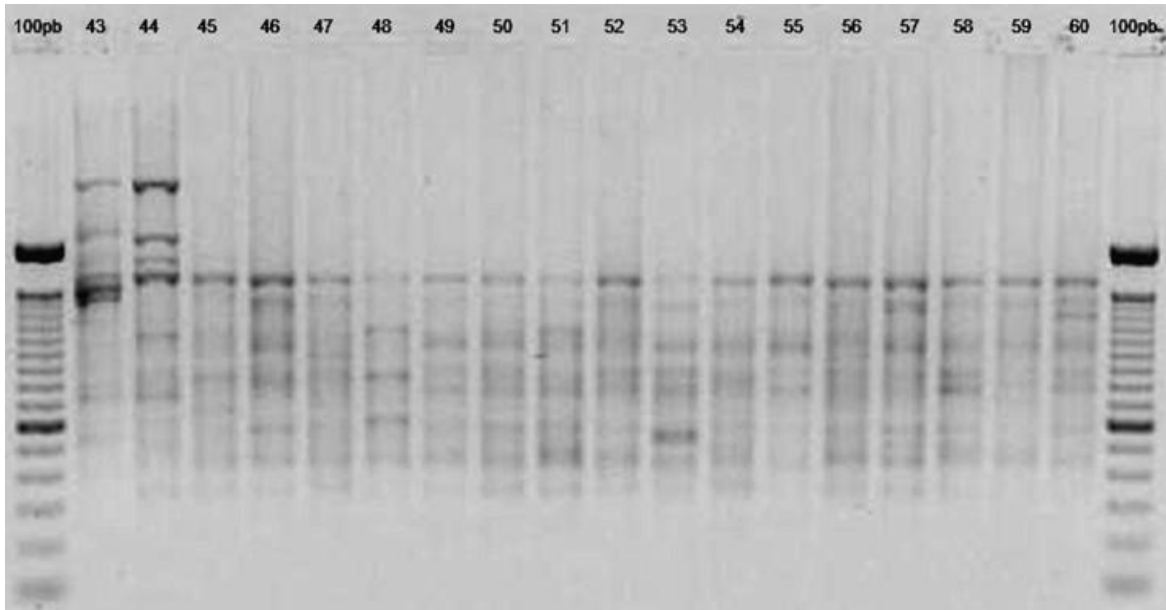


Figura 4. Perfil electroforético de RAPD – PCR con el partidor UBC625 en 18 muestras de *Rhynchocinetes typus*, provenientes de la localidad de Chome, región del Bio Bio.

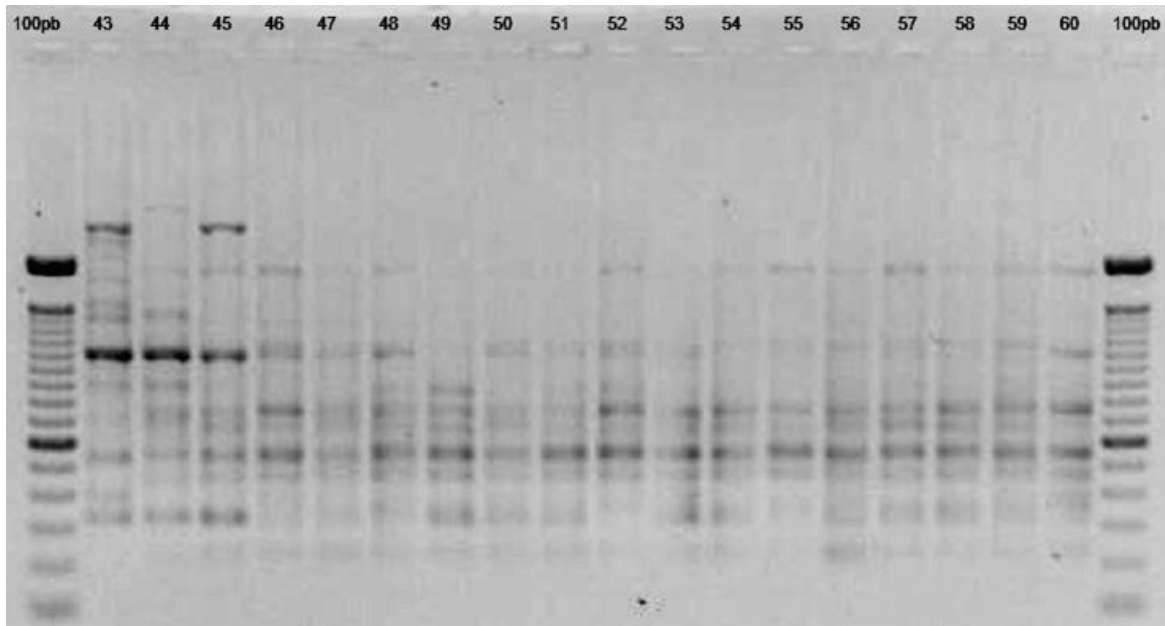


Figura 5. Perfil electroforético de RAPD – PCR con el partidor UBC639 en 18 muestras de *Rhynchocinetes typus*, provenientes de la localidad de Chome, región del Bio Bio.



Figura 6. Perfil electroforético de RAPD – PCR con el partidor UBC660 en 18 muestras de *Rhynchocinetes typus*, provenientes de la localidad de Chome, región del Bio Bio.

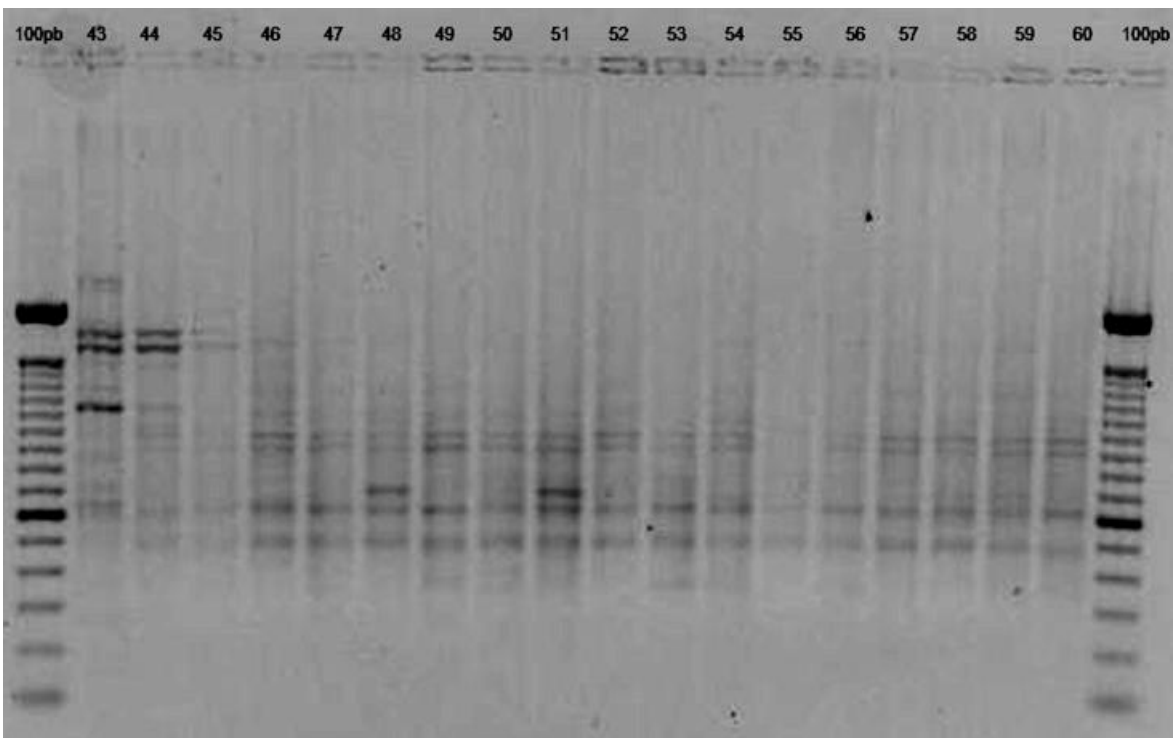


Figura 7. Perfil electroforético de RAPD – PCR con el partidor UBC696 en 18 muestras de *Rhynchocinetes typus*, provenientes de la localidad de Chome, región del Bio Bio.

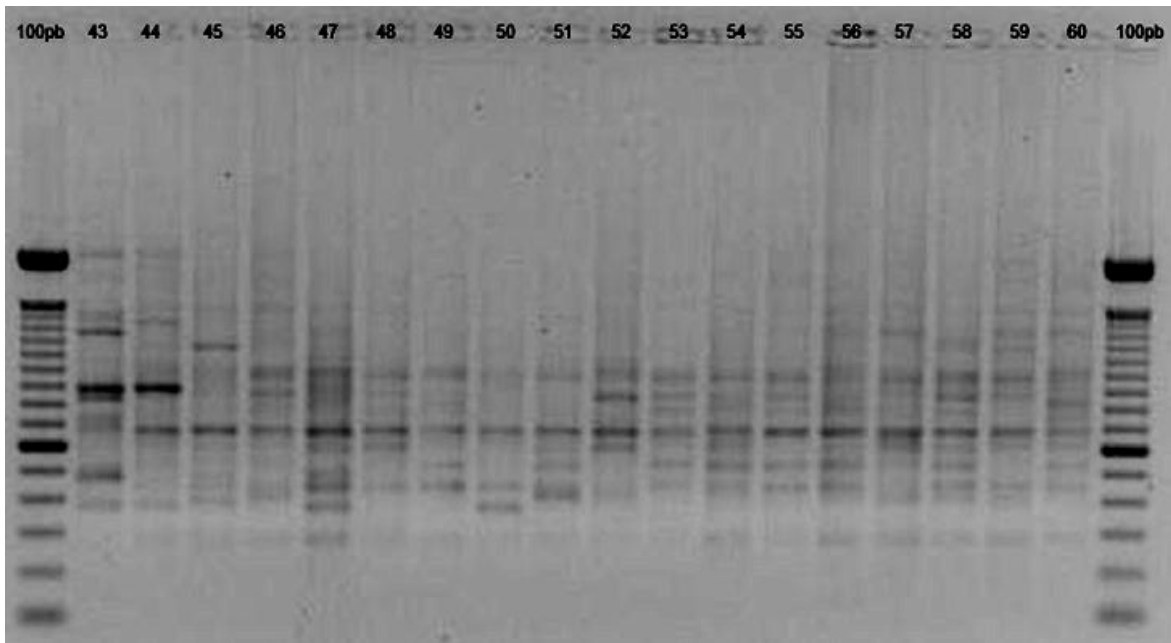


Figura 8. Perfil electroforético de RAPD – PCR con el partidor UBC785 en 18 muestras de *Rhynchocinetes typus*, provenientes de la localidad de Chome, región del Bio Bio.

Análisis Estadísticos de Marcadores RAPD

Descriptores Genéticos Poblacionales

De un total de 186 individuos analizados sólo se genotiparon 170, ya que el resto no presentó buena resolución, quedando incluidos en los análisis 55 individuos de Chome, 49 de Zapallar y 55 de Guayacán.

Los resultados de las frecuencias alélicas (Tabla 1) por loci y por localidad muestran que no hay ningún alelo población específico. De los 34 loci RAPD – PCR analizados 20 dan cuenta de las mayores diferencias en cuanto a frecuencias alélicas entre las poblaciones, destacando entre ellos los siguientes loci: UBC625–1, UBC625–2, UBC625–3, UBC625–4, UBC625–5, UBC625–6, UBC639–1, UBC639–2, UBC639–3, UBC639–4, UBC639–5, UBC639–6, UBC660–3, UBC696–1, UBC696–4, UBC785–2, UBC785–3, UBC785–4, UBC785–5 y UBC785–7 no observándose una relación clara entre las localidades analizadas.

Tabla 1. Caracterización de los loci RAPD-PCR para cada localidad muestreada de *R. typus*. Tamaño (pb), número de muestras analizadas (N) y frecuencias alélicas.

| Primer | Tamaño | Chome | | Zapallar | | Guayacán | |
|----------|--------|-------|-------|----------|-------|----------|-------|
| | | N | Frec. | N | Frec | N | Frec |
| UBC625-1 | 2000pb | 45 | 0.311 | 22 | 0.409 | 60 | 0.600 |
| UBC625-2 | 1600pb | 45 | 0.955 | 22 | 0.863 | 60 | 0.650 |
| UBC625-3 | 1300pb | 45 | 0.755 | 22 | 0.909 | 60 | 0.416 |
| UBC625-4 | 1000pb | 45 | 0.733 | 22 | 0.818 | 60 | 0.366 |
| UBC625-5 | 800pb | 45 | 0.822 | 22 | 0.909 | 60 | 0.600 |
| UBC625-6 | 600pb | 45 | 0.800 | 22 | 0.818 | 60 | 0.350 |
| UBC639-1 | 1900pb | 51 | 0.745 | 45 | 0.511 | 66 | 0.484 |
| UBC639-2 | 1600pb | 51 | 0.254 | 45 | 0.400 | 66 | 0.500 |
| UBC639-3 | 1100pb | 51 | 0.627 | 45 | 0.444 | 66 | 0.454 |
| UBC639-4 | 900pb | 51 | 0.529 | 45 | 0.466 | 66 | 0.803 |
| UBC639-5 | 720pb | 51 | 0.921 | 45 | 0.800 | 66 | 0.636 |
| UBC639-6 | 550pb | 51 | 0.960 | 45 | 0.933 | 66 | 0.696 |
| UBC660-1 | 1900pb | 55 | 0.509 | 49 | 0.632 | 64 | 0.578 |
| UBC660-2 | 1400pb | 55 | 0.527 | 49 | 0.632 | 64 | 0.531 |
| UBC660-3 | 1100pb | 55 | 0.672 | 49 | 0.530 | 64 | 0.718 |
| UBC660-4 | 950pb | 55 | 0.709 | 49 | 0.775 | 64 | 0.703 |
| UBC660-5 | 800pb | 55 | 0.527 | 49 | 0.571 | 64 | 0.656 |
| UBC660-6 | 550pb | 55 | 0.672 | 49 | 0.551 | 64 | 0.671 |
| UBC660-7 | 420pb | 55 | 0.927 | 49 | 0.857 | 64 | 0.828 |
| UBC696-1 | 1900pb | 55 | 0.363 | 48 | 0.541 | 66 | 0.727 |
| UBC696-2 | 1700pb | 55 | 0.600 | 48 | 0.583 | 66 | 0.500 |
| UBC696-3 | 1380pb | 55 | 0.654 | 48 | 0.645 | 66 | 0.636 |
| UBC696-4 | 1000pb | 55 | 0.818 | 48 | 0.562 | 66 | 0.454 |
| UBC696-5 | 900pb | 55 | 0.818 | 48 | 0.791 | 66 | 0.757 |
| UBC696-6 | 800pb | 55 | 0.654 | 48 | 0.666 | 66 | 0.560 |
| UBC696-7 | 600pb | 55 | 0.763 | 48 | 0.604 | 66 | 0.636 |
| UBC696-8 | 500pb | 55 | 0.854 | 48 | 0.812 | 66 | 0.878 |
| UBC785-1 | 1250pb | 52 | 0.596 | 42 | 0.619 | 56 | 0.482 |
| UBC785-2 | 1000pb | 52 | 0.846 | 42 | 0.571 | 56 | 0.535 |
| UBC785-3 | 850pb | 52 | 0.750 | 42 | 0.619 | 56 | 0.535 |
| UBC785-4 | 680pb | 52 | 0.903 | 42 | 0.738 | 56 | 0.750 |
| UBC785-5 | 620pb | 52 | 0.769 | 42 | 0.404 | 56 | 0.589 |
| UBC785-6 | 550pb | 52 | 0.692 | 42 | 0.714 | 56 | 0.535 |
| UBC785-7 | 450pb | 52 | 0.884 | 42 | 0.619 | 56 | 0.642 |

Test de Homogeneidad Genética

Los resultados del test exacto de Fisher (Tabla 2) indican que de los 34 loci RAPD analizados para la especie, 14 de ellos muestran diferencias significativas entre sus frecuencias alélicas para las poblaciones en estudio. Después de la corrección de Bonferroni del nivel de significancia en relación al número de pruebas estadísticas realizadas simultáneamente sobre el conjunto de datos, se redujo a $\alpha' = 0.008$. Así, el número de loci con valores significativos se redujo a once (Tabla 2). Para el análisis global de los 34 loci, se observa heterogeneidad genética significativa entre las tres poblaciones ($P\text{-value} < 0.0000$). Igualmente los valores de $P\text{-value}$ se mantienen significativos para estos al nivel de α' al realizar el análisis por pares de poblaciones (Tabla 3).

Tabla 2. Test de Homogeneidad/heterogeneidad Genética entre las poblaciones analizadas de *R. typos* Valores, G^2 , y valores P asociados con su respectivo error estándar.

| Banda | Tamaño | POPGENE | | TFPGA | |
|------------|--------|-----------|------------------|------------------|--------|
| | | G^2 | $P\text{-value}$ | $P\text{-value}$ | $E.E.$ |
| UBC 625 -1 | 2000pb | 5.39144 | 0.06749 | 0,0215* | 0,0037 |
| UBC 625 -2 | 1600pb | 16.1595 | 0.00031** | 0,0001** | 0,0001 |
| UBC 625 -3 | 1300pb | 17.1661 | 0.00018** | 0,0281* | 0,0032 |
| UBC 625 -4 | 1000pb | 13.8976 | 0.00096** | 0,0054** | 0,0010 |
| UBC 625 -5 | 800pb | 8.93551 | 0.01147* | 0,01067* | 0,0067 |
| UBC 625 -6 | 600pb | 18.5918 | 0.00009** | 0,0004** | 0,0003 |
| UBC 639 -1 | 1900pb | 6.36116 | 0.04156* | 0,0024** | 0,0006 |
| UBC 639 -2 | 1600pb | 4.18444 | 0.12341 | 0,0114* | 0,0026 |
| UBC 639 -3 | 1100pb | 2.79347 | 0.24740 | 0,0453* | 0,0061 |
| UBC 639 -4 | 900pb | 11.5054 | 0.00317** | 0,0170* | 0,0024 |
| UBC 639 -5 | 720pb | 12.3983 | 0.00203** | 0,0025** | 0,0008 |
| UBC 639 -6 | 550pb | 18.4076 | 0.00010** | 0,0048** | 0,0015 |
| UBC 660 -1 | 1900pb | 1.03428 | 0.59622 | 0,3133 | 0,0098 |
| UBC 660 -2 | 1400pb | 0.97889 | 0.61296 | 0,6350 | 0,0094 |
| UBC 660 -3 | 1100pb | 2.89300 | 0.23539 | 0,7253 | 0,0055 |
| UBC 660 -4 | 950pb | 0.65631 | 0.72024 | 0,7199 | 0,0057 |
| UBC 660 -5 | 800pb | 1.38275 | 0.50088 | 0,3313 | 0,0117 |
| UBC 660 -6 | 550pb | 1.39828 | 0.49701 | 0,6042 | 0,0116 |
| UBC 660 -7 | 420pb | 2.90661 | 0.23379 | 0,1621 | 0,0053 |
| UBC 696 -1 | 1900pb | 10.439043 | 0.005410** | 0,0025** | 0,0012 |
| UBC 696 -2 | 1700pb | 0.876002 | 0.645325 | 0,4976 | 0,0139 |
| UBC 696 -3 | 1380pb | 0.029172 | 0.985520 | 1,0000 | 0,0000 |
| UBC 696 -4 | 1000pb | 12.912726 | 0.001570** | 0,0000** | 0,0000 |
| UBC 696 -5 | 900pb | 0.530745 | 0.766920 | 0,5520 | 0,0162 |
| UBC 696 -6 | 800pb | 1.104620 | 0.575619 | 0,6267 | 0,0095 |
| UBC 696 -7 | 600pb | 2.545997 | 0.279991 | 0,0818 | 0,0073 |
| UBC 696 -8 | 500pb | 0.844707 | 0.655502 | 1,0000 | 0,0000 |

| | | | | | |
|----------------------------------|--------|-----------|------------|----------|--------|
| UBC 785 -1 | 1250pb | 1.387907 | 0.499597 | 0,5887 | 0,0071 |
| UBC 785 -2 | 1000pb | 10.792708 | 0.004533** | 0,0001** | 0,0001 |
| UBC 785 -3 | 850pb | 3.764166 | 0.152273 | 0,0325* | 0,0041 |
| UBC 785 -4 | 680pb | 5.363816 | 0.068432 | 0,0255* | 0,0039 |
| UBC 785 -5 | 620pb | 8.671852 | 0.013090* | 0,0040** | 0,0015 |
| UBC 785 -6 | 550pb | 2.759988 | 0.251580 | 0,3697 | 0,0100 |
| UBC 785 -7 | 450pb | 9.807038 | 0.007420** | 0,0014** | 0,0009 |
| Global 34 loci: $G^2 = 289,1149$ | | | | | |
| $P\text{-value} = 0,0000$ | | | | | |

* P significativos con un α de 0.05 ** P significativos después de la corrección de Bonferroni α de 0.008.

Tabla 3: Matriz de probabilidades combinadas para cada comparación por pares.

| | Chome | Zapallar | Guayacán |
|----------|--------|----------|----------|
| Chome | | | |
| Zapallar | 0,0002 | | |
| Guayacán | 0.0000 | 0.0000 | |

Así los valores de P derivados de estos análisis revelan un grado de discontinuidad genética entre las poblaciones sur - norte analizadas de *Rhynchocinetes typus*, resultante de las diferencias significativas en las frecuencias alélicas de los once loci RAPD indicados.

Estructuración Poblacional y Flujo Génico

Los resultados muestran valores de G_{ST} y F_{ST} que indican que entre un 2 a 4,4% y 0,4 a 0,65% respectivamente de las diferencias genéticas observadas se deberían a la variación interpoblacional y el restante porcentaje de la varianza de las frecuencias alélicas se explicaría por la varianza genética intrapoblacional (Tabla 4).

Los estimados del número de migrantes por generación (Tabla 4) indican para todos los pares de combinaciones poblacionales y en forma global, valores mayores que uno. Tradicionalmente, valores de flujo génico superiores a uno pueden ser suficientes para evitar la diferenciación genética poblacional (Slatkin, 1985). Los más bajos valores de flujo génico se dan entre las áreas de Chome y Guayacán (10,92) y los más altos se dan entre las localidades de Chome y Zapallar (24,47).

Los resultados de los estadísticos genéticos tradicionales (G_{ST} , Nm), nos indican un alto grado de homogeneidad entre las poblaciones de *R. typus* analizadas, aun cuando el análisis de homogeneidad de frecuencias alélicas a través de ramdomnización (Fisher) revelan un grado de estructuración genética moderada.

Tabla 4. Valores estimados de G_{ST} , $F_{ST}(\theta)$ y Nm asociados a sus respectivas desviaciones estándar para las distintas localidades y total.

| Localidad | N | G_{ST} | $F_{ST}(\theta)$ | Nm | Desviación Estándar | P -value | |
|-------------------|-----|----------|------------------|-------|---------------------|------------|-------|
| Chome-Zapallar | 94 | 0.0200 | 0.0402 | 24.47 | 0.0026 | 0.0024 | > 0,5 |
| Chome-Guayacán | 114 | 0.0437 | 0.0648 | 10.92 | 0.0011 | 0.0014 | > 0,5 |
| Zapallar-Guayacán | 104 | 0.0325 | 0.0475 | 14.87 | 0.0010 | 0.0011 | > 0,5 |
| Total | 156 | 0.0425 | 0.0486 | 11.27 | 0.0011 | 0.0011 | > 0,5 |

$$Nm = 0.5 (1 - G_{ST}) / G_{ST}$$

Fst = Theta según Weir y Cockerman, 1984.

Boostrap = 1000

Identidad y Distancias Genéticas

Los resultados del análisis de identidad (I) y distancia genética (D) (Nei, 1972) revelan que el mayor valor de I se presenta entre las localidades Chome-Zapallar con un valor de 0.967, y consecuentemente aquí se observa el menor valor de distancia genética (D), para la misma comparación (Tabla 5).

El dendograma (Figura 9) muestra que las poblaciones analizadas están divididas en dos subgrupos distintivos: Chome-Zapallar y Guayacán. El análisis de los valores de bootstrap con 1000 iteraciones, realizado como una medida de robustez de las divisiones poblacionales observadas, indica que el par Zapallar-Chome estaría soportado por 16 loci, es decir, una de las dos poblaciones, se puede asignar a este grupo con un 47,06% de confianza. La separación de este subgrupo con Guayacán estaría soportada por 34 loci, con una robustez de asignación del 100%.

El test de Mantel (Mantel, 1967), realizado para examinar la correlación entre las distancias genéticas y distancias geográficas de las poblaciones analizadas (Figura 10) revela que existe una baja correlación entre las respectivas matrices ($r = 0,3212$; P -value = 0,2855). Esto significa que las diferencias genéticas observadas entre las poblaciones analizadas, no está asociada con la distancia geográfica que separa estas localidades (Tabla 6).

Tabla 5. Identidad (sobre diagonal) y distancia (bajo diagonal) Genética de Nei (1972) entre las localidades muestreadas de *R. typus*.

| | Chome | Zapallar | Guayacán |
|----------|--------|----------|----------|
| Chome | | 0.9669 | 0.9262 |
| Zapallar | 0.0336 | | 0.952 |
| Guayacán | 0.0766 | 0.0563 | |

Tabla 6. Matriz de distancia geográfica* en kilómetros lineales entre las localidades muestreadas de *R. typus*.

| | Chome | Zapallar | Guayacán |
|----------|---------|----------|----------|
| Chome | 0 | | |
| Zapallar | 780.273 | 0 | |
| Guayacán | 1066.24 | 286.068 | 0 |

*Distancias extraídas desde *Google Earth*.

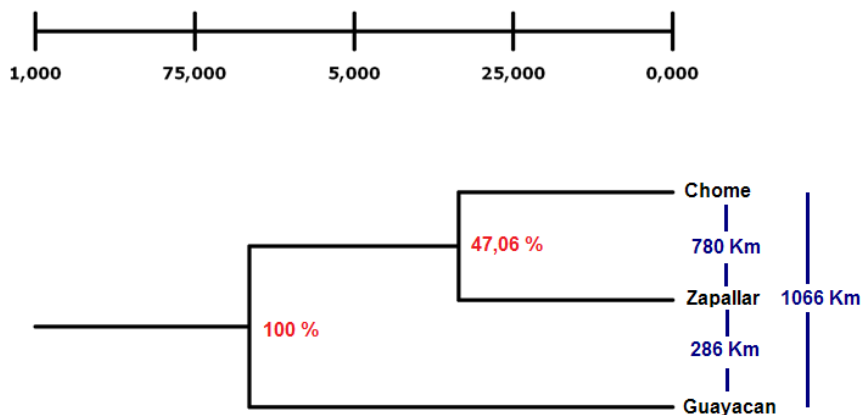


Figura 9. Dendrograma (algoritmo UPGMA) construido a partir de las distancias genéticas (Nei, 1972), entre las localidades analizadas. Al inicio de cada grupo se indica el porcentaje de repetibilidad de las ramas.

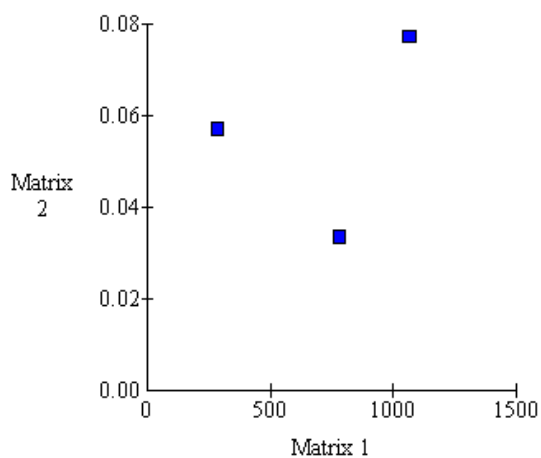


Figura 10. Representación gráfica del test de Mantel comparando las matrices de distancia genética de Nei (1972) (2) y geográfica entre las tres localidades de *R. typus* analizadas. (1)

Análisis Estadísticos de Marcadores COI

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *COI*

Con el resultado de aislamiento del ADN se aseguró un templado de buena calidad para la amplificación de secuencias del gen *COI* de las distintas poblaciones. Se obtuvieron 60 secuencias de 618 pb. (20 de cada localidad). De estas se descartaron algunas cuyos cromatogramas no presentaban total definición, quedando 19 secuencias para la localidad de Guayacán, 18 para la localidad de Zapallar y 17 para la localidad de Chome.

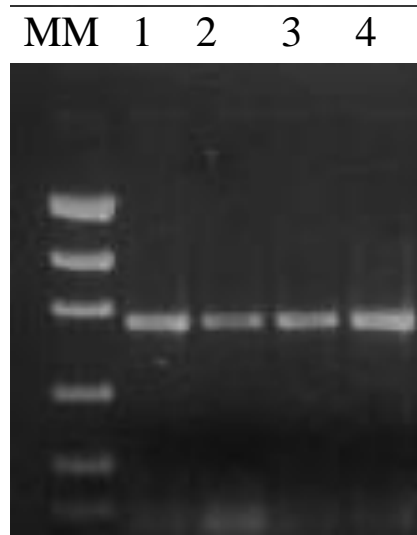


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de Producto de PCR del fragmento de *COI*. Carril M: Marcador de masa, Carril 1 – 5: Producto PCR de *R. typus*

Alineamiento y Caracterización de las secuencias

Se obtuvo una matriz de 54 secuencias de una longitud de 618 pb (Figura 12). Tras la revisión de las secuencias en el alineamiento y la comparación con los cromatogramas pudieron ser removidos los gaps presentes en las secuencias de la matriz. La traducción de las secuencias alineadas generó aminoácidos válidos para el código genético mitocondrial.

Alineamiento de las secuencias utilizadas pertenecientes a las 3 localidades.

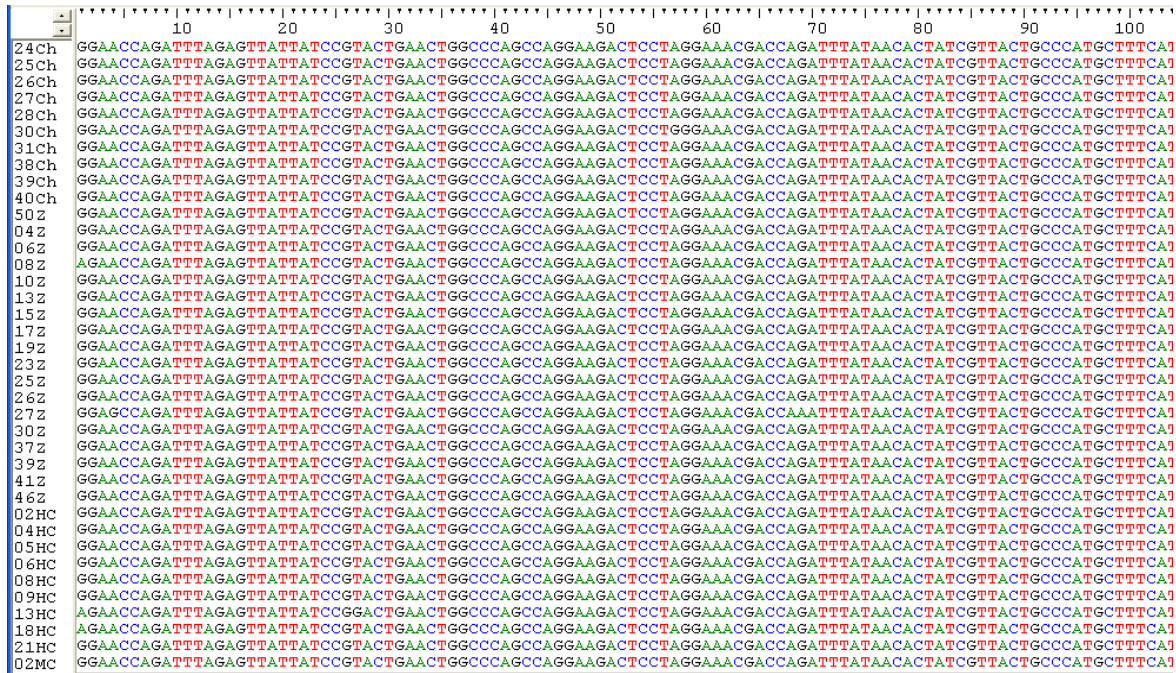


Figura 12. Porción del alineamiento múltiple de secuencias del gen *COI*. Los códigos de las secuencias de *R. typus* corresponden a las siguientes localidades Ch=Chome, Z= Zapallar y, MC y HC = Guayacán.

La frecuencia de bases fue similar entre todos los individuos de *R. typus* estudiados, observándose similitud entre las localidades. Existe mayor cantidad de AT ($\approx 60\%$) con respecto a GC ($\approx 40\%$) (Tabla 7).

Tabla 7. Caracterización y contenido de bases de las secuencias analizadas (valores promedio para cada localidad)

| | N | bases | A | C | G | T | G+C | A+T |
|----------|----|-------|-----|-----|-----|-----|--------|--------|
| Chome | 17 | 618 | 158 | 146 | 111 | 203 | 41.59% | 58.41% |
| Zapallar | 18 | 618 | 158 | 147 | 109 | 204 | 41.42% | 58.58% |
| Guayacán | 19 | 618 | 157 | 147 | 110 | 204 | 41.59% | 58.41% |

Estructuración y Diferenciación Poblacional

El estadístico F_{ST} fue utilizado para encontrar diferenciación genética entre las poblaciones (Tabla 10). Valores cercanos a uno indican una mayor diferenciación entre las poblaciones mientras que valores cercanos a 0 indican poblaciones más homogéneas. Los valores negativos mostrados en la Tabla 9 se consideran no distintos de cero

Tabla 10. Valores de F_{ST} entre las tres poblaciones de *R. typus* muestreadas estimados usando el gen *COI*.

| | Chome | Zapallar | Guayacán |
|----------|----------|----------|----------|
| Chome | 0 | | |
| Zapallar | -0.02753 | 0 | |
| Guayacán | -0.01702 | -0.02928 | 0 |

Análisis de Distancia Genética, Test de Mantel y Red de Haplotipos

Las distancias genéticas estimadas (Tabla 11) entre las localidades estudiadas son similares entre si y muy bajas, variando entre 0,00312 y 0,00334. La divergencia en promedio fue de 0,003%.

El test de Mantel (Mantel, 1967), en el caso de *COI* también revela que existe una baja correlación entre las distancia genética y geográfica ($r = 0,6660$; $P\text{-value} = 0.1771$) aunque superior a la arrojada por marcadores RAPD. Sin embargo, al igual que los RAPD este nivel de asociación no fue significativo.

Tabla 11. Distancias genéticas Nei (1972) para el marcador *COI* entre las localidades muestreadas.

| | Chome | Zapallar | Guayacán |
|----------|---------|----------|----------|
| Chome | 0 | | |
| Zapallar | 0,00334 | 0 | |
| Guayacán | 0,00323 | 0,00312 | 0 |

En el análisis basado en construcción de red de haplotipos (Figura 13) usando la aproximación Median Joining, se observa claramente la presencia de dos haplotipos dominantes (h2 y h5). Sin embargo, es clara la mayor frecuencia del haplotipo h2 en

Guayacán. Se observa una forma de estrella, patrón consistente con una probable expansión poblacional reciente (Avise, 2000).

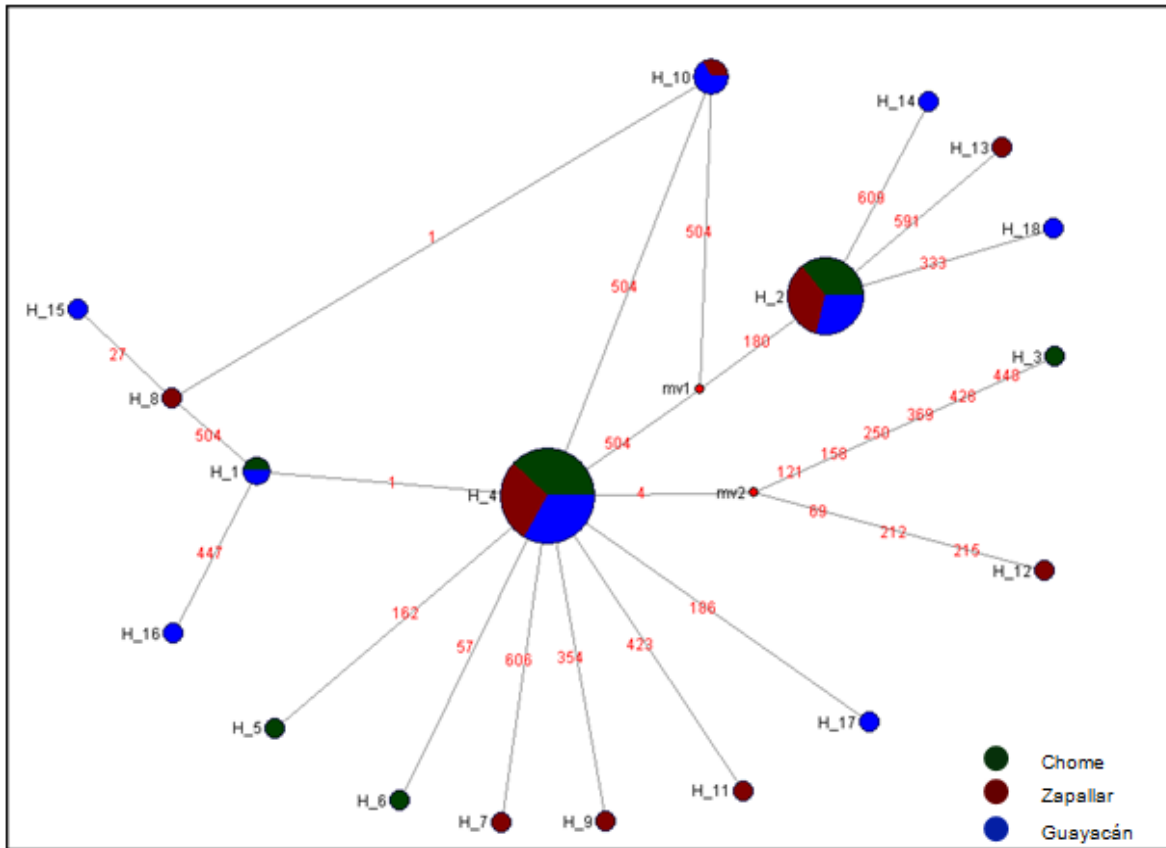


Figura 13. Red de Haplotipos de las secuencias analizadas en las tres localidades muestreada para *R. typus*.

El análisis global de los resultados obtenidos con el gen *COI* permite inferir que las localidades en estudio, no muestran diferencias genéticas entre sí.

DISCUSIÓN

Diversidad Genética

La evaluación de la diversidad genética es fundamental para la conservación y la gestión de los recursos genéticos acuáticos. La caracterización de la estructura genética de las poblaciones ayuda en la definición de las unidades biológicas y en el concepto de patrimonio genético. Estudios taxonómicos poblacionales de la especie en estudio, en el pasado han sido principalmente basados en análisis de las características morfológicas externa por lo que puede no ser indicativo de divergencia genética subyacente. Este es el primer estudio con marcadores moleculares desarrollado para caracterizar la diversidad genética de este recurso, y servirá de línea base para apoyar su cultivo al menos en la región del Bio Bio.

Los marcadores RAPD han demostrado ser eficaces e informativos al momento de evaluar la diversidad genética en muchos decápodos, en comparación con los marcadores bioquímicos usados con anterioridad, los que han demostrado ser muy conservadores. Los datos de RAPD muestran niveles de polimorfismo que son superiores a las aloenzimas. Ejemplos en otros decápodos se presentan en García *et al.* (1994), quienes reportaron una amplia variabilidad genética en las poblaciones de *Penaeus vannamei* con marcadores polimórficos que oscilaron entre 39% a 77%. En otro estudio, el porcentaje de fragmentos polimórficos dentro de una muestra geográfica de *Penaeus monodon* varió desde 46,7% hasta 61,4%. Mishra *et al.* (2009), informó porcentajes que van entre el 22,3% a 40,9% loci polimórficos en tres poblaciones de *M. dobsonii* basadas en marcadores RAPD, en el caso de *R. typus* el porcentaje de fragmentos polimórficos fue de un 100% vislumbrando a priori gran diversidad en la especie.

Para el caso de los marcadores RAPD, Liu *et al.* (1994) sugiere que seis o siete partidores son suficientes para evaluar la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones de especies altamente polimórficos. En el presente estudio, se utilizaron patrones de fragmentos de cinco partidores, que fueron los que presentaron mayor resolución en las tres poblaciones de *R. typus*.

En el caso de los resultados arrojados con el marcador mitocondrial, comparando con los resultados de estudios similares en otros artrópodos, nuestros resultados indican una diversidad genética alta de ADN_{mt}, dándonos como resultado un índice de diversidad genética total fue de 0,786. En otros estudios se encontró 8,2% de variación intraespecífica en una secuencia de 376 pb del gen *COI* en *Grammarus pulex* (Meyran *et al.*, 1997) y 0-3% se observó en un análisis de la secuencia del gen *COI* 558 bp en 13 especies de *Penaeus* (Baldwin *et al.*, 1998).

Heterogeneidad Genética

Los resultados de G_{ST} , F_{ST} $F_{ST}(\theta)$ y Nm , nos indican una baja estructuración entre las poblaciones analizadas, aun cuando el análisis de homogeneidad de frecuencias alélicas

indica que un 41,17% (14 de 34) de los loci muestra heterogeneidad a través de las generaciones.

Así, aunque una significativa heterogeneidad alélica fue observada entre las poblaciones analizadas, las estimaciones de flujo génico indican que una relativa frecuencia de migración ocurre, o ha ocurrido históricamente entre las poblaciones bajo estudio. Todos los valores de Nm están sobre uno, sugiriendo que el flujo génico es suficiente para equilibrar las frecuencias de alelos neutros en ausencia de divergencia histórica. Sin embargo, una heterogeneidad significativa entre poblaciones revela para los 34 loci indicados en una escala de tiempo evolutiva, factores estocásticos (deriva y migración), podrían haber dado algún grado de diferenciación poblacional.

El análisis de la estructura genética poblacional brindó información importante con respecto a la forma en que se encuentra distribuida la diversidad genética, a lo largo del área que ocupa *R. typus*. Por otra parte, el análisis complementario de varios marcadores con propiedades evolutivas diferentes permitió abordar de mejor forma el estudio de la naturaleza de los patrones observados. Los haplotipos únicos presentes en cada localidad serían parte de la variabilidad genética intrínseca de las poblaciones. Este punto podría ser corroborado ampliando el número de ejemplares analizados e incluyendo otros genes mitocondriales y/o tipos de marcadores moleculares.

Diferenciación Genética

Numerosos estudios indican que en muchas especies la diferenciación genética ocurre principalmente a través de distancias geográficas grandes (por ejemplo en cangrejos, McMillen-Jackson *et al.*, 1994; Lavery *et al.*, 1995; camarones o langostinos, Mattoccia *et al.*, 1987; Benzie *et al.*, 1992; Staton y Felder, 1995 y langostas, Ovenden y Brasher, 1994; Thompson *et al.*, 1996; Harding *et al.*, 1997), aunque existe diferenciación en algunas especies (por ejemplo, Siberman *et al.*, 1994; Jorstad, 1999) y previsiblemente en los que no poseen dispersión de las larvas esto no es lo usual (por ejemplo, Piertney y Carvalho, 1995). Los resultados presentados aquí para *R. typus* no son la excepción, presentando muy baja diferenciación genética entre las poblaciones, tanto al estudiar marcadores nucleares ($0,02 \leq G_{ST} \leq 0,044$) como el gen mitocondrial de la citocromo Oxidasa I ($G_{ST} \approx 0$). Esta poca diferenciación también se ve corroborada por las bajas distancia genéticas obtenidas por ambos marcadores (Tablas 4 y 10), y la falta de correlación significativa entre la distancia genéticas y geográficas, evidenciadas por el test de mantel (RAPD $r = 0.3212$ y $COI r = 0.6660$)

La mayoría de las especies al parecer muestran una baja diferenciación en el ámbito local (Benzie *et al.*, 1992; De Matthaeis *et al.*, 1995; Lavery *et al.*, 1995), pero en presencia de barreras oceanográficas o de otro tipo a la dispersión de larvas, pueden interrumpir el flujo de genes (Staton y Felder, 1995). Algunas de las especies de crustáceos que muestran flujo génico a pesar de la distancia, son por ejemplo, especies encontradas entre varias islas del Pacífico (Lavery *et al.*, 1996), entre Australia y Nueva Zelanda (Booth *et al.*, 1990) y entre Grecia y España (Mattoccia *et al.*, 1987). En la distribución geográfica de la localidades estudiadas no hay descritas barreras biogeográficas, y los niveles de flujo génico

observados son muy superiores a uno ($11 \leq Nm \leq 24,5$) corroborando la ausencia de barreras oceanográficas.

Los resultados basados en valores de F_{ST} y la aproximación de red de haplotipos y frecuencias haplotípicas por localidad, son consistentes al señalar que ninguna de las localidades analizadas constituiría un grupo genéticamente distinto.

Al realizar un análisis comparativo entre localidades (Tabla 10) observamos la existencia de valores negativos de F_{ST} , este resultado indicaría que no existe diferenciación entre las poblaciones y por lo tanto el 100% de las diferencias genéticas detectadas son dentro de las poblaciones.

Para lo anteriormente expuesto, podemos decir que Wright (1965) afirmó que F_{ST} es "la razón de la variación real de las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones con la máxima variación posible en un completo aislamiento de las subpoblaciones". Nei (1977) formuló F_{ST} basado en esto y por ello resulta positivo. Pero Cockerham (1969) y Weir y Cockerham (1984) observó que F_{ST} puede ser negativo cuando hay más variación en las frecuencias alélicas dentro de las subpoblaciones que entre las subpoblaciones. Esto concuerda con Wright (1951) quien definió F_{ST} originalmente como la correlación entre los gametos al azar dentro de un subgrupo. Trabajos posteriores (Nei 1967; Weir y Cockerham 1984) mantienen este enfoque, por lo que a menudo se asume que las desviaciones de apareamiento al azar causa F_{ST} alejados de cero. En la práctica, F_{ST} pueden tomar valores grandes por una variedad de razones, por ejemplo: la acción de la selección sobre los heterocigotos, la selección de las subpoblaciones. Por otra parte, la resolución inconsistente de un marcador en diferentes muestras puede aumentar la heterogeneidad y por lo tanto sobreestimar F_{ST} . (Black, 1985). En definitiva, una amplia gama de efectos biológicos y técnicos pueden generar positivos y negativos de F_{ST} .

En el caso de los estadísticos F de Wright calculado por el análisis ponderado del método de varianza sobre todos los alelos (Weir y Cockerham, 1984) y utilizado como una medida de la diferenciación debido a la deriva génica y a la consanguinidad en poblaciones pequeñas, revela que existe una baja diferenciación entre todas las poblaciones analizadas de *R. typus*, y con un alto flujo génico promedio de 11.27 ($Nm = 11.3$), lo cual es suficiente para que las frecuencias de alelos neutros no divergieran marcadamente entre las poblaciones de *R. typus* (Slatkin, 1985; Crow y Kimura, 1970).

Como posible explicación de los resultados, destacando la baja diferenciación genética poblacional entre las distintas localidades, podemos decir que los crustáceos decápodos como *R. typus* presentan ciclos vitales complejos, que comprenden en general fases larvarias planctónicas y fases postlarvarias bentónicas, lo que determina que su distribución espacial y dinámica de poblaciones se encuentre en estrecha relación tanto con procesos de dispersión larvaria, mediados por factores físicos, como de selección de hábitat ligados a los patrones de movimientos y migraciones en estadíos postlarvarios (Corgos, 2004).

SUGERENCIAS

Dado lo anterior, la colecta de reproductores de la especie o de especímenes para engorda en el caso de que se quiera industrializar la pesquería de esta especie, se debe hacer en forma de no presionar alguna de las localidades más que otra, para evitar la pérdida de la conformación actual de distribución, y así evitar un quiebre o barrera en la dispersión larvaria, provocando una disminución de la diversidad genética existente.

Este estudio es una primera aproximación del conocimiento a nivel genético de esta especie y su estructura poblacional. Sin embargo, dado que solo se han muestreado tres poblaciones de la muy amplia distribución de la especie (sur del Perú hasta Talcahuano) y sin tener muestras de la distribución más al norte, se puede decir que los resultados aquí presentados podrían llevar a la toma de decisiones incorrectas de manejo y conservación de la especie. Sería interesante poder completar la información incluyendo más localidades en el estudio, análisis de marcadores codominantes a nivel de ADN nuclear como microsatélites, que presentan una alta variabilidad poblacional, además de incluir análisis ecológicos y biológicos de la especie. Adicionalmente, las secuencias *COI* podrán ser usadas para el registro de la especie según protocolos de Gen Bank y de Barcoding.

CONCLUSIONES

- Los índices de diferenciación dan cuenta de la existencia de una sola gran población y por lo tanto, no estaríamos en presencia de poblaciones de *R. typos* estructuradas genéticamente. Permitiendo aceptar la hipótesis.
- La diversidad genética para ambos marcadores fue alta. Además hay evidencias de una expansión poblacional geográfica reciente.
- Las distancias genéticas observadas entre las poblaciones analizadas no están asociadas con la distancia geográfica que separa estas localidades.

BIBLIOGRAFÍA

- Appeltans, W.P., Bouchet, G.A., Boxshall, K., Fauchald, D.P. Gordon, B.W., Hoeksema, Poore, G.C.B., van Soest R.W.M., Stöhr, S., Walter, T.C. & M.J. Costello. (Eds). 2011. Registro mundial de especies marinas. Acceso en <http://www.marinespecies.org>
- Araneda, C. 2003. Variación fenotípica, genética y molecular asociada a la pigmentación de la carne en salmon Coho (*Oncorhynchus kisutch*). Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Universidad de Chile. Chile. 91 pp.
- Araneda, C., Neira, R. & P. Iturra. 2005. Identification of a dominant SCAR marker associated with colour traits in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 247: 67-73.
- Arias-Rodríguez, L. 2001. Inactivación genética de esperma e inducción de ginogénesis y de triploidía en el botete diana *Sphoeroides annulatus* (Jenyns, 1842). Tesis de Maestría, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Mazatlán, Sinaloa, México. 202 pp.
- Avice, J.C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press.
- Baldwin, J.D., Bass, A.L., Bowen, B.W., & Clark, W.C. 1998. Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 10:399–407.
- Bandelt, H-J, Forster P. & A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16:37-48.
- Benzie, J.A.H., Frusher, S. & E. Bailment. 1992. Geographical variation in allozyme frequency in populations of *Penaeus monodon* (Crustacea: Decapoda). *Aust. J. mar. Freshwat. Res.*43: 715–725.
- Black, W.C. IV & E.S. Krafur. 1985. A fortran program for analysis of genotypic frequencies and description of the breeding structure of populations *Theor Appl Genet* (1985) 70:484-490.
- Booth, J.D., Street, R.J. & P.J. Smith. 1990. Systematic status of the rock lobsters *Jasus edwardsii* from New Zealand and *J. novaehollandiae* from Australia. *New Zealand J. Mar. Freshwat. Res.* 24: 239–249.
- Booth, J.D. & D.M. Brosnan. 1995. The role of recruitment dynamics in rocky shore and coral reef fish communities. *Adv. Ecol. Res.* 26: 309-385.
- Boto, L. 2010. Uso de técnicas de biología molecular en las ciencias naturales. En Línea: http://www.sebbm.es/ES/divulgacion-ciencia-para-todos_10/uso-de-tecnicas-de-biologia-molecular-en-las-ciencias-naturales_403.

- Botsford, L.W., Moloney, C.L., Hastings, A., Largier J.L., Powell, T.M., Higgins, K. & J.F. Quinn. 1994. The influence of spatially and temporally oceanographic conditions on meroplanktonic metapopulations. *Deep Sea Research*. 41: 107-145.
- Botsford, L. 1995. Population dynamics of spatially distributed, meroplanktonic, exploited marine invertebrates. *ICES mar. Sci. Symp.* 199: 118-128.
- Botsford, L.W., Moloney, C.L., Largier, J.L. & A. Hastings. 1998. Metapopulation dynamics of meroplanktonic invertebrates: the Dungeness crab (*Cancer magister*) as an example. *North Pacific Symposium on invertebrate stock assessment and management*.
- Botsford, L.W. 2001. Physical influences on recruitment to California current invertebrate populations on multiple scales. *ICES Journal of Marine Science*. 58(5): 1081-1091.
- Botsford, L.W., Hastings A. & S. Gaines. 2001. Dependence on the configuration of marine reserves and larval dispersal distance. *Ecology Letters*. 4(2): 144-150.
- Brey, T & J.D. Gage. 1997. Interactions of growth and mortality in benthic invertebrate populations: empirical evidence for mortality growth continuum. *Archives of Fisheries Marine Research*. 45 (1): 45 – 59.
- Brown, W.M., George, M. & A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Science*. 76: 1967-71.
- Brown, W.M., Prager, E.M. Wang, A. & A.C. Wilson. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *J. Mol. Evol.* 18: 225-39.
- Caley, M.J., Carr, M.H., Hixon, M.A., Hughes, T.P., Jones, G.P. & B.A. Menge. 1996. Recruitment and the local dynamics of open marine populations. *Annual Review of Ecology and Systematic*. 27: 477-500.
- Cockerham, C.C. 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution*. 23:72-4.
- Corgos, A. 2004. Estrategia vital, estructura espacial y dinámica poblacional de la centolla, *Maja squinado* (Decapoda: Majidae). Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología. Universidade da Coruña: Tesis Doctoral. 312.
- Correa, C. & M. Thiel. 2003. Population Structure and Operational Sex Ratio in the Rock Shrimp *Rhynchocinetes typus* (Decapoda: Caridea). *J. Crust. Biol.* 23(4): 849–861.
- Cowen, R.K., Lwiza, K.M.M., Sponaugle, S., Paris, C.B. & D.B. Olson. 2000. Connectivity of marine populations. Open or closed? *Science*. 287 (5454): 857-859.
- Crow, J & M. Kimura. 1970. *An Introduction to population genetics theory*. New York. Harper & Row.

- De Matthaeis, E., Cobolli, M., Mattocia, M. & F. Scapini, 1995. Geographic variation in *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda). Biochemical evidence. Ital. J.Zool. 62(1): 77-84
- Dupré, E. & C. Barros. 1983. Fine structure of the mature spermatozoon of *Rhynchocinetes typus*, Crustacea, Decapoda. Gamete Research. 7: 1-18.
- Dupré, E. 1981. Informe Final Proyecto *Rhynchocinetes typus*. Escuela de Ciencias del Mar, U. Católica de Valparaíso. 12pp.
- Dupré, E., Bellolio, G. & K. Lorchmann. 1992. Desarrollo embrionario de camarón de roca (*Rhynchocinetes typus*, Milne Edwards 1837), en condiciones de laboratorio. Revista Chilena de Historia Natural, 65:435-442.
- Dupré, E., Flores, L. & S. Palma. 2008. Desarrollo larval del camarón de roca *Rhynchocinetes typus* Milne Edwards, 1937 (Decapoda, Caridea) cultivados en laboratorio. Revista Chilena de Historia Natural. Vol.81, n.2, pp.
- Eckert, G.L. 2003. Effects of the planktonic period on marine population fluctuations. Ecology. 84: 372-383.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. 131(2): 479 - 491.
- Excoffier, L., Laval, G & S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1: 47-50.
- FAO. 2010. El estado Mundial de la Pesca y Acuicultura.
- FAO. 2012. El estado Mundial de la Pesca y Acuicultura.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3: 294-299.
- Fontdevila, A. & A. Moya. 1999. Introducción a la Genética de Poblaciones. Ed. Sinteis S.A. Madrid, 349pp.
- Frankham, R. Ballou, J.D. & D.A. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Freire, J. 2007. Metapoblaciones en ecosistemas costeros. Los desafíos del marisqueo a la gestión pesquera. XI Congreso Nacional de Acuicultura. 24-28 Septiembre. Vigo-España.
- Fujino, K. 1981. Impact of genetic factors on aquaculture and stock management. Pp. 421-448. En: M. Biblio, H. Rosenthal & C.J. Sinderman (eds.). Proceedings of the World Conference on Aquaculture, Venice, Italy. European Aquaculture Society, Belgium.

- Gaines, S.D. & K.D. Lafferty. 1995. Modeling the dynamics of marine species: the importance of incorporating larval dispersal. En *Ecology of Marine Invertebrate Larvae*. L. McEdward (Ed.). Boca Raton, CRC Press: 464pp.
- García, F. 2010. Proyecto Diversidad Genética. En Línea: <http://www.cibnor.mx/es/investigacion/planeacion-ambiental-y-conservacion/lineas-y-proyectos-de-investigacion/proyectos-linea-iv/425-proyecto-diversidad-genetica>.
- García, D.K, Faggart, M.A., Rhoades, L., Wyban, J.A., Carr, W.H., Sweeney, J.N., Ebert, K.M. & A.A. Alcivar-Warren. 1994. Genetic diversity of cultured *Penaeus vannamei* shrimp using three molecular genetic techniques. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 270-280.
- García, G.F., Rojas, M.A., Petriz, E.E. & H.F. Hernández. 1999. *Dactylopius coccus* y *Dactylopius sp.*: detección de polimorfismos en el ADN usando RAPD-PCR y comparación entre especies. *Imaggen* (número especial dedicado a la investigación), Universidad Simón Bolívar. 48, 16-22.
- Godoy, J.A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18 (1): 23-33. En Línea: HYPERLINK "<http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?id=593>"<http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?id=593>.
- Grantham, B.A, Eckert, G.L. & L. Shanks. 2003. Dispersal potencial of marine invertebrates in diverse habitats. *Ecological Applications* 13(1), Supplement, S108-S116
- Grijalva-Chon, J.M., De la Rosa-Velez J. & O. Sosa-Nishizaki. 1996. Allozyme variability in two samples of swordfish, *Xiphias gladius* L., in the North Pacific Ocean. *Fishery Bulletin U. S.* 94:589 - 594.
- Grimm, V., Reise K. & M. Strasser. 2003. Marine metapopulations: a useful concept? *Helgoland Marine Research.* 56: 222-228.
- Guo S.W. & E.A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple allele. *Biometrics.* 48: 361-372.
- Hall T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hanski, I. 1998. Metapopulation dynamics. *Nature.* 396: 41-49.
- Hanski, I. & D. Simberloff. 1997. The metapopulation approach, its history, conceptual domain, and application to conservation. En *Metapopulation biology: Ecology, Genetics and Evolution*. Hanski I. & M.E. Gilpin (Ed.). London, Academic Press: 5-26.
- Harding, G.C., Kenchington, E.L., Bird, C.J., Pezzack, D.S & D.C. Landry, 1997. Genetic relationships among subpopulations of the American lobster (*Homarus americanus*) as revealed by random amplified polymorphic DNA. *Can. J. Fish. aquat. Sci.* 54: 1762-1771.

- Harrison, S. & A.D. Taylor. 1997. Empirical evidence for metapopulation dynamics. En *Metapopulation biology: Ecology, Genetics and Evolution*. Hanski I. & M.E. Gilpin (Ed.). London, Academic Press: 27-39.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & J.R. de Waard. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 270:313–321.
- . El crecimiento de la edad de los modelos de tilapia *Oreochromis aureus* (Perciformes, Cichlidae) de la presa El Infiernillo, México y el comportamiento reproductivo. *Rev. Biol. Trop.* 54:. En prensa
- Jiménez-Badillo, L. 2006. Age-growth models for tilapia *Oreochromis aureus* (Perciformes, Cichlidae) of the Infiernillo reservoir, Mexico and reproductive behaviour. *Rev. biol. trop* [online]. vol.54, n.2
- Jorstad, K. 1999. Population genetic structure of lobster (*Homarus gammarus*) in Norway, and implications for enhancement and sea-ranching operation. *Aquaculture*. 173: 447.
- Knutsen, H, Jorde, P.E, André, C. & N.R. Stenseth. 2003. Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. *Molecular Ecology*. 12: 385-394.
- Lavery, S. & C.P. Keenan. 1995. Genetic analyses of crustacean stock structure and stock size. In "Proceedings of the Workshop on Spawning Stock-Recruitment Relationships (SRRs) in Australian Crustacean Fisheries". (Eds A.J. Courtney and M.G. Cosgrove) pp. 116-21. QDPI Conference and Workshop Series. Brisbane, Australia.
- Lavery, S., Moritz, C. & D.R. Fielder, 1996. Indo-Pacific population structure and evolutionary history of the coconut crab *Birgus latro*. *Mol. Ecol.* 5: 557–570.
- Levins, R. 1969. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of Entomological Society of America*. 15: 237-240.
- Levins, R. 1970. Extinction. In some mathematical problems in biology. *Lecture Notes on Mathematics in the Life Sciences No. 2*. M. Gesternhaber (Ed.). Providence, American Mathematical Society: 75-107.
- Lynch, M. & B.G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*. 3: 91-99.
- Liu, Z.W., Jarret, R.L., Duncan, R.R. & S. Kresovich. 1994. Genetic relationships and variation of ecotypes of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum*) determined by random amplified polymorphic DNA markers. *Genome*. 37: 1011-1017.
- Luppi, T.A., Spivak, E.D., Anger K. & J.L. Valero. 2002. Patterns and processes of *Chastamagnathus granulata* and *Cryptograpsus angulatus* (Brachyura: Grapsidae)

- recruitment in Mar Chiquita coastal lagoon, Argentina. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 55: 287-297.
- McMillen-Jackson, A.L., Bert, T.M. & P. Steele. 1994. Population genetics of the blue crab *Callinectes sapidus*: modest population structuring in a background of high gene flow. *Mar. Biol.* 118:53–65.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.
- Martínez, G. & P. Arana. 1983. Crecimiento del camarón de roca (*Rhynchocinetes typus*, Milne Edwards 1837) en la zona de Valparaíso (Chile). *Ciencia y Tecnología de Mar*. CONA 7:85-107.
- Martínez, G., Pizarro, L. & E. Yañez. 1988. El camarón de roca (*Rhynchocinetes typus*, Milne Edwards 1837) en la zona de Valparaíso – Chile: Un análisis del rendimiento por recluta. *Investigaciones Marinas*. 16:41-48.
- Martínez, P. 2005. Aplicaciones de la genética para la mejora en acuicultura. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*. 21 (1-4). 2005: 225-238.
- Mattoccia, M., G. La Rosa, E. De Mathaeis, Cobolli-Sbordoni, M. & V. Sbordoni. 1987. Patterns of genetic variation and differentiation in Mediterranean populations of *Penaeus kerathurus* (Crustacea: Decapoda). In, Tiews, K. (ed.), *Selection, Hybridisation and Genetic Engineering in Aquaculture*. ICES, Copenhagen: 131–142.
- Meyran, J.C. Monnerot, M. & P. Taberlet. 1997. Taxonomic status and phylogenetic relationships of some species of the genus *Gammarus* (Amphipoda) from *ADNmt* sequences. *Mol Phyl Evol.* 8: 1–10.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) version 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Department of Biological Sciences–Box 5640, Northern Arizona University, Flagstaff, AZ 86011-5640, USA.
- Mishra, P., Chaudhari, A., Krishna, G., Kumar, D. & W. Lakra. 2009. Genetic Diversity in *Metapenaeus dobsoni* using RAPD Analysis. *Biochemical Genetics*. 47 (5-): 421-426.
- Nei, M. 1967. Modification of linkage intensity by natural selection. *Genetics*. 57:625-626.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106:283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41: 225-233.

- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89:583-590.
- Oines, O. & P.A. Heuch. 2005. Identification of sea louse species of genus *Caligus* using *ADNmt*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 85: 73 – 79.
- Orensanz, J.M., Parma, A.M., Jerez, G., Barahona, N., Montecinos, M. & I. Elias. 2005. What are the key elements for the sustainability of "S-Fisheries"? Insights South America. *Bulletin of Marine Science*. 76: 527-556.
- Ovenden, J.R. 1990. Mitochondrial DNA and marine stock assessment: a review. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*. 41:835-853.
- Ovenden, J.R. & D.J. Brasher, 1994. Stock identity of the red (*Jasus edwardsii*) and green (*J. verreauxi*) rock lobsters inferred from mitochondrial DNA analysis. In Philips, B. F., J. S. Cobb & J. Kittaka (eds), *Spiny Lobster Management*. Blackwell, London: 230–249.
- Pérez-Sánchez, E., Muir, J.F. & L.G. Ross. 2005. Opciones de vida para la zona costera de Tabasco, México. *Acuáticos Resourc. Culto. Desarrollar*. 1:91-108.
- Piertney, S.B. & G.R. Carvalho. 1995. Microgeographical genetic differentiation in the intertidal isopod *Jaera albifrons*. 2. Temporal variation in allele frequencies. *J. exp. mar. Biol. Ecol*. 188:277–288.
- Planes, S, Romans, P. & R. Lecomte-Finiger. 1998. Genetic evidence of closed life-cycles for some coral reef fishes within Taiaro Lagoon (Tuamotu Archipelago, French Polynesia). *Coral Reefs*. 17: 9-14.
- Raymond M & F Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*. 49: 1280-1283.
- Robainas, A. 2004. Genética poblacional del camarón rosado *Farfantepenaeus notialis* (Decápoda, Penaeidae): variación espacio temporal de la diversidad y la estructura genética. Centro de Investigaciones Marinas Universidad de La Habana. Tesis Doctoral.
- Rubinoff, D. 2006. Utility of mitochondrial DNA barcodes in species conservation. *Conservation Biology*. 20: 1026–1033.
- Ruzzante, D.E., Taggart, C.T., Doyle, R.W. & 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.
- San Feliú, J.M. 1987. La acuicultura marina en la comunidad valenciana. Publicaciones del excelentísimo Ayuntamiento de Castellón de la Plana.
- Secretaría del convenio sobre la diversidad biológica, perspectiva mundial sobre la diversidad biológica 3 – Resumen Ejecutivo. Montreal, 2010. 16 pp.
- SERNAPESCA. 2011. Estadísticas de captura Nacional.

- Shaw, P.W, Turan, C, Wright, J.M, O'Connell, M. & G.R. Carvalho. 1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparison to allozyme and *ADNmt* RFLP analyses. *Heredity*. 83: 490–499.
- Siberman, J., Shaver, S. & P. Walsh. 1994. Mitochondrial DNA variation in seasonal cohorts of spiny lobster (*Panulirus argus*) post larvae. *Mol.mar.Biol.Biotechnol.* 3:165-170.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 16: 393-430.
- Slatkin, M. & N.H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating the average level of gene flow. *Evolution*. 43: 1349-1368.
- Smedbol, R.K., McPherson, A., Hansen, M.M. & E. Kenchington. 2002. Myths and moderation in marine 'metapopulations'? *Fish and Fisheries*. 3: 20-35.
- Smith, P.J. 1996. La diversidad genética de los recursos pesqueros marinos: posibles repercusiones de la pesca. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 344. Roma, FAO. 59p.
- Sokal, R. & J. Rohlf. 2001. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research* (tercera edición). Nueva York: W. H. Freeman and Company.
- Sponaugle, S., Cowen, R, Shanks, A., Morgan, S., Leis, J., Pineda, J., Boehlert, G., Kingsford, M., Lindeman, K., Grimes, C. & J. Munro. 2002. Predicting self-recruitment in marine populations: biophysical correlates and mechanisms. *Bulleting of Marine Science*. 70(1): 341-375.
- Staton, J.L. & D.L. Felder, 1995. Genetic variation in populations of the ghost shrimp genus *Callichirus* (Crustacea, Decapoda, Thalassinoida) in the Western Atlantic and Gulf of Mexico. *Bulleting of Marine Science*. 56: 523–536.
- Taggart, J., Hynes, R., Prodohl, P. & A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonids fishes. *J. Fish Biology*. 40: 963-965.
- Taylor, M.S. & M.E. Hellberg. 2003. Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science*. 299: 107-109.
- Thompson, A.P., Hanley, J.R. & M. Johnson. 1996. Genetic-structure of the western rock lobster *Panulirus cygnus*, with the benefit of hindsight. *Aust. J. mar. freshwat.* 47: 889-896.
- Tingey, V.S. & J.I. Del Tufo. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol.* 101: 349-352.
- Toro, J.E., Ojeda, J.A. & A.M. Vergara. 2004. The genetic structure the *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) populations along the Chilean coast based on RAPDs analysis. *Aquaculture Research*. 35: 1466-1471.

- Torres, A. 1983. Diferencias Morfológicas en machos de *Rhynchocinetes tipus*, Milne Edwards, 1937 (Crustacea, Decapoda, Rhynchocinetidae). *Inv. Marinas Valp.* 11: 3-17.
- Trigiano, R.N. & G. Caetano-Anolles. 1998. Laboratory exercises on DNA amplification fingerprinting for evaluating the molecular diversity of horticultural species. *Hor Technology.* 8(3): 413-423.
- Vásquez, J.A. & J.C. Castilla. 1982. Áreas de reclutamiento y estructura poblacional de *Rhynchocinetes typus* H. Milne Edwards 1837 (Crustacea Rhynchocinetidae) en Chile central. *Investigaciones Marinas.* 10:1-14.
- Vences, M., Thomas, M., Meijden, A.V.D., Chiari, Y. & D.R. Vieites. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology.* 2: 5.
- Vietes, D., Chiari, Y., Vences, M., Andreone, F., Rabemananjara, F., Bora, P., Nieto-Román, S. & A. Meyer. 2006. Mitochondrial evidence for distinct phylogeographic units in the endangered malagasy poison frog *Mantella bernhardi*. *Molecular Ecology.* 15: 1617-1625.
- Von Brand-Skopnik E. & A.M. Ibarra-Humphries. 2001. Genética de pectínidos iberoamericanos. Pp. 105-126 En: A. N. Maeda-Martinez (ed). *Los moluscos pectínidos de iberoamérica: Ciencia y Acuicultura.* Editorial Limusa, México.
- Weir, B.S. & C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38: 1358-1370.
- Williams, J., Kublik, A., Livak, K., Rafalski, J. & S. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Research.* 18: 6531-6535.
- Williams, J., Rafalski, J.A. & S.V. Tingey. 1992. Genetic analysis using RAPD markers. *Methods in Enzymology.* 218: 704-740.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 323-354.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution.* 19: 395-420.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations.* University of Chicago Press, Chicago. vol.4. 580 p. ISBN 0226910415.
- Yeh, F.C., Rong-Cai Y. & T. Boyle. 1999. POPGENE v1.31. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Edmonton, Alberta, Canada.

ANEXOS

Anexo I. Antecedentes adicionales de la especie

Estatus taxonómico de camarón de roca Extraído de Appeltans *et al.*, 2011

Reino: Animalia
 Phylum: Arthropoda
 Subphylum: Crustacea
 Clase: Malacostraca
 Subclase: Eumalacostraca
 Superorden: Eucaridea
 Orden: Decapoda
 Suborden: Pleocyemata
 Infraorden: Caridea
 Superfamilia: Nematocarcinoidea
 Familia: Rhynchocinetidae
 Género: Rhynchocinetes
 Especie: *Rhynchocinetes typus* H.Milne Edwards, 1837b

Otras especies

Rhynchocinetes albatrossae Chace, 1997
Rhynchocinetes australis Hale, 1941
Rhynchocinetes balssi Gordon, 1936
Rhynchocinetes brucei Okuno, 1994b
Rhynchocinetes conspiciocellus Okuno & Takeda, 1992
Rhynchocinetes durbanensis Gordon, 1936
Rhynchocinetes enigma Okuno, 1997b
Rhynchocinetes holthuisi Okuno, 1997c
Rhynchocinetes ikatere Yaldwyn, 1971
Rhynchocinetes kuiteri Tiefenbacher, 1983
Rhynchocinetes rathbunae Okuno, 1996b
Rhynchocinetes serratus (H.Milne Edwards, 1837 [in Milne Edwards, 1834-1840])
Rhynchocinetes uritai Kubo, 1942b
Rhynchocinetes hiatti Holthuis & Hayashi, 1967 accepted as *Cinetorhynchus hiatti* (Holthuis & Hayashi, 1967)
Rhynchocinetes rigens Gordon, 1936 accepted as *Cinetorhynchus rigens* (Gordon, 1936)

Anexo II. Protocolo Extracción de ADN (Modificado de Taggart *et al.*, 1992).

Materiales requeridos.

1. Solución 1 (50 mM Tris HCl pH 8.0; 100 mM EDTA pH 8.0; 100 mM NaCl; 1% SDS)
2. Proteinasa K 20 mg / ml
3. RNAsa (libre de DNAsa) 20 mg / ml
4. Fenol equilibrado pH 8.0
5. Cloroformo
6. Etanol 92%
7. Etanol 70%
8. Buffer TE (1/4 TE; 3/4 Agua PCR)
9. Tubos Eppendorff con tapa estériles
10. Puntas de micropipetas estériles
11. Incubador a 55° C y 37° C

1. Agregar a cada tubo Eppendorff 375 µl de la Solución 1 y 10 µl de Proteinasa K
2. Agregar tejido a cada tubo (70 mg músculo), secar con papel absorbente el exceso de Etanol en el tejido. Agitar vigorosamente e incubar durante la noche, con movimiento, a una temperatura de 55° C.
3. Agregar 10 µl de RNAsa a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos e incubar por 60 minutos a una temperatura de 37° C.
4. Agregar 400 µl de Fenol a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos y luego agitarla por 20 minutos.
5. Agregar 400 µl de Cloroformo a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos y luego agitarla por 20 minutos.
6. Centrifugar los tubos a 10.000 rpm durante 5 minutos
7. Cuidadosamente remover 300 µl de la fase acuosa superior (usando una punta de micropiteta de boca ancha) a un tubo Eppendorff nuevo.
8. Agregar 900 µl de Etanol 92%. Mezclar mediante vigorosa inversión de los tubos (6 veces). El ADN debiera precipitar. Dejarlo reposar durante 3 minutos. Extraer el Etanol.

Anexo II. Continuación

9. Agregar 1000 μ l de Etanol 70%. Agitarlo suavemente por 30 minutos (preferiblemente durante la noche a temperatura ambiente). Cuidadosamente extraer el Etanol.
10. Permitir que el ADN se seque parcialmente a temperatura ambiente (5 minutos), Resuspender el pellet en agua de PCR. Permitir que el ADN se disuelva a temperatura ambiente por dos días. Luego congelar el ADN a -70° C.

Anexo III. Condiciones Finales de Amplificación
IIIa.- RAPD

| Vol. Reacción | 10 | μ l | x 1 |
|--------------------|-----------|---------|-------|
| [] Inicial | [] Final | | Vol. |
| Agua | | | 0,40 |
| Partidor 1 μ M | 0,46 | μ M | 4,60 |
| dNTP 2,5mM | 0,2 | mM | 0,80 |
| MgCl 25mM | 2,5 | mM | 1,00 |
| Buffer II (X10) | 1 | X | 1,00 |
| Taq (5U / μ l) | 1 | U | 0,20 |
| ADN 6ng/ μ l | 12 | ng | 2,00 |
| Total | | | 10,00 |

III b.- Gen *COI*

| Vol. Reacción | 10 | μ l | x 1 |
|--------------------|-----------|---------|-------|
| [] Inicial | [] Final | | Vol. |
| Agua | | | 0,36 |
| Forward 10 μ M | 0,4 | μ M | 0,40 |
| Reverse 10 μ M | 0,4 | μ M | 0,40 |
| dNTP 2,5mM | 0,2 | mM | 0,80 |
| MgCl 25mM | 2 | mM | 0,80 |
| Buffer II (X10) | 1 | X | 1,00 |
| Taq (5U / μ l) | 0,4 | U | 0,24 |
| ADN 6ng/ μ l | 36 | ng | 6,00 |
| Total | | | 10,00 |

Anexo IV. Ciclo de Amplificación**IV a.- RAPD**

| | | |
|------------------|-----------|----------------------|
| 94 °C ----- 3' | | Denaturación Inicial |
| 42 °C ----- 3' | 1 Ciclo | |
| 72 °C ----- 3' | | |
| 94 °C ----- 30'' | | Denaturación |
| 42 °C ----- 1' | 35 Ciclos | Hibridación |
| 72 °C ----- 2' | | Extensión |
| 94 °C ----- 30'' | | |
| 36 °C ----- 1' | 1 Ciclo | |
| 72 °C ----- 10' | | Extensión Final |

IV b.- COI

| | | |
|------------------|-----------|----------------------|
| 94 °C ----- 2' | | Denaturación Inicial |
| 45 °C ----- 30'' | 1 Ciclo | |
| 72 °C ----- 1' | | |
| 94 °C ----- 20'' | | Denaturación |
| 45 °C ----- 30'' | 34 Ciclos | Hibridación |
| 72 °C ----- 1' | | Extensión |
| 94 °C ----- 30'' | | |
| 45 °C ----- 30' | 1 Ciclo | |
| 72 °C ----- 12' | | Extensión Final |

Anexo V. Matrices de Datos RAPD Para Software TFPGA (Miller, 1997)

Primera columna indica la población (1 = Chome; 2 = Zapallar; 3 = Guayacán)

1, 2,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,2,1,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,2,1
1, 2,1,1,1,1,2,1,2,2,2,1,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,2,1,1
1, 2,1,1,1,1,1,2,2,2,1
1, 2,1,1,1,2,2,2,2,1,2,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,2,2,1
1, 0,0,0,0,0,2,2,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,2,1,2,1,2,2,1,2,1,1,1,2,1,1
1, 2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1
1, 2,1,1,2,1,1,1,2,2,2,1,1,1,2,1,2,1,1,1,2,1,1,2,1,2,2,1,1,1,2,1,1,1
1, 1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1
1, 0,0,0,0,0,1,2,1,2,1,1,2,1,1,1,2,2,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,2,1,1,2
1, 0,0,0,0,0,1,2,1,2,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,2,1,2,2,1,1,2,1,1,2,1,1,1
1, 2,1,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1
1, 2,1,1,2,1,1,1,2,2,2,1,1,2,2,2,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,1,2,1,1,2,2,1
1, 1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1
1, 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,2,2,2,1,2,2,1,1,2,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1
1, 1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0
1, 2,1,2,1,1,2,0,0,0,0,0,1,1,2,1,2,2,1,2,2,2,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,1
1, 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,2,1,1,1,1,1
1, 2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,2,2,2,2,1,1,2,2,1,1,2,2,2,1,2,2,2,1,1,2,1
1, 0,0,0,0,0,1,2,2,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,2,2,2,1,2,2,2,1,2,1,1,2,2,1,1
1, 2,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,2,1,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1
1, 2,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,1,2,2,1,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1,2,1
1, 0,0,0,0,0,1,2,1,1,1,1,2,2,1,1,2,2,1,2,2,2,1,1,2,2,1,2,1,1,1,1,1
1, 2,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1
1, 1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,2,1,1,2,2,1,2,2,2,1,2,2,1,1,1,2,1,1,1,1
1, 1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1
1, 2,1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,2,2,1,1,1,2,1,2,2,2,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1
1, 2,1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1,2,2,2,1,1,2,2,2,2,1,1,1,2,1,2,1,1,1
1, 0,0,0,0,0,1,2,2,2,2,1,1,1,2,2,1,2,1,2,2,1,1,1,1,2,1,1,2,2,1,1,2,2
1, 2,1,1,1,1,2,1,1,2,1,1,2,2,1,2,2,1,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1
1, 0,0,0,0,0,1,2,2,2,2,1,1,1,2,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0
1, 1,1,1,2,1,1,2,1,2,1,1,2,1,1,1,2,2,1,2,1,1,1,2,2,2,1,1,2,2,1,2,2,1
1, 2,1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,2,1,2,1,2,2,1,2,1,1,1,2,2,2,1,1,1,2,1,1,2
1, 2,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1
1, 2,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1
1, 2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,2,1,2,1,2,1,1,2,1,1,1,1,2,2,1,1,1,2,1,2,2,1
1, 0,0,0,0,0,1,2,1,1,1,1,2,2,2,1,2,1,1,2,1,2,1,1,2,1,2,1,1,1,1,2,1
1, 2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,2,1,2,2,0,0,0,0,0,0
1, 1,1,1,2,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,2,2,2,1,1,1,2,1,1,1,2,2,1,1,2,2,1
1, 1,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1

Anexo V. Continuación

1, 1,1,1,1,2,1,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,1
 1, 1,1,2,2,1,1,1,2,1,2,1,1,1,2,1,1,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1
 1, 2,1,2,1,2,1,1,2,1,2,1,1,2,2,1,1,2,2,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,2,1
 1, 2,1,2,1,2,1,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,2,2,1,1,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1
 1, 1,1,2,2,1,1,2,2,2,1,1,1,2,2,1,1,2,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1
 1, 2,1,1,2,1,1,2,2,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,2,1,2,1,2,2,1
 1, 2,1,2,1,1,1,2,2,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,2
 1, 1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,2,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,2,2
 1, 2,1,2,2,1,2,2,2,1,2,1,1,2,2,1,1,2,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1
 1, 1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,2,1,2,1,1,1,2,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1
 1, 2,1,2,2,1,1,1,2,2,2,1,1,2,2,1,1,2,1,1,2,2,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1
 1, 2,1,1,1,2,1,1,2,2,1,1,1,2,2,1,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1
 2, 0,0,0,0,0,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,2,1,1,2,2,2,1,1,1,2
 2, 2,1,1,1,2,1,1,2,2,1,1,1,2,1,1,1,2,2,1,2,2,1,1,2,1,1,1,1,2,2,1,2,1,1
 2, 2,1,2,1,1,1,2,2,2,1,1,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,2,2,1,1,2,1,1
 2, 0,0,0,0,0,2,2,1,1,2,2,2,2,1,2,1,1,1,1,1,1,2,1,2,2,2,1,2,1,2,1,2
 2, 2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,2,2,2,1,2,2,1,1,1,2,1,2,1,1,1,2,1,2,2,2,1,2
 2, 0,0,0,0,0,2,1,2,1,1,2,2,2,2,1,2,1,1,2,2,2,2,1,1,1,1,2,2,1,2,2,1,2
 2, 2,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1
 2, 2,1,2,1,1,2,1,2,2,1,1,1,2,2,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1
 2, 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,2,2,2,2,1,1,1,2,2,2,1,1,2,1,2,2,2,1,2,2,1
 2, 0,0,0,0,0,1,2,2,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,2,2,1,2,1,1
 2, 2,1,1,2,1,2,1,2,1,2,1,1,2,2,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,2,2,1,2,1,1
 2, 2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,2
 2, 0,0,0,0,0,2,2,2,2,1,1,1,1,2,1,2,1,1,2,1,2,2,2,2,1,1,0,0,0,0,0,0,0
 2, 2,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,2,2,2,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2
 2, 1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,2,2,1,2,1,2,1,1,1,1,2,1,2
 2, 2,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,2,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,2
 2, 1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,2,1,1,1,2,1,1,1,2,1,2,2,2,1,1
 2, 1,1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,2,2,2,1,1,2,1,2,2,2,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1
 2, 1,1,1,1,1,2,1,2,1,2,1,1,1,2,1,1,2,1,1,2,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1
 2, 2,1,1,1,1,1,2,1,1,2,1,1,1,1,2,2,2,1,2,2,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1
 2, 1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,2,1,2,2,1,1,1,1,2,1,2,2,1,1,1,1,1
 2, 2,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,2,2,1,2,1,1,1,1,2,2,2,1,1
 2, 2,1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,2,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1
 2, 1,1,1,2,1,1,2,1,1,2,2,1,2,1,2,2,1,1,2,1,1,1,1,2,1,2,2,2,1,1,1,1,1
 2, 1,1,1,1,1,1,2,2,1,2,1,1,2,2,1,1,2,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1
 2, 0,0,0,0,0,2,2,2,1,1,1,1,1,1,1,2,2,2,2,2,2,1,2,1,1,0,0,0,0,0,0

Anexo V. Continuación

2, 1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,2,2,1,1,2,2,1,1,1,1,1,2,2
 2, 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,2,1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1
 2, 0,0,0,0,0,0,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,2,2,1,1,1,1,1
 2, 0,0,0,0,0,0,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,2,1,2,2,2,2
 2, 0,0,0,0,0,0,2,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,2,2,1,1,1,2,2,2,2,1
 2, 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,2,1,2,1,1,1,1,1,2,2,1,2
 2, 0,0,0,0,0,0,2,2,2,2,2,1,1,2,2,1,1,2,1,2,2,1,2,1,1,1,2,0,0,0,0,0,0,0
 2, 0,0,0,0,0,0,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1
 2, 0,0,0,0,0,0,1,2,2,1,1,1,1,2,2,2,2,2,1,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,2,2,2,2,1,1
 2, 0,0,0,0,0,0,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,2,1,1,2,1,1,2,1,1
 2, 0,0,0,0,0,0,1,1,2,1,1,1,2,2,1,1,2,1,1,2,1,1,2,1,2,1,1,2,1,1,1,1,2
 2, 0,0,0,0,0,0,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,1
 2, 0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,1,1,1,1,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,2,2
 2, 2,2,1,1,1,1,2,1,2,2,2,1,2,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,2,1,2,1,1
 2, 0,0,0,0,0,0,2,2,2,2,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1
 2, 0,0,0,0,0,0,2,2,1,2,1,1,1,2,2,1,1,2,1,2,1,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1
 2, 0,0,0,0,0,0,2,2,2,2,1,1,1,2,2,1,1,2,1,1,2,1,2,1,2,2,2,0,0,0,0,0,0,0
 2, 0,0,0,0,0,0,2,2,2,2,1,1,1,2,2,2,1,2,1,1,2,2,1,1,2,2,2,0,0,0,0,0,0,0
 2, 0,0,0,0,0,0,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0,0
 2, 0,0,0,0,0,0,2,2,2,2,1,1,2,1,2,2,1,2,1,2,2,2,2,2,1,2,1,0,0,0,0,0,0,0
 2, 0,0,0,0,0,0,2,2,2,1,2,1,2,1,2,2,1,2,1,2,2,2,2,2,1,2,1,1,2,1,2,1,2,2
 2, 0,0,0,0,0,0,1,2,2,1,2,1,2,1,2,2,1,2,1,1,2,2,1,1,2,2,1,1,2,1,1,2,2,2
 2, 1,1,1,2,2,1,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,2,1,2,1,2,2
 3, 0,0,0,0,0,0,2,1,2,1,1,2,2,2,2,2,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,2,2,1,1,1,1,1
 3, 2,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1
 3, 1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,2,2,2,2,1,2,1,1,2,2,1,1,1,2,2
 3, 2,2,2,1,2,1,2,2,2,1,2,2,2,2,2,2,2,1,1,1,1,1,2,2,2,1,1,2,1,1,1,1,1
 3, 2,1,2,2,2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,2,2,1,2,1,1,2,2,1,1,1,2,1
 3, 1,2,2,2,1,1,2,1,2,1,2,1,1,1,2,2,2,1,1,1,2,1,1,1,2,2,2,1,1,2,1,1
 3, 2,1,2,2,2,2,2,2,1,2,1,1,2,2,2,2,2,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1
 3, 2,1,1,1,1,1,2,2,1,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1
 3, 2,1,2,2,1,2,1,2,2,2,1,1,2,2,2,2,2,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1
 3, 1,1,1,2,2,1,1,2,2,1,1,1,2,2,2,2,2,1,1,2,2,2,1,1,2,1,1,2,1,2,2,2,1,2
 3, 1,1,1,2,1,2,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,2,2,2,2,2,2
 3, 1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,2,0,0,0,0,0,0,0,1,2,2,1,1,1,2,1,1,2,2,2,1,1,1
 3, 1,1,2,2,1,2,2,1,2,2,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,2,2,1,1,2,1,1,1
 3, 2,1,2,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,2,2,1,2,1,2,2,2,1,2,1
 3, 1,1,1,1,2,2,2,1,2,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1
 3, 0,0,0,0,0,0,1,2,2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,2,2,2,1,1,1,2,1,0,0,0,0,0,0,0
 3, 2,2,2,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,2,2,1,2,1,1,1,1,2,2
 3, 2,1,2,2,2,2,2,2,2,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,2,2,2,2,1,1,1,1,1,1,1,2
 3, 1,2,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,2,2,1,1,2,2,2,1,1,2,1,2,2,2,1,1

Anexo V. Continuación

3, 1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,2,1,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,2,2,1
 3, 1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,2,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1
 3, 2,1,2,2,1,1,2,2,2,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1
 3, 1,1,2,1,2,2,1,1,1,2,1,1,2,1,1,2,2,1,2,1,1,1,1,1,1,2,1,2,2,2,1,1,2,2
 3, 0,0,0,0,0,2,2,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,2,1,2,2,2,1,1,1,1,2,2,2,2,2,1,2
 3, 1,2,2,2,1,2,2,2,2,1,1,2,1,2,2,1,1,1,2,1,2,1,2,1,1,1,2,2,2,2,1,2,2,2
 3, 2,1,2,2,1,2,2,2,2,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,2,0,0,0,0,0,0
 3, 1,1,2,1,2,2,2,1,2,1,2,1,2,2,1,2,1,2,2,1,1,2,1,1,1,2,1,2,2,1,2,2,1,2
 3, 1,1,2,2,2,2,1,2,2,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,1,2,2,1,1,1,2,2,2,1,2,2,2
 3, 1,1,2,2,1,2,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,2,2,1,2,2,2,1,1,2,1
 3, 1,1,1,2,1,2,1,1,1,1,2,2,2,1,1,2,1,1,2,1,2,2,1,1,2,2,1,1,1,1,2,1,2
 3, 1,1,2,2,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,2,1,1,1,2,2,2,1,1
 3, 1,1,1,2,1,1,2,1,1,2,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,1,2,1,1,1,1,1,1
 3, 1,1,2,2,2,2,2,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,2,2,2,1,1,1,2,1,1,2,2
 3, 1,1,1,2,1,2,2,1,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,2,1
 3, 1,1,2,2,1,1,2,2,2,1,1,1,2,2,2,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,2,1,2,1,1,1,2,1,2
 3, 1,1,2,2,1,2,2,2,1,1,2,2,2,1,2,2,1,1,1,1,2,1,2,1,2,2,1,2,2,1,1,2,2,1
 3, 1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2,2,1,2,2,2,1,2,1,1
 3, 1,2,1,1,1,1,2,2,2,1,1,2,2,2,1,1,1,2,2,2,2,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,2,2,1
 3, 1,2,1,1,1,1,2,2,2,1,2,2,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0
 3, 1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,2,2,2,1,2,1,2,2,2,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,2
 3, 1,2,2,1,1,2,2,1,2,2,2,1,1,1,2,2,2,1,1,1,2,1,2,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0
 3, 0,0,0,0,0,2,2,2,1,2,1,1,1,1,1,2,2,1,2,2,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,1,2,1
 3, 2,2,2,2,2,1,1,1,2,1,2,1,2,2,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,2,2,2,1
 3, 2,1,2,2,1,2,2,2,1,1,1,1,1,2,1,1,2,2,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1,2,2,1,1,2
 3, 1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,2,2,2,2,1,1,1,2,1,2,1,2,2,1
 3, 1,1,2,2,2,1,1,2,2,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,2,1,1,2,2,1,1,1,1,2,1,1,2,1,2
 3, 2,2,1,1,1,2,1,2,2,1,1,1,2,2,2,1,2,2,1,1,2,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,2,2
 3, 1,1,2,2,1,2,1,1,2,1,2,1,0,0,0,0,0,0,2,2,1,1,2,1,2,1,2,1,1,1,2,2,1
 3, 2,2,1,2,2,2,2,2,2,1,2,1,1,1,1,1,1,2,1,1,2,2,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1
 3, 2,1,1,1,2,2,2,1,2,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,2,1,1,2,1,2,2,2,1,1,1,1,1,1,1
 3, 2,2,1,2,2,2,1,1,1,2,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,2,1,2
 3, 2,2,2,2,1,2,1,1,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,2,2,1,2,1,1,2,1,1,2,1,1,1
 3, 1,1,2,2,2,2,2,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,2,1,1,1
 3, 2,2,1,2,1,2,1,2,2,1,2,1,1,2,1,1,1,2,1,1,2,2,2,1,2,1,1,1,2,2,1,1,2,1
 3, 1,1,2,2,2,2,1,1,1,1,2,1,1,2,1,1,1,2,1,2,2,2,1,1,2,2,1,2,2,2,1,1,2,2
 3, 0,0,0,0,0,0,1,2,2,1,1,2,1,1,2,1,2,1,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,2,1,1,2,2
 3, 2,1,2,2,2,2,2,2,1,2,2,1,1,1,2,2,2,2,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,2,2,1,2,1
 3, 2,2,2,2,2,1,1,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,2,2,1,2,2,1,2,2,1,2,1,1,1,2,1
 3, 2,2,1,2,2,2,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,2,1,1,2,2,2,2,2,1,2,1,2,1,1,2,1
 3, 0,0,0,0,0,1,2,1,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1

Anexo V. Continuación

3, 1,2,1,1,1,2,2,2,1,1,1,2,1,1,1,1,1,1,1,1,2,2,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0
 3, 1,1,2,2,2,1,2,2,1,2,2,1,1,1,2,2,2,2,1,1,1,2,1,1,1,1,0,0,0,0,0,0
 3, 2,2,2,1,1,2,2,2,1,1,1,1,2,1,1,1,1,2,2,2,1,1,1,1,2,1,0,0,0,0,0,0
 3, 1,2,1,2,2,2,2,1,2,2,1,2,1,1,2,2,2,1,2,1,2,2,2,1,2,2,0,0,0,0,0,0
 3, 2,2,2,2,1,2,1,1,1,1,2,1,2,1,2,1,2,1,1,2,1,1,2,2,1,0,0,0,0,0,0
 0, 0,0

Anexo VI. Matriz de Datos Utilizada en Software GenePop

(Cada columna representa un locus - 34 en total)

Chome

```

011111 ..... 0100111 11111111 1101001
011110 100011 0110111 11011111 1011011
011111 000111 11111111 11111111 1111111
011100 000100 1011111 11111011 1101001
..... 001111 1001111 10101001 0111011
011111 111111 11111111 10111011 0111111
011011 100011 1010111 01101001 1101111
111111 111011 1111101 11011111 0111011
..... 101011 0111001 11101111 1010110
..... 101011 1110101 11010011 0110111
010111 111011 1011011 01111111 1111101
011011 100011 0001111 01011111 0111001
111111 111111 11111111 01111110 1110111
..... 0001001 10101011 1111111
111110 111111 1000101 11101111 .....
010110 ..... 1101001 00011111 0101111
..... 0111111 11101010 1111111
011111 111011 1000011 00110001 0001101
..... 100111 1100011 00010001 0110011
001110 111111 1101101 00111111 1111111
011110 101111 0011011 01111100 0111101
..... 101111 0011001 00011001 0111111
011111 001111 1111101 01111111 0001111
111111 000111 0110010 00100111 0111111
111111 101111 1111011 11111111 1111111
011111 100011 0011101 00010101 1111111
011111 100011 1100011 00001110 1011111
..... 100001 1100101 00111101 1001100
011111 011011 0010011 01011111 1111111
..... 100001 1101010 11111111 .....
```

Anexo VI. Continuación

111011 010110 1110010 11100011 0010001
 011111 100011 0101001 01110001 1101110
 011111 000111 0111011 01111110 1111101
 011111 101011 0111011 01111100 1111111
 011111 111011 0101011 01011100 1101001
 101111 1000101 10101101 0111101
 011111 011111 0111111 10010100
 111010 111101 1101000 11110111 0011001
 111000 111111 0111101 11011011 1101111
 111101 101011 1111111 11011011 1101111
 110011 101011 1011101 01111111 1111111
 010101 101011 0011001 01111011 1111101
 010101 101111 1011101 00111011 0111111
 110011 000111 0011011 00111111 0111011
 011011 001111 0011111 00011111 0101001
 010111 001111 0001111 00111111 0101110
 111111 101111 1010111 00111011 0111100
 010010 001011 0011011 00011111 0111111
 111111 100011 1010111 01011011 1111111
 010011 100011 0011011 00010111 1111111
 011101 100111 0011011 01011111 1111111
 010001 101111 0011111 01111111 1111110
 011111 101011 0111011 01111011 1111111
 100001 100011 1101111 01111111 1111101
 011111 101111 0010011 00111111 1111111

Zapallar

..... 110111 1111001 11111011 0001110
 011101 100111 0111001 00110111 1001011
 010111 000111 0101111 11100011 0011011
 001100 0001011 11110100 0101010
 011111 111011 0001001 11010111 0100010
 010110 0001011 00001111 0010010
 011111 110011 1110011 11111111 0111111
 010110 100111 0001011 11111111 0001111
 0000011 10001101 0001001
 100011 1111011 11001111 1001011
 011010 101011 0011011 10111101 1001011
 011111 111011 1111111 01111111 0111010
 000011 1101011 01000011
 011111 101011 0001011 01111111 1111010
 111111 111011 1101110 11001010 1111010

Anexo VI. Continuación

011111 101011 1111001 01111111 0101010
 101011 111111 1100010 11101110 1000011
 111111 100011 0001101 00011111 0011111
 111110 101011 1011011 00101111 1111111
 011111 011011 1000100 00111111 1111101
 101111 111110 1110100 11110100 1111111
 011110 101111 1011111 01001011 1100011
 011111 100011 1111111 01101011 0111111
 111011 011001 0100110 11110100 0111111
 111111 001011 0011001 01011111 1101111
 000111 1111100 00001011
 111111 001111 1111100 11001100 1111100
 0111111 00011111 0111101
 001111 1111111 11110101 0011111
 010111 1111111 11111001 1010000
 010101 1111111 10101001 1100001
 1111111 00101011 1110010
 000001 1001101 00101110
 011111 1111101 01101111 1110101
 100111 1000001 1000011
 110011 1111111 10101101 1011011
 110111 0011011 01101001 1011110
 101011 1111111 10111101 1111011
 1111101 10111111 1101000
 001111 010001 0101011 11111001 1101011
 000001 1101111 11111111 1111001
 001011 1001101 01011111 0111011
 000011 1001101 10101000
 000011 1000101 10011000
 110111 1111001 01111111
 000011 0100101 00000101
 000101 0100101 00000101 1010100
 100101 0100101 10011001 1011000
 111001 011101 1111001 11111001 1010100

Guayacán

..... 010110 0000111 11101011 0011111
 011111 000110 0111111 01110111 0001111
 111110 111101 1101011 00001011 0011100
 000101 000100 0000011 11100011 0111111
 010001 111111 0111011 11001011 0011101
 100011 010101 1100011 10110111 0001101

Anexo VI. Continuación

010000 001011 0000011 00111111 0111111
 011111 001011 1011111 11111111 0111111
 010010 100011 0000011 00111111 0011111
 111001 100111 0000011 00011011 0100010
 111010 110001 1111111 11101011 0000000
 111110 011110 10011101 1000111
 110010 010000 1111111 11101010 0110111
 010011 111011 1111111 11100010 1000101
 111100 010111 0111101 10110111 1111111
 100111 1111011 00011101
 000010 111111 1011101 10111001 0111100
 010000 000111 1011111 10000011 1111110
 101100 111111 0011101 10001101 0001011
 110111 111111 0011011 01111011 1111001
 111111 010110 0111011 11111111 1111011
 010011 000110 0011111 01011011 1111011
 110100 111011 0110010 11111101 0001100
 000111 0111110 10001111 0000010
 100010 000110 1001110 10101110 0001000
 010010 000101 1011111 10101110
 110100 010101 0010100 11011101 0010010
 110000 100111 1110101 11100111 0001000
 110010 111100 0111111 10111001 0001101
 111010 111100 0110110 10011001 1111010
 110010 110111 1111111 11101001 1100011
 111011 011011 1001111 11101010 1111111
 110000 011100 0111111 10110001 1101100
 111010 010111 0111111 10011101 1101101
 110011 000111 0111001 11010111 1101010
 110010 001100 0100111 10101001 0011001
 110111 111110 1111111 11101001 0001011
 101111 000110 0011100 00011011 1011001
 101110 101111 1001111 11101111
 101111 000100 1100011 11101111
 111111 110111 1100010 10001111 1100110
 100110 010001 1100011 10101111
 000101 1111001 00111011 1101101
 000001 110101 0010111 11111111 0010001
 010010 001111 1011001 11100011 1100110
 111101 111111 1011101 10000111 0101001
 110001 100110 0011111 01100111 1011010
 001110 100111 0001001 10011101 1111100

Anexo VI. Continuación

```

110010 110101 ..... 00110101 0111001
001000 000101 1111101 10001111 1011111
011100 010101 1011111 01101000 1111111
001000 111001 1111111 11101111 1111010
000010 110111 1011111 00101101 1011011
110000 001110 1111110 11111001 1110111
001010 100101 1011101 10001011 1001101
110000 111101 1011101 00011001 0001100
..... 100110 110101 1 11101111 0101100
010000 001001 1100001 11101111 0100101
000001 110111 1011101 00100100 1011101
001000 101111 0111100 11000001 0101101
..... 101111 1011101 11011011 1110011
101110 001110 1111111 11001111 .....
110001 001001 1100000 11101111 .....
000110 001111 1011110 00111101 .....
101000 001001 0110001 01000100 .....
000010 111110 1010101 10111001 .....

```