



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



VALIDACIÓN DE OCHO MARCADORES  
MICROSATÉLITES PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO DE  
*MYTILUS CHILENSIS*

**DANIELA CICHERO MOLINA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: VÍCTOR MARTÍNEZ MONCADA

SANTIAGO, CHILE  
2013



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



VALIDACIÓN DE OCHO MARCADORES  
MICROSATÉLITES PARA EL ANÁLISIS GENÉTICO DE  
*MYTILUS CHILENSIS*

**DANIELA CICHERO MOLINA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Fomento de la  
Producción Animal

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : Víctor Martínez	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: Carlos Magni	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: Eduardo Kessi	.....	.....

SANTIAGO, CHILE  
2013

**VALIDACIÓN DE OCHO MARCADORES MICROSATÉLITES PARA EL ANÁLISIS  
GENÉTICO DE *MYTILUS CHILENSIS***  
**(Validation of eight microsatellite markers for genetic analysis of *Mytilus chilensis*)**

Daniela Cichero Molina

Laboratorio FAVET-INBIOGEN, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias,  
Universidad de Chile.

Financiado por proyecto 07CN13PPD-240 INNOVA CHILE y patrocinado por el  
Laboratorio de Investigaciones en Biotecnología y Genómica Animal (FAVET-INBIOGEN)

## RESUMEN

El mejillón chileno (*Mytilus chilensis*), es una especie ampliamente distribuida a lo largo de las costas de Chile ubicándose desde Iquique hasta Tierra del Fuego. Esta especie es un recurso de gran relevancia económica, principalmente en el sur de Chile.

En el presente trabajo se llevó a cabo la validación de un conjunto de microsatélites no focales, obtenidos *in silico*, a partir de información de secuencias expresadas (*ESTs*) de *Mytilus edulis*, previamente desarrollados en el laboratorio FAVET-INBIOGEN. Además de un conjunto de cinco marcadores microsatélites, ya publicados en la literatura. Adicionalmente se estudió el tipo de herencia considerando información familiar. El DNA se obtuvo de noventa mejillones pertenecientes a la especie *Mytilus chilensis*. Veinte microsatélites putativos fueron genotipados de los cuales solo ocho resultaron ser altamente polimórficos, con un promedio de 10,88 alelos por *locus*. El coeficiente de endogamia estimado para cada marcador varió de -0,26 a 0,69. Todos los *loci* mostraron diferencias significativas, en relación a lo esperado respecto del equilibrio de Hardy-Weinberg (Valor  $P < 0,05$ ). En su gran mayoría causado por una deficiencia en el número de heterocigotos. Se sugiere que este fenómeno podría ser consecuencia de una alta frecuencia de alelos nulos y de un proceso de subestructuración genética de la población, pero se requiere mayor información al respecto para confirmar ésta hipótesis. Considerando la actividad productiva intensiva en esta especie, los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan información útil sobre aspectos importantes de la genética de *Mytilus chilensis*.

**Palabras clave:** marcadores microsatélites, *Mytilus chilensis*, *EST*.

## ABSTRACT

The Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis*), is a species widely distributed along the Chilean coast from Iquique to Tierra del Fuego. This species is an economically important resource mainly in southern Chile.

At the present work was carried out to validate a set of microsatellites markers, developed previously in FAVET-INBIOGEN laboratory, with information obtained *in silico* of expressed sequence tags (EST) for *Mytilus edulis*. Together with a set of five

published microsatellites markers. Validated microsatellites were used to study mendelian inheritance considering family information. DNA was isolated from ninety mussels of *Mytilus chilensis*. Twenty putative microsatellite markers were genotyped of which only eight were highly polymorphic, with the average of 10.88 alleles per *locus*. The inbreeding coefficient estimated for each marker varied from -0.26 to 0.69. All *loci* showed significant departures from Hardy Weinberg equilibrium ( $P < 0.05$ ), due to heterozygosity deficiency. We suggest that this phenomenon could be a consequence of a high frequency of null alleles and a process of genetic substructuring, hypothesis that should be confirmed with further analysis. Considering the intensive production in this species, the information generated in this work represents an important tool in subsequent population's studies in *Mytilus chilensis*.

**Keywords:** microsatellite markers, *Mytilus chilensis*, EST.

## INTRODUCCIÓN

Los moluscos bivalvos del género *Mytilus*, conocidos comúnmente con el nombre de choritos o mejillones, incluyen un gran número de especies de importancia comercial. Se encuentran entre los invertebrados marinos más emblemáticos caracterizados por su distribución antitropical, es decir, presentes en aguas frías y templadas de ambos hemisferios, ausentes en los trópicos [3,32].

En Europa existen tres especies de *Mytilus* (**Anexo 1**. Figura 1.A): *Mytilus edulis* (*Blue mussel*), *Mytilus galloprovincialis* (*Mediterranean mussel*) y *Mytilus trossulus* (*Baltic mussel*), este último confinado al mar Báltico sin actividad pesquera importante. Por el contrario, *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, son cosechados a gran escala dada su extensa distribución. Cabe destacar el constante debate en cuanto a la taxonomía de estas dos especies capaces de formar zonas de hibridación y dar origen a híbridos fértiles.

En el hemisferio Sur, el estatus taxonómico de *Mytilus* sp. aún no está definido. Toro *et al.* [28] describen que los choritos presentes en las costas de Chile comparten alelos, ya sea con *M. edulis* o *M. galloprovincialis*. Además señalan la presencia de híbridos de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* en un 3,9% de sus muestras. A pesar de esto, actualmente se sigue clasificando al mejillón como *Mytilus chilensis* [13].

En Chile el chorito (*M. chilensis*) (**Anexo 1**. Figura 1.B) ha sido explotado y comercializado en grandes volúmenes desde la década del setenta [14], cosechado desde centros de cultivo ubicados en la Región de Los Lagos, principalmente en las cercanías de Puerto Montt, Calbuco y toda la isla de Chiloé, llegando a ser altamente relevante para el país como actividad productiva y exportadora. En el **Anexo 2** se muestra una gráfica con esta situación.

Aun cuando la miticultura se posiciona como una importante fuente de ingresos a nivel nacional y mundial, existe poca información disponible de la secuencia genómica de los mejillones. En las últimas tres décadas se han desarrollado marcadores moleculares para describir polimorfismos genéticos en mitílidos, sin embargo la mayoría presenta un alto número de desventajas relacionados con la interpretación de datos, bajo número de polimorfismos e información insuficiente para llevar a cabo pruebas de paternidad.

En Chile y otros países, el cultivo de mitílidos experimenta serios problemas relacionados con el abastecimiento de semilla y su posterior crecimiento, lo que sumado a los escasos estudios genéticos sobre sus poblaciones naturales, hace necesario el desarrollo de estudios en el mejillón chileno. Lo anterior por ser una especie acuícola de relevancia comercial y en la cual, este recurso natural depende sólo de sus poblaciones silvestres.

El objetivo del presente trabajo fue validar un conjunto de microsatélites no focales (desarrollados en una especie distinta a la especie en estudio) obtenidos *in silico* con información de secuencias expresadas de poblaciones de *M. edulis*, más un set de microsatélites previamente publicados en la literatura. Esta información es de gran relevancia para verificar su uso en estudios poblacionales de esta especie en Chile, así como también en estudios de recombinación genética.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1-Individuos y número de muestra**

Se seleccionaron 90 choritos de la especie *M. chilensis*, correspondientes a 45 familias provenientes de distintas zonas geográficas del sur de Chile, las cuales fueron producidas mediante un diseño de propios hermanos, donde cada macho (M=45), se cruzó con 45 hembras distintas. Los ejemplares fueron obtenidos previamente dentro del programa de mejoramiento genético para el proyecto 07CN13PPD-240 INNOVA CHILE.

Para la determinación de herencia mendeliana se seleccionaron dos familias. De cada familia se muestreó un total de 10 descendientes directos.

### **2- Genotipado de marcadores**

La extracción de DNA genómico se realizó desde tejido de manto o branquias utilizando el kit comercial “*DNeasy Blood & Tissue Kit*” (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La integridad del DNA extraído fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa al 1% y su cuantificación se llevó a cabo mediante fluorimetría, utilizando la plataforma de cuantificación Qubit™ (INVITROGEN). Este método se basa en la detección de la fluorescencia emitida por colorantes o fluoróforos selectivos que se unen en forma específica a su molécula objetivo (DNA, RNA o proteínas).

La primera etapa del genotipado se realizó amplificando una región particular de DNA, a partir de una pequeña cantidad original utilizada como molde, mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) [1]. La segunda fase del genotipado involucró la detección del tamaño de los amplicones mediante electroforesis capilar. Este método permite separar por tamaño los fragmentos de DNA amplificados y su detección automática por fluorescencia, permitiendo detectar diferencias de tan sólo una base nucleotídica.

En este trabajo, un total de veinte microsatélites fueron genotipados. Nueve de ellos se seleccionaron de la literatura (4 desarrollados en *M. chilensis*, 3 en *M. galloprovincialis* y

2 en *M. trossulus*) [7, 23,24] y los restantes once fueron previamente desarrollados en el laboratorio FAVET-INBIOGEN a partir de secuencias expresadas (ESTs) de *M. edulis*, disponibles en la base de datos *Gen Bank*.

Las amplificaciones de los microsatélites se llevaron a cabo mediante reacciones de PCR individuales en un termociclador Axygen. Las referencias de cada uno de ellos así como las secuencias de los partidores sentido y antisentido utilizados para su amplificación se detallan en la **Tabla 1**.

Con el fin de obtener amplicones fluoroforados para su posterior análisis mediante electroforesis capilar, se incluyó en la mezcla de cada reacción de PCR un tercer partidor "M13", marcado con uno de los siguientes fluoróforos : NED, VIC, FAM o PET. Este partidor tiene como función unirse a una secuencia adicional contenida en el extremo 5' de cada partidor sentido (cola de "M13") [26], permitiendo reducir los costos de marcar con fluorescencia cada uno de los partidores seleccionados, debido a su alto precio.

La mezcla para cada reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 7 µl, conteniendo: 1x de tampón de PCR, 0,525 UI de Taq polimerasa (Fermentas), 83 µM de mezcla de dNTPs, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,25 µM de partidor sentido, 1 µM de partidor antisentido, 1 µM de partidor "M13" fluoroforado, 0,5 ug/µl de albumina de suero bovina como adyuvante y entre 15-30 ng de DNA. El programa de PCR utilizado en las amplificaciones, se describe en el **Anexo 3**.

Los productos de PCR fueron enviados a un servicio comercial externo, para su análisis mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI PRISM® 3730-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Este servicio entrega los resultados de los electroferogramas obtenidos a partir de las muestras, los cuales permiten visualizar los alelos por su fluorescencia. La determinación del tamaño de los alelos en cada *locus* o genotipado, se llevó a cabo mediante su visualización en relación al tamaño del estándar Adv Liz 500. La precisión del tamaño se realizó utilizando el programa computacional, Genemapper® Software 3.2 (Applied Biosystems), especialmente diseñado para este objetivo.

**Tabla 1.** Secuencias de los partidores sentido y antisentido correspondientes a cada uno de los marcadores caracterizados en *Mytilus chilensis*.

<b>Marcador Ms</b>	<b>secuencia partidor <i>sentido</i> (5'- 3')</b>	<b>secuencia partidor <i>antisentido</i> (5'- 3')</b>	<b>Referencia o acceso Genbank</b>
ME 1	CCAGCTAGATCACAGACAAGACA	GCAAGCACGAGAGGAAGAAA	AM882085
ME10	CTTTCCAAACTAAACATGAAAC	TTGTGATATAAACGGAACAGA	AM880938
ME22	CCCTGAAGTAGCAAGCGAAG	GCCAGAGGTCAAGTGTCCA	AM880415
ME26	ACGGTTAAGGCTGCTAACTTC	CATTGTTTTGATGGAAAGACC	AM881670
ME34	CAAAGTCCCCACCTAAAAAGGAA	GGGTCTTCCCGTTTGTTT	AM878408
ME36	CAGTCATACATATTGATTGATTGATTAG	TAACCAGCGTGTTTAACCAACCA	AM878455
ME38	TGCATGTATTTTGTGGAGG	AAAAGAAGGGTCCATACCA	AM881801
ME45	AAAGACTAAGTTTTCCGTTATTA	AAAGCAATTGTAGGGGTCT	AM881289
ME46	GTTGTCTGTTACATCCCGACC	ACAGAATGGTTAAATTGCC	AM880048
ME48	TCATTTCAATGTCAAACACTGTC	TTATTGATGTTGTAATGTTTATGC	AM881242
ME49	GGGATCCAATTTTGAGCCTA	CATGTATGCCCTGCTGACTG	AM878144
MECH1	GAT GGC CGC ATC TGT AAT TC	TGT CGC ATG CTC ATT TCT TC	[23]
MECH3	AGA GGA GTT GCG ATG ATT	CGA AGT TGT GGA GGG TAT	[23]
MECH6	CAA CGA AAC AAA CGG ACT GA	TCA GTA AAC ATT GAA GTG GAG CA	[23]
MECH8	AAA CCT AAG TGC TGT TCA T	CAT TTA TTC GTC TGT CAC A	[23]
<i>MG<math>\mu</math>3</i>	AAACTAAAACTTCATCTAATCCC	AAGCAATCCAAAGTGAGAGG	[24]
<i>MG<math>\mu</math>5</i>	ACTTCTCCGGTAACATAATA	AGTCTTCCCTATGATGA	[24]
<i>MG<math>\mu</math>6</i>	GGGAAAGACTGCCTAACAAT	CTCTTACATAGAAAATGGTTTCG	[24]
MT203	GTTTTCCGAATGGCGAGATA	ACAACCAGTTCAATAGCGACA	[7]
MT282	TGCCACATTGTTTTCAAGGA	TTCACGACAGCGACTATGAAA	[7]

### 3- Análisis de datos

#### 3.1 Análisis genético poblacional

A partir de los genotipos, se calculó la frecuencia y número de alelos para cada *locus*, heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_e$ ).

Los valores de PIC “contenido de información polimórfica” (PIC, del inglés “*polymorphism information content*”) fueron calculados como una medida del polimorfismo de un marcador. Este valor depende del número de alelos amplificados y la distribución de sus frecuencias. La siguiente ecuación permite obtener los valores de PIC [2].

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  en la población y  $n$  es el número de alelos existentes en el marcador molecular.

Los estimadores descritos fueron obtenidos mediante el programa CERVUS 3.0 [16].

Las desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg (Valor  $P < 0,05$ ) se evaluaron utilizando el método de cadena de Markov [10], mediante el programa estadístico GENEPOP versión 4.0 disponible en la web [8]. Para estimar el déficit o exceso de heterocigotos, se calculó para cada marcador el coeficiente de endogamia ( $F_{IS} = H_e - H_o / H_e$ ).

La presencia de alelos nulos ( $r$ ) se evaluó de acuerdo al método descrito por Van Oosterhout *et al.* [31], el cual estima la frecuencia de alelos nulos en poblaciones que presentan desviaciones de la panmixia, con coeficientes de endogamia ( $F$ ) o índices de fijación ( $F_{IS}$  o  $F_{ST}$ ) conocidos. Para su cálculo se utilizó el coeficiente de endogamia reportado por Toro *et al.* [29] en poblaciones de *M. chilensis* del sur de Chile. Una frecuencia estimada de alelos nulos superior a 0,05, fue considerada significativa.

El estimador antes descrito fue obtenido mediante el programa estadístico INBREEDING CORRECTED NULL ALLELE ESTIMATOR, disponible en la web [21].

### 3.2 Análisis de segregación mendeliana

Para determinar si los marcadores se ajustaban a una herencia mendeliana, se seleccionaron 2 familias. Para cada una se evaluó el genotipo de ambos padres y 10 individuos de cada progenie, clasificándolos por clases genotípicas y sus frecuencias. Con la información obtenida se realizó una prueba exacta de Fisher usando tablas de contingencia de 2 x 2, las cuales fueron construidas con la ayuda del programa estadístico HANDBOOK OF BIOLOGICAL STATISTICS, disponible en la web [12].

### 3.3 Análisis de parentesco

Con el objetivo de establecer la posibilidad de realizar pruebas de paternidad mediante los microsatélites analizados en la población, se calculó la probabilidad de exclusión para cada *locus* (PE) según Jamieson y Taylor 1997 [15], donde se busca excluir un supuesto padre no relacionado, considerando información del genotipo del descendiente y de ambos padres. La ecuación utilizada es la siguiente:

$$PE = 1 - 2 \sum_{i=1}^n p_i^2 + \sum_{i=1}^n p_i^3 + 2 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 2 \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 3 \sum_{i=1}^n p_i^2 \sum_{i=1}^n p_i^3$$

Con el objetivo de determinar si el conjunto de marcadores analizados contienen información suficiente para llevar a cabo con éxito pruebas de paternidad en *M. chilensis*, se calculó la probabilidad de exclusión combinada (PEC), de acuerdo a la ecuación propuesta por Jamieson y Taylor 1997 [15]:

$$PEC = 1 - (1 - PE_1)(1 - PE_2)(1 - PE_3) \dots (1 - PE_k)$$

Donde *K* es el número total de *loci* analizados.

Los estimadores descritos anteriormente fueron obtenidos mediante el programa CERVUS 3.0 [16].

Finalmente, se realizó un análisis de paternidad, basado en un enfoque de máxima verosimilitud. La razón de verosimilitud es expresada como “*LOD score*” (el logaritmo

natural de la razón de verosimilitud) y corresponde a la probabilidad de paternidad de un macho en particular en relación a la probabilidad de un macho arbitrario. Así la paternidad es asignada al macho con el “*LOD score*” más alto [20]. La siguiente ecuación permite obtener los valores de “*LOD score*”:

$$L(H_1, H_2 | g_a, g_o) = \frac{T(g_o | g_a) \cdot P(g_a)}{P(g_o) \cdot P(g_a)} = \frac{T(g_o | g_a)}{P(g_o)}$$

Donde  $g_a, g_o$  representan el genotipo del padre y los hijos, respectivamente, para un *locus* dado,  $T(g_o | g_a)$  es la probabilidad para el genotipo del supuesto padre, dando el genotipo de la descendencia y  $P(g_o)$  son las frecuencias genotípicas de la descendencia.

Antes de iniciar el análisis de parentesco, se debe realizar una simulación previa, la cual tiene dos propósitos. Estimar el poder resolutivo del set de marcadores (microsatélites), dadas sus frecuencias alélicas y determinar la confianza en la asignación de parentesco del padre candidato más probable, al calcular los valores críticos de *LOD*. Así para niveles de confianza del 95%, un padre candidato con una puntuación mayor al valor crítico calculado, puede ser asignado con un 95% de confianza.

Si el poder resolutivo del set de marcadores es alto, la simulación puede no ser capaz de encontrar un límite inferior para el valor crítico calculado. En este caso el programa asignará un número arbitrario de -999. Por el contrario, si el poder resolutivo del set de microsatélites es bajo, la simulación no será capaz de establecer el límite superior. De esta forma, el valor crítico mostrado será 999. [16]

El análisis de parentesco y la simulación previa, fueron obtenidos por medio del programa Cervus 3.0. [16]

## RESULTADOS

### 1- Análisis genético poblacional

Para el total de los veinte microsátélites putativos analizados en este trabajo, sólo ocho resultaron ser efectivamente polimórficos (cinco de ellos seleccionados de la literatura, y los restantes tres desarrollados a partir de ESTs). Con la información obtenida a partir de los ocho *loci* seleccionados se calcularon los siguientes parámetros: número de alelos, heterocigosidad observada y esperada, valores de PIC, coeficiente de endogamia, valor de  $P$  para determinar equilibrio de Hardy-Weinberg, probabilidad de exclusión y frecuencias estimadas de alelos nulos. El detalle se muestra en la **Tabla 2**.

El número de alelos encontrados, varió entre los distintos *loci*, entre 4 (MECH8) y 18 (ME10/MT203), con un promedio de 10,88 alelos por *locus*. La heterocigosidad observada osciló entre 0,16 y 0,72, mientras que la heterocigosidad esperada mostró valores límites menos distantes, entre 0,53 y 0,94.

El valor del “contenido de información polimórfica” para cada *locus* fue alto (PIC > 0,5) [2], alcanzando un promedio de 0,73.

Todos los *loci* presentaron desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg (Valor  $P < 0,05$ ). Los valores de  $F_{IS}$  estimados para cada marcador, variaron entre los ocho *loci*, siendo MECH3 el que obtuvo el valor más bajo (-0,26) y MECH8 el mayor valor, alcanzando un coeficiente de endogamia de 0,7. En la Tabla 2 se puede apreciar que los *loci* ME1, ME10, ME49, MT203, MT282, MECH1, MECH8, no satisfacen el equilibrio de Hardy-Weinberg y presentan valores de  $F_{IS}$  superiores a 0,16. Esta situación es compatible con la idea de que la ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg, es reflejo de un déficit en el número de heterocigotos en la mayoría de los *loci* analizados. Tales deficiencias han sido ampliamente reportadas en invertebrados marinos. Entre las causas más comunes se sugiere una elevada frecuencia de alelos nulos [17].

Los valores estimados de alelos nulos para cada marcador indican su presencia en siete de los ocho *loci* analizados (Frecuencia estimada > 0,05). El detalle de las frecuencias alélicas estimadas, se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Resultados obtenidos para los 8 *loci* seleccionados. Número de alelos (NA), heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ), valor de PIC, coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), valor estimado de  $P$  para determinar equilibrio de Hardy-Weinberg, probabilidad de exclusión (PE) y frecuencias estimadas de alelos nulos ( $r$ ).

<i>Locus</i>	NA	$H_o$	$H_e$	PIC	$F_{IS}$	HWE Valores $P$	PE	$r$
<b>ME1</b>	7	0,508	0,796	0,757	0,36	0	0,765	0,225
<b>ME10</b>	18	0,386	0,941	0,926	0,59	0	0,966	0,508
<b>ME49</b>	13	0,444	0,860	0,838	0,49	0	0,88	0,408
<b>MECH1</b>	11	0,584	0,724	0,681	0,19	0,0017	0,69	0,062
<b>MECH3</b>	6	0,718	0,570	0,494	-0,26	0	0,454	-
<b>MECH8</b>	4	0,161	0,527	0,486	0,69	0	0,483	0,403
<b>MT203</b>	18	0,600	0,856	0,839	0,30	0	0,891	0,155
<b>MT282</b>	10	0,693	0,824	0,793	0,16	0,0027	0,815	0,220
<b>Promedio</b>	10.88	0,512	0,762	0,727	0,315	0,0006	0,9999*	0,2476

\*valores de PEC calculados para el conjunto de 8 *loci*.

## 2- Análisis de segregación mendeliana

Al analizar el modo de herencia, siete *loci* (ME10, ME49, MT203, MT282, MECH1, MECH3, MECH8) se ajustaron a una segregación mendeliana (Valor  $P > 0,05$ ). De las 16 proporciones genotípicas observadas (8 *loci* x 2 familias), 11 provinieron de cruzas en la cual uno o ambos padres eran heterocigotos, resultando en hijos con genotipos conforme a las proporciones genotípicas esperadas. Una de las proporciones provino de la crusa entre ambos padres homocigotos para el mismo alelo, resultando toda la descendencia igual a sus padres. Sin embargo 3 proporciones genotípicas no se ajustaron a una segregación mendeliana (ME1, ME10 en la familia 7 y MECH1 en la familia 8), al presentar genotipos inconsistentes con las proporciones esperadas en la descendencia. Para el *locus* ME1, el genotipo de los hijos no pudo ser determinado en

la familia 8, debido a que ambos padres no amplificaron.

De las 3 proporciones genotípicas que no se ajustaron a una segregación mendeliana, dos pueden ser explicadas por la presencia de alelos nulos (ME1, ME10 en la familia 7). Si se considera tales genotipos como heterocigotos para alelos nulos, ambos *loci* segregaran en forma mendeliana (Valor  $P > 0,05$ ). Sin embargo la proporción restante (MECH1 en la familia 8) no segrega según las leyes propuestas por Mendel. El detalle de las frecuencias genotípicas observadas en dos familias para cada uno de los 8 *loci*, se muestra en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Segregación de *loci* microsatélites en dos familias de *Mytilus chilensis*.

Familia	Locus	Genotipo parental		N° observado de hijos en cada clase genotípica				Valor de P
		Hembra	Macho					
7	ME1	230/0*	230/234	230/234 2	234/0* 4			1
	ME10	246/0*	256/262	246/256 3	246/262 2	256/0* 2		1
	ME49	293/297	293/297	293/293 1	293/297 5	297/297 4		1
	MECH1	181/183	181/187	181/181 4	183/181 2	183/187 1		0,429
	MECH3	121/141	121/137	121/121 1	121/137 1	141/121 3		0,4
	MECH8	223/223	205/223	223/205 2	223/223 8			1
	MT203	192/194	192/206	192/192 2	192/206 2	194/192 1	194/206 1	1
	MT282	366/366	352/358	366/352 4	366/358 2			1
8	ME1	n.a <sup>a</sup>	n.a <sup>a</sup>					
	ME10	246/272	246/268	246/268 1	246/246 3	268/272 3		0,143
	ME49	269/277	277/297	269/277 4	269/297 1	277/297 3		0,143
	MECH1	181/183	183/185	181/183 5	181/185 1	183/185 3		0,048 <sup>b</sup>
	MECH3	137/137	121/137	121/137 2	137/137 5			1
	MECH8	223/223	223/223	223/223 9				1
	MT203	192/202	192/194	192/192 3	192/194 1	202/192 3	202/194 1	1
	MT282	352/358	352/366	352/352 6	352/358 2			1

\* Alelo nulo

<sup>a</sup> n.a = no amplificó.

<sup>b</sup> Valor de P < 0,05 para el cual la segregación mendeliana fue rechazada.

### 3- Análisis de parentesco

Con el objetivo de establecer la posibilidad de realizar eficazmente pruebas de paternidad mediante los microsatélites analizados en la población se calculó la probabilidad de exclusión para cada uno de los marcadores. Los resultados indican que la probabilidad para un *locus* en particular fue de baja a moderada, mientras que la probabilidad de exclusión combinada (PEC) calculada para el total de *loci* alcanzó un valor de 0,9999. Por consiguiente, se esperaba *a priori* un elevado porcentaje de asignación.

Los valores críticos de *LOD* mostrados en la **Tabla 4**, fueron aplicados en un análisis de paternidad (con información del genotipo de ambos padres) para un total de veinte individuos correspondientes a la progenie de dos familias distintas de propios hermanos. Con niveles de confianza del 80% un 100% del total de hijos pudo ser asignado a ambos padres. Al aumentar el nivel de confianza al 95%, no hubo asignaciones efectivas. Sin embargo al analizar a cada padre candidato por separado, se observó un 26% de asignación en el caso de las madres y un 11% en los padres, a niveles de confianza del 95%.

**Tabla 4.** Valor crítico de “*LOD score*” y proporción de paternidades asignadas en una simulación de parentesco con información de ambos padres, con sexo conocido.

	Nivel de Confianza	
Resultados Simulación (n=10000)	80%	95%
Valor crítico <i>LOD score</i>	-999,00	4,72
Proporción de paternidades asignadas	99%	33%

## DISCUSIÓN

En las últimas tres décadas la extracción y cultivo del mejillón ha alcanzado altos niveles de producción, siendo la miticultura una de las áreas económicas acuícolas con mayor tasa de crecimiento.

Debido a la importancia de mantener la sustentabilidad de esta actividad, en la cual sus recursos dependen de la captación de semillas desde bancos naturales, se hace indispensable la caracterización genética de sus poblaciones naturales y de cultivo, por lo que los resultados obtenidos en este proyecto proporcionan información útil sobre aspectos importantes de la genética de *Mytilus chilensis*.

Para el total de veinte microsatélites putativos analizados en este trabajo, sólo ocho (ME1, ME10, ME49, MECH1, MECH3, MECH8, MT203, MT282) mostraron amplificación robusta, resultando ser efectivamente polimórficos. El bajo nivel de éxito (27%) en la amplificación de *loci* microsatélites desarrollados a partir de ESTs, podría deberse a que el partidador se extienda a lo largo de un intrón y/o a que contenga mutaciones, inserciones o deleciones (indels) [35]. A pesar de esto, la mayoría de las secuencias disponibles pertenecen a EST, por lo que se han convertido en un recurso relativamente simple para el desarrollo de microsatélites al requerir menos tiempo y dinero para su desarrollo, además de ser altamente transferibles entre especies cercanas [33]. Más importante aún es el hecho de que representan a zonas codificantes del genoma.

En relación a los partidores obtenidos de la literatura, es posible atribuir la impredecible y baja amplificación a altos niveles de divergencia filogenética entre las distintas especies de *Mytilus* [9]. Esta situación es comparable con datos publicados en estudios similares, en los cuales se ha analizado el potencial de amplificación en *loci* microsatélites no focales. Gardestrom *et al.* [7] caracterizaron 6 marcadores en la especie *M. trossulus* y evaluaron su amplificación cruzada en 16 ejemplares de la especie *M. edulis*, sólo 4 *loci* amplificaron exitosamente con niveles de polimorfismo apropiados.

La información analizada a partir de los datos calculados en este estudio, demuestra un alto nivel de variabilidad genética presente en la especie *M. chilensis*. El valor

“contenido de información polimórfica”, es un parámetro frecuentemente utilizado para evaluar cuan informativo es un marcador en una población, de acuerdo a las frecuencias alélicas obtenidas. El PIC promedio calculado para todos los marcadores fue de 0,73. En relación a la información disponible en la literatura este valor se considera alto (PIC > 0,5) [2], e indica un alto nivel de polimorfismo en la población analizada.

La heterocigosidad o heterocigosis ( $H$ ), es la medida utilizada generalmente para cuantificar la cantidad de variación genética debida a *loci* polimórficos y se define como la proporción de individuos heterocigotos para un *locus*.  $H$  puede expresarse como un valor observado o como un valor esperado, calculado a partir de las frecuencias génicas observadas en la población. Calcular la heterocigosidad para cada *locus* permite obtener el valor promedio para todos los *loci*, el cual indica la proporción de *loci* para los cuales se espera que el individuo sea heterocigoto [6]. La heterocigosidad esperada promedio en la población de *M. chilensis* fue de 0,76 lo que quiere decir que se espera que un individuo promedio de la población sea heterocigoto en un 76% de sus *loci*.

Mediante la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) es posible establecer si la composición genética de una población permanece en equilibrio, es decir, si las frecuencias génicas y genotípicas del grupo de individuos permanecen constantes de generación en generación, asumiendo que la población cumple con los siguientes supuestos: presencia de apareamiento aleatorio y ausencia de selección, mutación o migración [6]. Los resultados obtenidos evidencian desviaciones significativas de HWE (Valor  $P < 0,05$ ) para todos los *loci*. En la Tabla 2 se puede apreciar que los *loci* ME1, ME10, ME49, MT203, MT282, MECH1, MECH8, no satisfacen el equilibrio de Hardy-Weinberg y presentan valores de  $F_{IS}$  superiores a 0,16, esta situación es reflejo de un déficit en el número de heterocigotos. Tales deficiencias han sido ampliamente reportadas en invertebrados marinos [29]. Existen varias explicaciones para esta condición (presencia de alelos nulos, altos niveles de endogamia, selección, subestructuración genética de la población, e incluso errores en el proceso de genotipado). De ellos la existencia de alelos nulos se considera como una de las causas más probables reportada en moluscos bivalvos [17]. Este fenómeno se produce cuando existe una mutación en uno de los sitios de unión de los partidores, impidiendo su unión,

lo que genera que uno de los alelos no amplifique por lo que es genotipado como un falso homocigoto. Esta condición es altamente frecuente en microsatélites debido al elevado nivel de polimorfismo en las regiones que flanquean al marcador. Alelos nulos se han encontrado en una amplia gama de taxones, pero parecen ser más comunes en especies con un alto tamaño efectivo poblacional, incluyendo insectos y moluscos [4].

No obstante, es poco probable que el aumento en el número de homocigotos, en siete de los *loci*, se deba exclusivamente a la presencia de alelos nulos. Datos publicados en la literatura describen una estructura genética poblacional homogénea en la especie *M. chilensis*, a lo largo de las costas de Chile, siendo la excepción el estrecho de Magallanes, Punta Arenas [27]. Toro *et al.* [29] estudiaron la estructura genética de ocho poblaciones de *M. chilensis*, separadas por más de 1800 km de distancia, encontrando bajos niveles de diferenciación genética. Tales resultados son indicativos de un alto flujo de genes, lo que sugiere que estas poblaciones actuarían como una gran subpoblación. Esta situación es compatible con características propias de su ciclo de vida, como su extensa vida larval de tipo planctotrófica con existencia pelágica de 45 días, otorgándole a la especie una considerable capacidad de dispersión (cientos de kilómetros), la cual se ve favorecida por las corrientes marinas de las costas de Chile [27]. Sin embargo se requiere mayor información al respecto para confirmar esta hipótesis.

Para poder probar si existió un fenómeno de estructuración geográfica en la población, que podría ser una de las causas del desequilibrio pesquisado en este trabajo, sería necesario realizar otro estudio en el cual se incluya un número mayor de ejemplares que provengan de distintas zonas geográficas previamente definidas. De esta manera sería posible establecer si existen diferencias significativas entre las distintas subpoblaciones de manera de corroborar esta teoría.

Al analizar el modo de herencia, cinco *loci* (ME49, MECH3, MECH8, MT203, MT282) se ajustaron a un tipo de herencia mendeliana en ambas familias. De los ocho *loci* analizados, solo dos presentaban alelos nulos. La presencia de alelos nulos, a menudo se presume como resultado del proceso de diseño de los partidores, o por artefactos de PCR, tales como amplificación preferencial del alelo de menor tamaño por sobre el de mayor tamaño ( “*short allele dominance*”) en individuos heterocigotos [34]. Sin embargo,

el estudio realizado en este trabajo, reveló que los alelos nulos son heredados, sugiriendo que esta característica es resultado de una mutación presente en uno de los sitios de unión de los partidores. Por lo tanto rediseñar nuevos partidores evitando el supuesto sitio de mutación, sería una solución efectiva para ambos *loci*.

De las 16 proporciones genotípicas observadas, sólo una (MECH1 en la familia 8) no segregó según las leyes propuestas por Mendel debido a que dos de ellas se explicarían por alelos nulos. Este caso en particular podría deberse a eventos precigóticos y postcigóticos como segregación cromosómica no aleatoria durante la meiosis y la vinculación a un segundo *loci* con efecto dominante, los que han sido ampliamente reportados en moluscos bivalvos [18].

Estos resultados indican la necesidad de testear el modo de herencia para marcadores microsatélites, antes de ser usados en estudios poblaciones o en análisis de parentesco. A la fecha se han desarrollado diversos marcadores en *M. chilensis*, sin embargo la gran mayoría presenta un alto número de desventajas, en relación a la discriminación genotípica y bajo número de polimorfismos. Adicionalmente se asume un patrón de herencia mendeliana, resultando ser poco confiables.

Con el objetivo de establecer la posibilidad de realizar eficazmente pruebas de paternidad mediante los microsatélites analizados, se calculó el parámetro probabilidad de exclusión combinada (PEC). PEC es un valor que mide la probabilidad promedio de excluir a un individuo cualquiera no relacionado, como padre de un descendiente dado [15]. Para llevar a cabo con éxito pruebas de paternidad en moluscos bivalvos, la literatura recomienda valores de PEC superiores a 0,9998 [19]. Por consiguiente se esperarían, *a priori*, altos porcentajes de asignación. Sin embargo, errores de genotipado asociados a la presencia de alelos nulos o a artefactos de PCR pueden sobrestimar este valor, disminuyendo significativamente el poder real de este test.

En comparación con estudios similares [11,22], este trabajo presenta un alto porcentaje de individuos asignados a ambos padres. Con niveles de confianza del 80% el total de hijos asignados a ambos padres fue de un 100%. Estos resultados concuerdan con el alto número de alelos, de PIC y de PEC, calculados. Adicionalmente, al genotipar familias en las cuales se conocía con certeza la paternidad, se pudo corroborar la

presencia de alelos nulos en sólo dos de los marcadores analizados. Sin embargo al aumentar el nivel de confianza al 95% no hubo asignaciones efectivas. Mayores paternidades podrían ser asignadas al conocer el genotipo de uno de los padres, adicionando los datos genéticos perdidos o repitiendo los datos ya existentes, con el fin de reducir el porcentaje de error experimental. Resultados publicados por Marshall *et al.* [20], indican la necesidad de disponer del genotipo de uno de los padres para una certera asignación de paternidad. Sin esta información, al menos, un 50% más de *loci*, son necesarios para alcanzar un porcentaje de éxito similar, a un mismo nivel de confianza.

Finalmente, cabe destacar, el alto número de desventajas que presentan los microsatélites, al ser utilizados en choritos. Causado principalmente, por un déficit en el número de heterocigotos. Tal condición ha sido atribuida a una alta frecuencia de alelos nulos, y al fenómeno de subestructuración genética propio del mejillón chileno.

La gran cantidad de alelos nulos, complica la estimación precisa de los parámetros genéticos poblacionales, y especialmente, interfiere en la aplicación de análisis de parentesco. Es por esto la necesidad de caracterizar otro tipo de marcadores moleculares (por ejemplo SNP), capaces de superar los problemas técnicos asociados al uso de microsatélites.

## **CONCLUSIONES**

Para el total de veinte microsatélites putativos analizados en este trabajo, sólo ocho (ME1, ME10, ME49, MECH1, MECH3, MECH8, MT203, MT282) resultaron ser efectivamente polimórficos.

El éxito en la utilización de *loci* microsatélites como marcadores moleculares, a partir de secuencias expresadas, resultó ser bajo. Solo tres de los *loci* analizados (27%) resultaron polimórficos e informativos para los estudios poblacionales y de paternidad que requería este trabajo. Este bajo porcentaje no es sorprendente al provenir de regiones transcritas del genoma, explicado por una selección negativa contra mutaciones en el marco de lectura en secuencias transcritas.

La información descrita en este estudio demuestra una baja e impredecible amplificación de los partidores publicados en la literatura, atribuible a una elevada divergencia filogenética presente entre las distintas especies del género *Mytilus*. Del total de microsatélites analizados, sólo cinco mostraron amplificación robusta, resultando ser efectivamente polimórficos. Sin embargo, es importante considerar que existe ausencia de equilibrio de Hardy-Weinberg en todos los *loci*, explicado por un déficit de heterocigotos. Tales deficiencias han sido ampliamente reportadas en moluscos bivalvos ya sea por una elevada frecuencia de alelos nulos o por el fenómeno de subestructuración genética propio del mejillón chileno.

Al analizar el tipo de herencia, cinco *loci* (ME49, MECH3, MECH8, MT203, MT282) se ajustaron a un modelo de segregación mendeliana en ambas familias, y pueden ser usados en posteriores estudios poblacionales y análisis de parentesco. Al considerar la presencia de alelos nulos, dos *loci* (ME1, ME10) segregaron en forma mendeliana. El *locus* restante (MECH1) no segregó según las leyes propuestas por Mendel. Estos resultados indican la necesidad de testear el modo de herencia en marcadores microsatélites, antes de ser usados.

El porcentaje de individuos asignados a ambos padres, por medio del set de ocho microsatélites, fue alto (con niveles de confianza del 80%). Sin embargo al aumentar el nivel de confianza no hubo asignaciones efectivas. Tales resultados demuestran la necesidad de desarrollar un set de marcadores para este propósito.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer todo el apoyo brindado por el equipo de personas que conforman el Laboratorio de Investigaciones en Biotecnología y Genómica Animal (FAVET-INBIOGEN), tanto al Dr. Víctor Martínez, Ana Jedlicki, jefa de laboratorio, como a cada uno de los alumnos de pregrado y doctorado, por su constante ayuda no sólo en el área académica sino que también por la confianza y calidez con la que fui recibida.

El desarrollo de este trabajo fue posible gracias al financiamiento del proyecto 07CN13PPD-240 INNOVA CHILE y a la gentileza del equipo de trabajo del *Hatchery* de Invertebrados Marinos de la Universidad Austral de Chile, quienes fueron los encargados de producir y proveer las familias de choritos.

Finalmente me gustaría agradecer todo el apoyo brindado por mi familia, y en especial la ayuda otorgada por mis padres quienes han sido la piedra angular de todo mi desarrollo personal y profesional, ya que gracias a sus constantes incentivos y motivaciones es que hoy puedo dar fin a esta gran etapa.

## REFERENCIAS

1. ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; BRAVO, R.; ISEA, W.; VILLASMIL, Y.; JORDANA, J. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. 13(1):1-6.
2. BOTSTEIN, D.; WHITE, R.; SKOLNIK, M.; DAVIS, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics. 7:359-362.
3. BRIGGS, JC. 1987. Antitropical distribution and evolution in the Indo-West Pacific Ocean. Systematic Zoology. 36:237-247.
4. CHAPUIS, M.; ESTOUP, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. Molecular Biology and Evolution. 24(3):621-631.
5. CHILE. Subsecretaría de Pesca, 2008. Informe Ambiental de la Acuicultura (2005-2006).
6. FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. 1996. Introduction to Quantitative Genetics, 4<sup>th</sup> ed. Longman, Harrow, Essex, UK.
7. GARDESTROM, J.; PEREYRA, R.; ANDRÉ, C. 2008. Characterization of six microsatellite *loci* in the Baltic blue mussel *Mytilus trossulus* and cross-species amplification in North Sea *Mytilus edulis*. Conservation Genetics. 9:1003-1005.
8. GENEPOP ON THE WEB. 2011. Hardy Weinberg Exact Tests. [en línea]. <<http://genepop.curtin.edu.au/>>. [consulta: 05-12-2011].
9. GERALD, K.; BIERNE, N.; BORSA, P.; CHENUIL, A.; FERAL, J. 2008. Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. mussels from Northern and

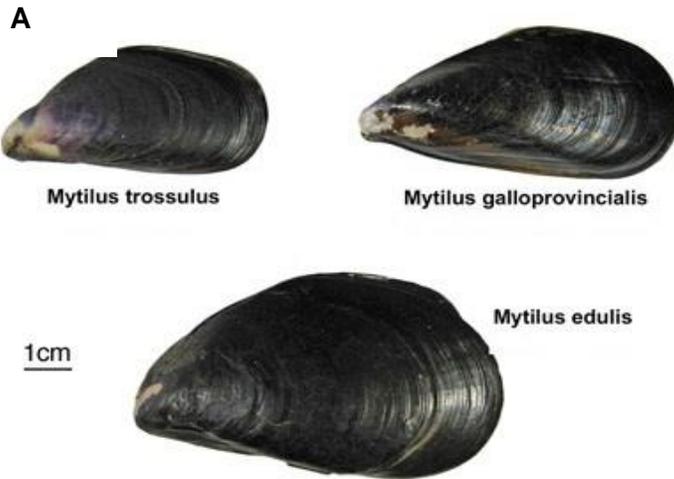
Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 49:84-91

10. GUO, S.; THOMPSON, E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*. 48:361-372.
11. HERLIN, M.; TAGGART, J.; MACANDREW, B.; PENMAN, D. 2007. Parentage allocation in a complex situation: A large commercial Atlantic cod (*Gadus morhua*) mass spawning tank. *Aquaculture*. 272: S195-S203.
12. HANDBOOK OF BIOLOGICAL STATISTICS ON THE WEB. 2012. Fisher's exact test of independence. [en línea]. <<http://udel.edu/~mcdonald/statfishers.htm>>. [consulta: 26-09-2012].
13. HUPE, L. 1854. Moluscos *In Gay*. Historia física y política de Chile. *Zoología*. 8:1-500.
14. IFOP. 2010. Recurso de Acuicultura Chorito. [en línea]. <<http://www.ifop.cl/chorito.html>>. [consulta: 13-12-2010].
15. JAMIESON, A.; TAYLOR, ST. C. S. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*. 28:397-400.
16. KALINOWSKI, ST.; TAPER, ML.; MARSHALL, TC. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. 16:1099-1006.
17. LI, H.; LIANG, Y.; SUI, L.; GAO, X.; HE, C. 2011. Characterization of 10 polymorphic microsatellite markers for Mediterranean blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by EST database mining and cross-species amplification. *Journal of Genetics*. 90:30-33.
18. LI, Q.; PARK, C.; KOBAYASHI, T.; KIJIMA, A. 2003. Inheritance of Microsatellite DNA markers in the Pacific Abalone *Haliotis discus hannai*. *Marine Biotechnology*. 5: 331-338.
19. MACAVOY, E.; WOOD, A.; GARDNER, J.; Development and evaluation of microsatellite markers for identification of individual Greenshell™ mussels (*Perna canaliculus*) in a selective breeding programme. 2008. *Aquaculture*. 274(1):41-48.

20. MARSHALL, T.; SLATE, J.; KRUIK, L.; PEMBERTON, J. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 7:639-659.
21. MICRO-CHECKER ON THE WEB. 2012. Inbreeding corrected null estimator. [en línea]. < <http://www.microchecker.hull.ac.uk/> >. [consulta: 8-10-2012].
22. NGUYEN, T.; HAYES, B.; GUTHRIDGE, K.; RAHIM, E.; INGRAM, B. 2011. Use of a microsatellite-based pedigree in estimation of heritabilities for economic traits in Australian blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 128:482-490.
23. OUAGAJJOU, Y.; PRESA, P.; ASTORGA, M.; PEREZ, M. 2011. Microsatellites of *Mytilus chilensis*: a genomic print of its taxonomic status within *Mytilus* sp. *Journal of Shellfish Research*. 30(2):325-330.
24. PRESA, P.; PÉREZ, M.; DIZ, A. 2002. Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus spp.*). *Conservation Genetics*. 3:441-443.
25. SCHROEDER, L. Representantes de las especies del género *Mytilus* [fotografía]. Pacific Northwest Shell Club, Washington (PNWSC).
26. SCHUELKE, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*. 18:233-234.
27. TORO, J.; OJEDA, J.; VERGARA, A. 2004. The genetic structure of *Mytilus chilensis* (Hupé 1854) populations along the Chilean coast based on RAPDs analysis. *Aquaculture Research*. 35:1466-1471.
28. TORO, J.; OJEDA, J.; VERGARA, A.; CASTRO, G.; ALCAPAN, A. 2005. Molecular characterization of the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) demonstrates evidence for the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* in southern Chile. *Journal of Shellfish Research* 24(4):1117-1121.
29. TORO, J.; CASTRO, G.; OJEDA, J.; VERGARA, A. 2006. Allozymic variation and differentiation in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis*, along its natural distribution. *Genetics and Molecular Biology*. 29(1):174-179.

30. URIARTE, M. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. **In:** Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller técnico regional de la FAO. Puerto Montt, Chile. 20-24 agosto 2007. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. 12: 61-75.
31. VAN OOSTERHOUT, C.; WEETMAN, D.; HUTCHINSON, F. 2006. Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology*. 6:255-256.
32. VERMEIJ, G.J. 1992. Trans-equatorial connections between biotas in the temperate eastern Atlantic. *Marine Biology*. 112:334-348.
33. VIDAL, R.; PEÑALOZA, C.; URZÚA, R.; TORO, E. 2009. Screening of ESTs from *Mytilus* for the detection of SSR markers in *Mytilus californianus*. *Molecular Ecology*. 5:1409-1411.
34. WATTIER, R.; ENGEL, R.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; VALERO, M. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite *loci*: experimental evidence at the dinucleotide *locus* Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology*. 7:1569-1573.
35. ZHAN, A.; BAO, Z.; WANG, X.; HU, J. 2005. Microsatellite markers derived from bay scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags. *Fisheries Science*. 71:1341-1346.

## ANEXO 1

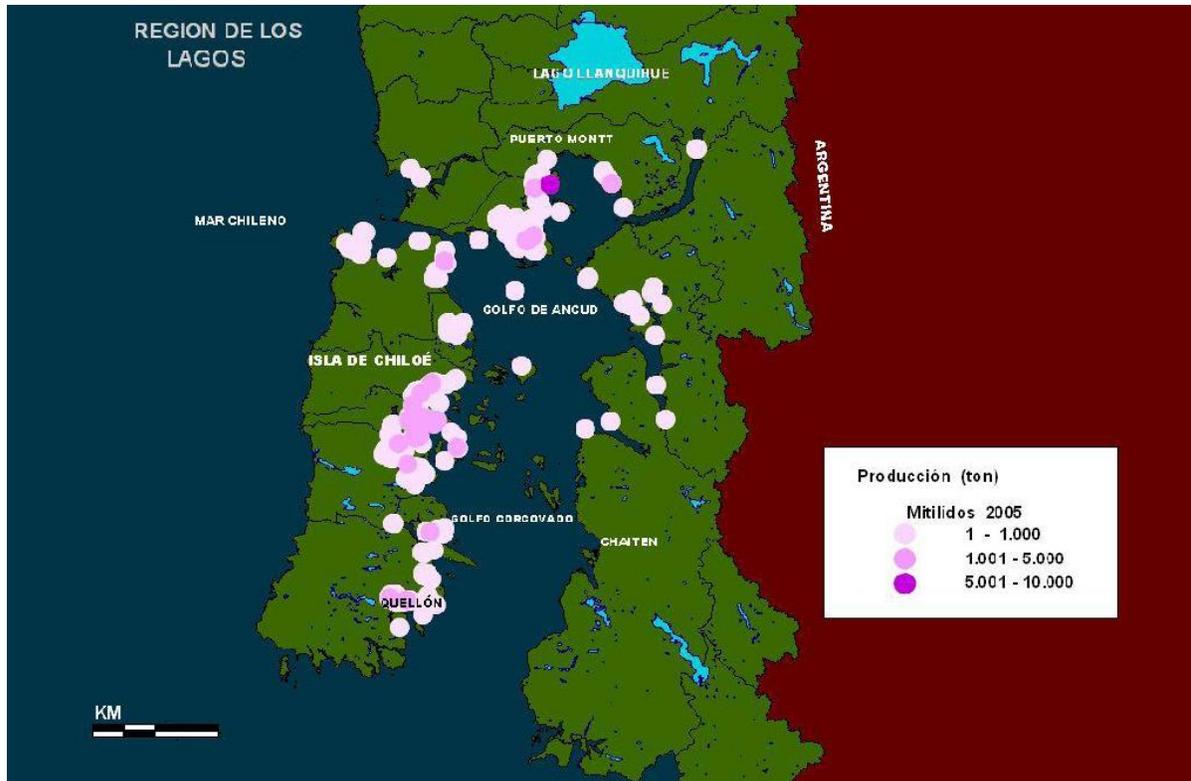


**B**      **Chorito (mejillón) (*Mytilus chilensis*,  
Hupe 1854)**



**Figura 1.** Representantes de las especies del género *Mytilus*. **A.** Especies presentes en Europa. Fuente: Pacific Northwest Shell Club, Washington (PNWSC) [25]. **B.** Chorito chileno (*Mytilus chilensis*) [30].

## ANEXO 2



Distribución espacial de la producción anual en centros de cultivo de mitilidos, año 2005 [5].

## ANEXO 3

Programa de PCR utilizado en la amplificación de los 20 Ms descritos: 1 ciclo de 7 minutos de denaturación inicial a 94°C, seguido por 21 ciclos consistentes en: 94°C por 30 segundos, 60°C (-0,5 por ciclo) por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; luego 20 ciclos con un patrón de 94°C por 35 segundos, 53°C por 55 segundos y 72°C por 30 segundos, finalmente un ciclo de extensión final a 72°C por 30 min.



