



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE *MYTILUS CHILENSIS* UTILIZANDO MARCADORES
MICROSATELITES”**

CARLA DANIELA URIBE PALACIOS

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva Animal**

PROFESORA GUÍA: MARÍA ANGÉLICA LARRAÍN BARTH

SANTIAGO, CHILE

2014



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE *MYTILUS CHILENSIS* UTILIZANDO MARCADORES
MICROSATELITES”**

CARLA DANIELA URIBE PALACIOS

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva Animal**

Nota Final:

	Calificación	Firma
Profesora Guía: M^a Angélica Larraín Barth
Profesora Consejera: Pilar Oviedo Hannig
Profesor Consejero: Mario Maino Menéndez

SANTIAGO, CHILE

2014

Esta Memoria de Título forma parte del Proyecto de Investigación “Evaluación y Optimización de los Factores que Influyen en la Inocuidad de Alimentos en base a Recursos Marinos y Desarrollo de los Alimentos Funcionales, Componentes o Subproductos de Éstos”, financiado por el Programa Domeyko Alimentos de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile 2008- 2010.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento, a mi profesora guía Dra. María Angélica Larraín B., que siempre me apoyó y me orientó en la realización de esta memoria de título.

Agradezco al Dr. Cristián Araneda T., por permitirme realizar la parte práctica de esta memoria de título en el laboratorio de Genética y Biotecnología en Acuicultura, de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile, agradezco a todas las personas que trabajan en el laboratorio y tesisistas, en especial a Claudio Pérez y Carlos Vargas, por sus consejos y ayuda en la parte práctica de esta tesis.

Agradezco a mi familia y amigos, que han estado conmigo durante esta etapa.

RESUMEN

Los mejillones son uno de los bivalvos más cultivados y comercializados siendo el género *Mytilus* muy empleado en alimentación. En Chile, la producción de mejillones ha experimentado un crecimiento importante en la última década, siendo uno de los productos acuícolas chilenos más promisorios, cuyo desembarque se destina principalmente al mercado de exportación. El comercio internacional de productos del mar incorpora en normativas y regulaciones el concepto de cadena alimentaria o “de la granja a la mesa”, buscando la inocuidad alimentaria desde la producción primaria hasta el consumidor final. Los sistemas de trazabilidad administrativa (etiquetas, registro de información, tratamiento automático de datos) no son infalibles y requieren ser validados mediante métodos analíticos. En trazabilidad de alimentos pueden considerarse tres niveles: identificación de la especie, determinación del origen geográfico y seguimiento a través de la cadena de producción y abastecimiento.

El objetivo general de esta tesis fue estudiar la diversidad genética y estructura poblacional de *Mytilus chilensis* en el Sur de Chile usando marcadores microsatélites (SSR) y evaluar su desempeño en futuras aplicaciones en trazabilidad. Las muestras se colectaron en el Sur de Chile en once localidades. La diversidad genética y estructura poblacional de *Mytilus chilensis* fue evaluada con tres loci microsatélites. Se evaluó el desempeño del algoritmo de asignación implementado en el programa GeneClass2.

La estructura poblacional de *Mytilus chilensis* en la zona fue baja ($F_{ST}= 0,03$) pero significativa ($P=0,00$), con altos niveles de flujo genético entre las localidades. El método de asignación ubicó correctamente más individuos de los esperados por azar, confirmando la estructura poblacional. Se verificó la trazabilidad administrativa, pero es necesario mejorar la probabilidad de asignación incluyendo en el panel loci no afectados por alelos nulos así como también otro tipo de marcadores (SNPs), para mejorar la resolución y alcanzar estándares forenses.

2. INTRODUCCIÓN

La mitilicultura es la segunda industria acuícola nacional y el país es el cuarto productor a nivel mundial (Mundo Acuícola Pesquero, 2013). Actualmente, existe una preocupación mayor y demanda de información por parte de los consumidores sobre la calidad de los alimentos que consume, esta se define como el grado en que un conjunto de características inherentes cumple con los requisitos (ISO 9000, 2005). En particular se debe garantizar la inocuidad, es decir, que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparan y/o consumen de acuerdo con el uso al que se destinan (*Codex alimentarius*, 2003). Cuando ocurre un caso o un brote de ETA (enfermedad transmitida por alimentos), se hace imprescindible identificar el producto o el alimento que originó el problema, con el objeto de tomar las acciones correctivas necesarias para evitar que ocurran nuevos casos. Es importante que todos los actores involucrados en la cadena alimentaria, tanto la industria, distribuidores, entidades reguladoras y los consumidores, estén en constante comunicación para tomar decisiones en conjunto y de manera rápida frente a una crisis alimentaria.

Para asegurar la calidad y la inocuidad de los alimentos, se utilizan los sistemas de trazabilidad. Hoy en día, el único medio de seguir la trazabilidad depende del etiquetado, que contiene la información del producto y que viaja físicamente con él. El problema de este método es que las etiquetas pueden desprenderse, dañarse o ser adulteradas. Para evitar estos inconvenientes se recomienda disponer de métodos que permitan verificar la eficacia del sistema de trazabilidad administrativa y la información contenida en la etiqueta relativa al origen geográfico. Para esto, en otros alimentos como carnes (Dalvit *et al.*, 2008) y aceite de oliva (Agrimonti *et al.*, 2011), se han utilizado marcadores genéticos del tipo microsatélite como un método para verificar los sistemas de trazabilidad de tipo físico.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Mytilus chilensis* (*M. chilensis*)

M. chilensis pertenece a la clase Bivalvia y familia *Mytilidae*, posee una concha de dos valvas, de forma alargada y tamaño mediano (máximo 85 mm), provista de estrías concéntricas de crecimiento y de color pardo, negruzco o violáceo. En Chile, los chorritos (*M. chilensis*), se encuentran en forma natural desde Iquique hasta el Estrecho de Magallanes, en zonas de baja salinidad especialmente en sectores estuarinos-salobres, donde se mezcla el agua dulce con el agua de mar (Clasing *et al.*, 1998).



Figura 1: *Mytilus chilensis*.

A nivel mundial existen tres especies reconocidas dentro del género *Mytilus*: *M. edulis*, *M. trossulus* y *M. galloprovincialis*. La distribución de las especies mencionadas anteriormente en el hemisferio norte se encuentra bien definida (Gérard *et al.*, 2008), pero no sucede así en el hemisferio sur. Lamy (1936) basándose en aspectos morfológicos

reconoció otras especies además de las tres mencionadas, entre ellas a *M. chilensis* Hupe (1854) como especie distinta de las anteriores, distribuida en las costas de Chile.

El estatus taxonómico de *M. chilensis* ha sido controversial por décadas debido a su proximidad fenotípica y genética con otras especies del género *Mytilus* de ambos hemisferios. Toro (1998) sugiere el estatus de *M. edulis chilensis*, Cárcamo (2005) basándose en 30 loci de alozimas propuso *M. galloprovincialis chilensis*. Trabajos más recientes sugieren que *M. chilensis* es una especie diferente y válida dentro del género (Ouagajjou *et al.*, 2011; Seguel, 2011), pero otros autores proponen el estatus de *M. edulis platensis* d'Orbigny 1846 (Borsa *et al.*, 2012).

El mejillón chileno o chorito posee sabor, color y textura altamente apetecidos en el extranjero, de ahí que su principal mercado sea el internacional, que lo consume de manera congelada, en conserva y refrigerada (Aqua, 2011).

3.2 Mitilicultura en Chile

En Chile, la alta presión extractiva de mitílidos entre 1940 y 1960, produjo un agotamiento de los bancos naturales, lo que motivó al Estado a fomentar el cultivo de estas especies, el que se inició en 1943 en el litoral del archipiélago de Chiloé. En la actualidad, la producción nacional de choritos proviene casi en su totalidad de centros de cultivo (Barrera, 2009).

El cultivo de mitílidos o mitilicultura en Chile es una actividad que ha experimentado un importante desarrollo, situando al país entre los cuatro primeros productores mundiales después de China, Tailandia y España (Aqua, 2011). En el anuario estadístico de pesca se informó para el año 2011 un desembarque de 288.995 toneladas de choritos provenientes de centros de cultivos (Sernapesca, 2012a).

Chile tiene un bajo consumo per cápita de choritos, comparado con otros países, como por ejemplo España. Por ello el crecimiento sostenido que en los últimos años ha experimentado la mitilicultura en Chile ha impulsado al sector a orientarse hacia la exportación, diversificando su producción, buscando nuevos nichos de mercado para posicionar al chorito o mejillón chileno como uno de los mejores productos marinos a nivel mundial. En la actualidad se exporta principalmente el producto congelado (52%) y en menor medida el fresco refrigerado (38%), el principal destino del mejillón chileno es España, seguido de Francia, Italia, Estados Unidos y Reino Unido (Aqua, 2011). Para

ingresar a estos mercados, es necesario que las empresas productoras de alimentos incorporen programas de aseguramiento de inocuidad y calidad.

3.3 Inocuidad y Calidad

Inocuidad de los alimentos es la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso al que se destinan (*Codex alimentarius*, 2003). Los peligros que pueden afectar la inocuidad de los alimentos pueden ser de tipo físico, biológico o químico.

HACCP es un sistema para evaluar los peligros y establecer sistemas de control que se centren en la prevención, en lugar de basarse principalmente en el ensayo del producto final (Nch 2983, 2011).

En el caso de los choritos, la presencia de peligros de tipo biológico como *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Norovirus*, y peligros de tipo químico como metales pesados (cadmio, plomo y mercurio) pueden causar un daño al consumidor. Frente a lo anterior, es que se han implementado sistemas de control basados en prevención, como HACCP (Sernapesca, 2012b). Un peligro químico que tiene una gran importancia en moluscos bivalvos son las toxinas marinas, producidas durante el fenómeno de Marea Roja o FAN (Floraciones Algales Nocivas), como se conoce en la actualidad. Es un fenómeno natural producido por el incremento numérico de microalgas que producen sustancias tóxicas (toxinas marinas), con efectos negativos en la salud pública cuando los niveles sobrepasan el límite permitido. Las toxinas marinas se acumulan en los tejidos de los moluscos bivalvos, debido a su forma de alimentación, que es la filtración. Las principales toxinas en Chile son el Veneno Paralítico de Moluscos (VPM), Veneno Diarreico de Moluscos (VDM) y el Veneno Amnésico de Moluscos (VAM) (Sernapesca, 2012b).

Por lo anterior, Sernapesca ha implementado el Programa de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PSMB) tendiente al control sanitario de este tipo de productos, que considera el monitoreo de las áreas de extracción y/o el análisis de toxinas marinas en productos elaborados, previo a la exportación (Sernapesca, 2012c).

Para la validación del plan HACCP u otro sistema de trazabilidad administrativa, es necesario contar con herramientas analíticas y evidencias objetivas para identificar a que

localidad pertenecen los individuos, y así hacer un seguimiento completo a lo largo de la cadena alimentaria de este alimento.

Las características de calidad de un producto o alimento son todas aquellas que hacen que el cliente lo prefiera. Una de estas características, es la Denominación de Origen (DO). DO es la denominación geográfica de un país, región o localidad que sirve para designar un producto como originario y cuya calidad o reputación se deben exclusiva o esencialmente al medio geográfico, comprendidos los factores naturales y los factores humanos (OMPI, 2010 <http://www.wipo.int/lisbon/es/general/>). Un ejemplo de DO en mejillones, era la que poseía el mejillón gallego. A nivel nacional, se ha ido avanzando con este tema, y se ha logrado desarrollar la marca sectorial “Patagonia Mussel”, que no es una DO, pero permite darle una imagen a nivel internacional al mejillón chileno o chorito.

Otro concepto, que es considerado como una característica de calidad, es el desarrollo sostenible. En el sector agrícola, forestal y pesquero, el desarrollo sostenible se propone conservar las tierras, el agua, los recursos fitogenéticos y zoogenéticos, sin degradar el medio ambiente, mediante una tecnología de producción apropiada y con medios económicamente viables y aceptables para la sociedad de las comunidades interesadas (FAO, 2003).

Tanto para asegurar la inocuidad, como la calidad de un alimento, es de importancia la implementación de la trazabilidad, a lo largo de toda la cadena alimentaria.

3.4 Trazabilidad

Trazabilidad o rastreabilidad es la capacidad para seguir el desplazamiento de un alimento a través de una o varias etapas especificadas de su producción, transformación y distribución (*Codex alimentarius*, 2006).

En trazabilidad de alimentos, se pueden considerar tres niveles diferentes: Identificación de la especie, determinación del origen geográfico y seguimiento a través de la cadena alimentaria (Ogden, 2008). Un sistema de trazabilidad eficaz contribuye a prevenir fraudes, etiquetado incorrecto, proporciona un método efectivo para establecer y manejar los peligros alimentarios, facilita los procedimientos de retiro y contribuye a lograr la confianza del consumidor en la inocuidad y calidad del alimento.

La trazabilidad representa una herramienta esencial para proteger la salud pública y animal, y valorizar los sistemas de producción típicos, por lo que es exigida por los mercados internacionales de EE.UU. y UE. Diferentes normas (*Codex alimentarius*, 2003; NCh-ISO.22000:2007) y reglamentos tanto de Europa (CE.Nº178/2002) como de Estados Unidos (“Ley de seguridad de la salud pública y preparación y respuesta ante el bioterrorismo” o Ley de Bioterrorismo (FDA, 2004), *Mandatory Country of Origin Labeling Law of Fish and Shellfish* (USDA, 2004), y *Guide for the control of Molluscan shellfish – National Shellfish Sanitation Program* (FDA, 2007)) exigen el establecimiento de un sistema de trazabilidad de los alimentos. Se espera que tanto la Unión Europea como Estados Unidos vayan haciendo cada vez más exigentes y específicas las regulaciones relativas a inocuidad, calidad, etiquetado y trazabilidad de alimentos, además que otros países desarrollados como Canadá y Japón establezcan sus propios requisitos para la importación de alimentos de origen animal.

Los sistemas de trazabilidad actuales se basan en documentos y registros en papel, los cuales pueden dañarse o ser falsificados o adulterados. La implementación de este sistema de trazabilidad de tipo físico no previene el fraude contra los consumidores. Se requiere de herramientas analíticas para verificar y auditar los sistemas de trazabilidad física o administrativa (Dalvit *et al.*, 2007).

Por lo anterior, algunos investigadores están realizando estudios de sistemas de trazabilidad genética basados en identificación y análisis de variaciones en el DNA. De hecho, el DNA es prácticamente inalterable, está presente en casi todas las células, es detectable en bajas cantidades, parcialmente resistente a tratamientos usuales de procesamiento de alimentos, y permite la identificación de individuos, razas o especies, aún en alimentos elaborados (Dalvit *et al.*, 2007).

La determinación del origen geográfico puede realizarse mediante el análisis de DNA. Los marcadores moleculares y su aplicación han llegado a transformarse en una poderosa herramienta, encontrando su utilización en áreas como la trazabilidad de alimentos.

3.5 Marcadores Moleculares - Microsatélites

Los marcadores moleculares corresponden a un conjunto de técnicas que permiten visualizar o indicar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de mutación establecida en regiones del DNA a través del tiempo evolutivo (Astorga, 2007).

Un tipo de secuencias de DNA repetidas una tras otra y presentes en los genomas de todos los organismos, son los llamados microsatélites o secuencias repetidas simples (SSR, su sigla en inglés), que corresponde a repeticiones de motivos cuyo tamaño fluctúa entre uno a seis nucleótidos de longitud. El polimorfismo detectado por un marcador microsatélite corresponde a variaciones en el número de repeticiones del motivo del microsatélite. Estas secuencias, al ser amplificadas por PCR, se pueden utilizar como un marcador molecular, siendo una de sus características principales la codominancia (se distinguen los individuos homocigotos de los individuos heterocigotos). Otra característica de los marcadores microsatélites es que son altamente polimórficos, es decir, pueden presentar muchos alelos por locus (Araneda, 2005).

El aislamiento y desarrollo de microsatélites puede ser técnicamente muy complejo y laborioso, de modo que, se pueden usar partidores “heterólogos” aislados de especies evolutivamente cercanas y transferirlos a la que es objeto del estudio. A pesar del interés comercial en los mitílidos, solo un número limitado de marcadores microsatélites se han desarrollado en *Mytilus sp.* (Vidal *et al.*, 2009).

En la actualidad, dada la importancia de la industria mitilicultora y la necesidad de control y trazabilidad, se requiere de estudios con marcadores moleculares en esta especie, para conocer su diversidad genética y estructura poblacional (Barrera, 2009). Hasta ahora, estas técnicas son costosas para usarse en ensayos rutinarios, pero son una herramienta confiable para la verificación y validación del sistema documental o frente a la sospecha de fraude.

3.6 Diversidad Genética y Estructura Poblacional

La diversidad genética se refiere a la variación de los genes de las especies, es decir, a la variación dentro y entre poblaciones de organismos. La diversidad genética es el resultado de la selección, la mutación, la migración, la deriva genética o la recombinación (solas o en conjunto). Estos fenómenos ocasionan cambios en las

frecuencias génicas y genotípicas, lo que en el largo plazo conduce a la evolución de las especies (de Vicente *et al.*, 2004).

Utilizando marcadores moleculares, la diversidad genética se mide usualmente a través de las frecuencias de los genotipos y alelos, proporción de loci polimórficos y heterocigosidad observada y esperada (Toro *et al.*, 2009).

La estructura poblacional o subdivisión de la población, surge cuando ocurren restricciones al flujo génico dentro de la población debido a agentes tales como barreras ambientales o distancia geográfica, generando desviaciones de la panmixia (cruzamientos al azar) y así, produciendo pérdida de la diversidad genética por deriva y formación de subpoblaciones. En estas subpoblaciones ocurre una fijación más rápida de alelos y existe una heterocigosidad menor que la de la población no dividida.

Los estadísticos F de Wright (1965) describen la partición de la diversidad genética en la población a diferentes niveles jerárquicos. En función de las frecuencias alélicas Wright definió tres estadísticos: F_{IS} es la deficiencia o el exceso de heterocigotos promedio en cada población, F_{ST} es el grado de diferenciación genética entre las poblaciones y F_{IT} es la deficiencia o el exceso de heterocigotos en una metapoblación (es decir, una población que está dividida en subpoblaciones) (de Vicente *et al.*, 2004).

Otra forma de describir la estructura poblacional es la distancia genética, que es una medida que expresa la similitud o diferencia entre individuos o poblaciones, ya que cuanto más parecidas sean las frecuencias génicas de dos poblaciones, el grado de diferenciación entre ellas será menor (Larraín, 2012).

3.7 Asignación de individuos a localidades

La asignación de individuos a localidades se realiza basándose en la probabilidad de que el genotipo multilocus del individuo se encuentre en una localidad dada (Larraín, 2012).

Los métodos de asignación usan la información genética para establecer la pertenencia de individuos, ya sea a localidades predeterminadas o a grupos no definidos previamente (Manel *et al.*, 2005). Para hacer la asignación a la localidad de la cual el individuo fue muestreado, se han desarrollado métodos estadísticos basados en probabilidad, que utilizan criterios de distancia genética, de frecuencia del genotipo en la

localidad y bayesianos. Estos tres procedimientos se basan en calcular el criterio correspondiente en todos los integrantes incluidos en el grupo de datos, sin considerar el individuo que se está asignando dentro de la población al hacer el cálculo (Piry, 2004).

De los antecedentes expuestos se desprende la necesidad de contar con herramientas analíticas que permitan verificar los sistemas de trazabilidad administrativa de *M. chilensis* en el Sur de Chile. Consecuentemente, es necesario estudiar la diversidad genética y la estructura poblacional de esta especie en el Sur de Chile, utilizando marcadores moleculares microsatélites.

4. HIPÓTESIS

La diversidad genética y la estructura poblacional de *M. chilensis* determinada utilizando marcadores microsatélites, permite establecer su origen geográfico y trazabilidad.

5. OBJETIVO GENERAL

Estimar la diversidad genética y la estructura poblacional de *M. chilensis* en el Sur de Chile utilizando tres loci microsatélites y asignar individuos a localidades para comprobar el origen geográfico y el sistema de trazabilidad.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar la diversidad genética determinando las frecuencias alélicas y genotípicas.
2. Estimar la estructura poblacional utilizando el índice de fijación F_{ST} y distancia genética.
3. Asignar individuos a localidades para comprobar el origen geográfico y el sistema de trazabilidad.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Muestras

El lugar de realización del trabajo experimental fue en el Laboratorio de Genética y Biotecnología en Acuicultura, del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agronómicas, de la Universidad de Chile.

Las muestras provienen de un estudio previo y habían sido obtenidas desde once localidades en el Sur de Chile (1-Piedra Azul, 1-Canutillar, 1-Caleta La Arena, 1-Pichicolo, 1-Estero Chauquiar, 1-Canal Caicaén, 1-Estero Chope, 1-Canal Chidguapi, 2-Canal Coldita-Patagonia, 2-Canal Coldita-Piedra Blanca y 3-Isla Peel), ubicadas entre la Región de Los Lagos y la Región de Magallanes y la Antártica Chilena, en los meses de Febrero a Junio de 2009 (Figura 2). Estas once localidades incluyen un banco natural, cinco centros de captación de semillas y cinco centros de engorda. De los registros de los centros de engorda, se obtuvo la información del origen de las semillas y la fecha de siembra. En cada lugar de extracción se obtuvieron 50 individuos. Los ejemplares de longitud menor o igual a 2,5 cm se consideraron como “semillas” y los de longitud superior como “adultos” (Tabla 1). Anteriormente, se habría realizado la identificación de género y de especie con la metodología descrita en Larraín (2012) para descartar la presencia de individuos de otros géneros y especies en las muestras obtenidas.

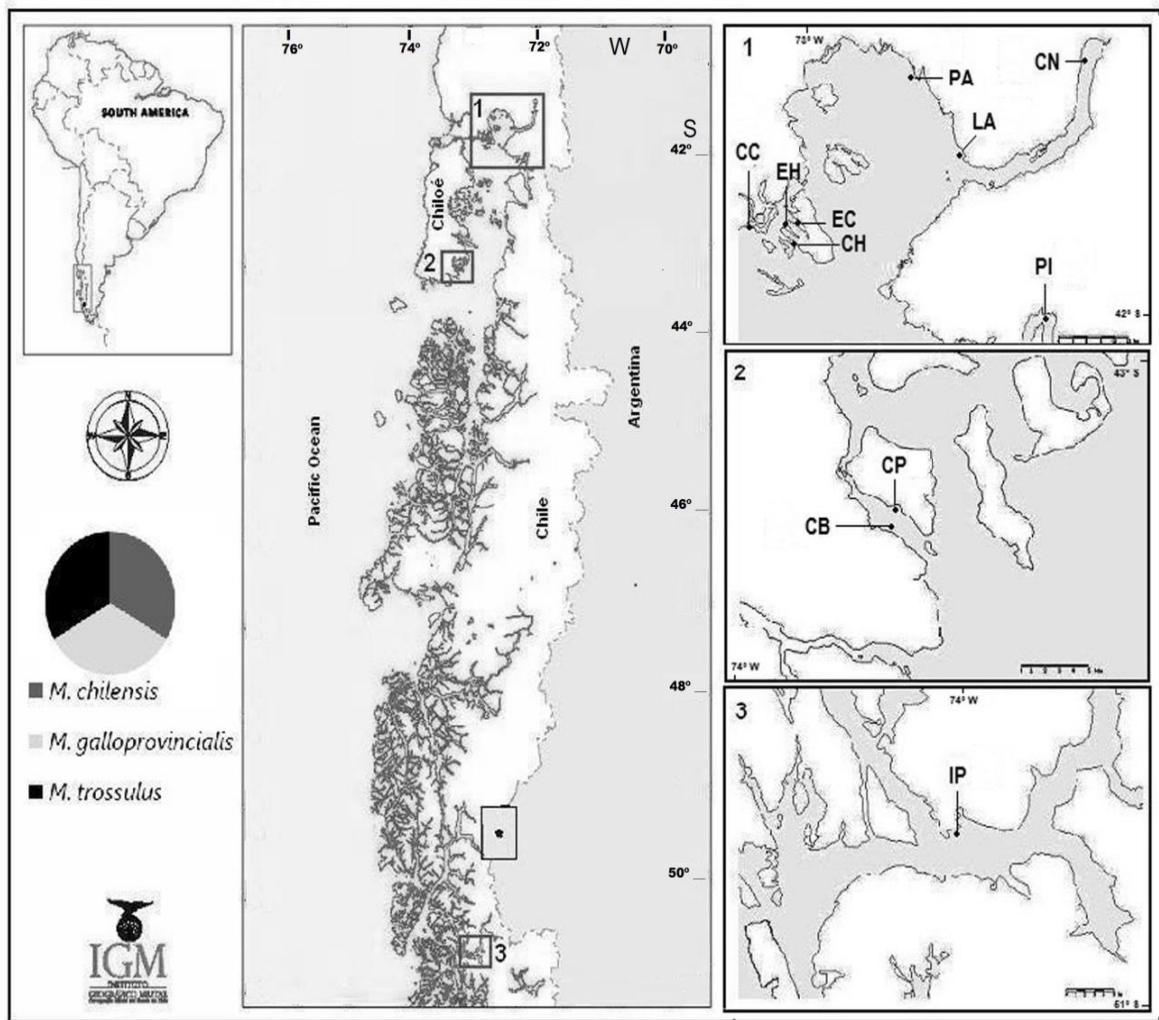


Figura 2: Ubicación de las localidades muestreadas en el Sur de Chile. 1-PA: Piedra Azul, 1-CN: Canutillar, 1-LA: Caleta La Arena, 1-PI: Pichicolo, 1-EC: Estero Chauquiar, 1-CC: Canal Caicaén, 1-EH: Estero Chope, 1-CH: Canal Chidguapi, 2-CP: Canal Coldita-Patagonia, 2-CB: Canal Coldita-Piedra Blanca, 3-IP: Isla Peel.

Tabla 1: Datos de las muestras (n = 50).

Código	Localidad <i>Latitud Sur/Longitud Oeste</i>	Origen de la Muestra	Fecha de Comienzo de Cultivo	Fecha de Muestreo	Estado de Desarrollo
3-IP	Isla Peel 50° 50' 29,83"/74° 00' 41,27"	Banco Natural	-	16-02-2009	Adulto
1-PA	Piedra Azul 41° 32' 55,35"/72° 46' 14,35"	Centro de Captación de Semilla	-	24-06-2009	Semilla
1-PI	Pichicolo 42° 02' 23,76"/72° 35' 27,17"	Centro de Captación de Semilla	-	24-06-2009	Semilla
1-LA	Caleta La Arena 41° 41' 00,00"/72° 40' 18,92"	Centro de Captación de Semilla	-	24-06-2009	Semilla
1-CC	Canal Caicaén 41° 47' 47,41"/73° 10' 5,55"	Centro de Engorda (LA)	29-09-2008	27-06-2009	Adulto
1-EC	Estero Chauquiar 41° 47' 29,0"/73° 04' 55"	Centro de Engorda (LA)	19-05-2009	27-06-2009	Semilla
1-CN	Canutillar 41° 31' 13,9"/72° 20' 15,69"	Centro de Captación de Semilla	-	24-06-2009	Semilla
1-CH	Canal Chidguapi 41° 49' 10,39"/73° 06' 4,29"	Centro de Engorda (CN)	07-08-2008	27-06-2009	Adulto
1-EH	Estero Chope 41° 48' 31,23"/73° 05' 27,08"	Centro de Engorda (CN)	06-06-2009	27-06-2009	Semilla
2-CB	Canal Coldita–Piedra Blanca 43° 14' 48,82"/73° 41' 42,77"	Centro de Captación de Semilla	-	25-06-2009	Semilla
2-CP	Canal Coldita–Patagonia 43° 14' 02,98"/73° 41' 37,64"	Centro de Engorda (CB)	2008	25-06-2009	Adulto

7.2 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se utilizó como base el protocolo fenol-cloroformo descrito por Taggart *et al.* (1992) y modificado por Larraín *et al.* (2012) para invertebrados.

7.3 Selección y estandarización de loci microsatélites

Se seleccionaron once parejas de partidores (Anexo 1): dos parejas para *M. galloprovincialis*, una pareja para *M. californianus* y dos parejas para *M. edulis* descritas por Vidal *et al.* (2009); cuatro parejas descritas por Yu *et al.* (2007) para *M. galloprovincialis*; una pareja de partidores descrita por Lallias *et al.* (2009) para *M. edulis*; una pareja publicada por Nguyen *et al.* (2011) para *M. galloprovincialis*. Se comprobó la calidad de los partidores descritos de acuerdo a los siguientes parámetros: TM (melting temperature), %GC (enlaces guanina-citosina), estabilidad del extremo 3' y formación de dímeros. De las once parejas de partidores de PCR, se rediseñaron nueve utilizando el programa AmplifX (Jullien, 2007) (*MIT02*, *MIT05*, *MIT07*, *MIT08*, *MGE001*, *MGE005*, *MGE006*, *MGE007* y *My650*) y solo dos parejas de partidores no fue necesario rediseñarlas (*Med737* y *MIT03*).

Para la reacción de PCR la mezcla consistió en DNA de cada individuo, buffer, MgCl₂, dNTP, partidores forward y reverse, Taq DNA polimerasa (RBC Bioscience) y agua PCR (Cayman Chemical Co.). Se incluyó un control negativo sin agregar DNA a la mezcla de PCR. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Techne TC-412 (Bibby Scientific Ltd, UK) (Larraín, 2012).

Una vez ajustadas las condiciones de PCR para lograr la amplificación, los productos de PCR se resolvieron en geles de agarosa al 1,8% usando buffer TBE con 10mg·ml⁻¹ de bromuro de etidio para la detección de las bandas bajo luz ultravioleta en un transiluminador UV (Fotodyne modelo 3-3002). Para la determinación del tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador de tamaño de 50 pb (New England Biolabs). Posteriormente, los productos de PCR fueron separados en geles de acrilamida:bis-acrilamida (19:1 o 29:1) al 6%, para el locus *Med737* y para el *MGE005* se utilizaron geles de acrilamida:bis-acrilamida 19:1, y para el locus *MIT02* de 29:1. Fueron visualizados mediante tinción con plata para ácidos nucleicos (Kit BM-0860 Winkler). Para la determinación del tamaño de los fragmentos amplificados se utilizó un marcador de tamaño de 25 pb (HyperladderV-BioLine) (Larraín, 2012).

Las imágenes obtenidas de los geles de agarosa y de los geles de poli-acrilamida se registraron con una cámara fotográfica digital Nikon Coolpix 990.

Se seleccionaron tres loci microsatélites tomando en cuenta la identidad de los fragmentos, calidad de la amplificación, nitidez para la lectura de los genotipos y rango de tamaño de los alelos (100-400 pb).

Para cada locus microsatélite elegido, considerando los 550 individuos distribuidos en las once localidades, se revisaron las imágenes de los geles de poliacrilamida obtenidos, y se seleccionaron los individuos que tuvieron alelos diferentes, con el fin de incluir en un solo gel de poliacrilamida todos los alelos encontrados para el locus microsatélite utilizado, y posteriormente determinar el número y tamaño de los alelos (Larraín, 2012). La imagen de cada gel de poliacrilamida obtenido se trabajó con el programa Adobe Photoshop CS5.Extended Portable. Midiendo la distancia de migración de cada fragmento del marcador de tamaño de 25 pb y de los alelos en el gel. Con la distancia de migración del marcador de tamaño se construirá la curva de distancia relativa de migración del fragmento en el gel – R_f v/s $\text{Log} [n^\circ \text{ pares de bases}]$. Se hizo un ajuste y se obtuvo la ecuación que da cuenta de la relación anterior. Se ingresó la distancia que migraron los alelos, determinándose así su tamaño aproximado (Larraín, 2012).

De la información extraída de los geles de poliacrilamida, se obtuvo el genotipo de la mayoría de los individuos (Anexo 2), en los casos que no se logró amplificación, se repitió la reacción de PCR en dos oportunidades.

Se utilizó el programa Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.*, 2004) para detectar errores de genotipado, tales como errores en el conteo de alelos, tartamudeo y descarte de alelos grandes. Este programa utiliza el método de simulación de Monte Carlo para generar, en base a los genotipos ingresados, una distribución de frecuencias esperadas de las diferencias en el tamaño de los alelos de homocigotos y heterocigotos e informa de posibles errores de genotipado al encontrar desviaciones.

Se comprobó la segregación independiente de los loci ya que esta es una condición para los análisis poblacionales posteriores. El desequilibrio del ligamiento entre pares de loci se evaluó considerando todas las localidades y dentro de cada localidad, mediante la prueba estadística de razón de verosimilitud (prueba G) usando la simulación de Monte Carlo implementada en el programa GENEPOP 4.0.10 (Rousset, 2008).

7.4 Diversidad genética y Parentesco

Para evaluar la diversidad genética se calculó el Número de Alelos por Locus (N_a), Heterocigosidad observada (H_o) y Heterocigosidad esperada (H_e) según el equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W), y el Contenido de Información Polimórfica (PIC) en cada localidad para cada locus, usando el programa Toolkit (complemento de Excel) (Park, 2001).

La ley de H-W supone que en una población grande de individuos diploides, con cruzamientos al azar (panmixia), ausencia de selección natural, mutación y migración, las frecuencias génicas y genotípicas permanecen constantes de generación en generación. A esta condición se le conoce como equilibrio de H-W (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). El equilibrio de H-W en una población puede evaluarse para un locus cualquiera con el índice de fijación F , este también puede extenderse para responder a múltiples niveles de organización poblacional, como en una subpoblación, con el coeficiente de consanguinidad F_{IS} (Wright, 1942; Wright, 1949).

El coeficiente de consanguinidad F_{IS} se calcula: $(H_e - H_o) / H_e$. Su valor fluctúa entre 1 y -1, el valor 0 indica que la población se encuentra en equilibrio de H-W para ese locus y que no hay consanguinidad, cuando es un valor positivo indica que hay un exceso de homocigotos, y cuando el valor es negativo hay un exceso de heterocigotos. F_{IS} se estimó según Weir & Cockerham (1984) para cada locus dentro de cada localidad a través del método exacto de Fisher usando la simulación de Monte Carlo con el programa GENEPOP 4.0.10 (Rousset, 2008).

El contenido de información polimórfica (PIC) se usa frecuentemente en marcadores microsatélites para evaluar su capacidad de discriminación e indica la calidad de un marcador, su valor puede variar entre 0 y 1, indicando un mayor nivel de polimorfismo cuando el valor es más cercano a 1 (Felmer *et al.*, 2008).

La heterocigosidad multilocus no distingue entre alelos idénticos por estado o por descendencia. Para evaluar si el déficit de heterocigotos se debe a mayor consanguinidad se estimó el parentesco o proporción de alelos entre dos individuos que son idénticos por descendencia, mediante el índice r_{XY} a partir de los genotipos multilocus (Queller & Goodnight, 1989) usando el programa IDENTIX (Belkhir *et al.*, 2002), que además informa sobre la significancia de cada valor. Se obtuvo el valor de r_{XY} para cada par de individuos y se calculó el promedio dentro de cada localidad y entre pares de localidades.

7.5 Estructura poblacional

La similitud o disimilitud de los genotipos multilocus entre las localidades se visualizó en un gráfico tridimensional construido mediante análisis de correspondencia factorial (AFC) realizado en GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996).

Para evaluar la diferenciación genética y su significancia entre pares de localidades y a nivel global en la población total se usó el estadístico F_{ST} estimado según Weir & Cockerham (1984) utilizando el programa GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996). Este estadístico es apropiado para estudiar influencias de procesos demográficos como deriva génica y migración, en la estructura poblacional (Meirmans *et al.*, 2011).

En equilibrio, F_{ST} permite estimar Nm (número efectivo de migrantes) en un modelo de islas, que es uno de los métodos indirectos para estimar el flujo génico. La fórmula es: $Nm = 0,5 (1 - F_{ST}) / F_{ST}$. Valores menores a 1, predomina la deriva genética, valores mayores a 1, predomina el flujo génico.

La similitud genética entre las localidades se calculó a través de la distancia genética de Reynolds (1983), esta se ha descrito como más exacta para eventos recientes de divergencia estudiados usando microsatélites (Lenstra *et al.*, 2011), ya que no considera la mutación y depende del flujo genético. La distancia genética de Reynolds (1983) se basa en el coeficiente de coancestría (θ), que es la probabilidad de que un par de genes (A y B) en un mismo locus, tomados al azar desde una localidad en individuos diferentes, sean idénticos por descendencia, es decir, que tengan un ancestro común. La distancia genética entre dos localidades o individuos puede medirse como: $D = -\ln (1-\theta)$ (Reynolds *et al.*, 1983).

Se calculó y representó gráficamente la matriz de distancia genética en un dendrograma no enraizado que relaciona las localidades usando el algoritmo de agrupamiento Neighbor Joining con el paquete computacional PHYLIP (Felsenstein, 2005) y fue visualizado con el programa TreeView 1.6.6 (Page, 1996). La confianza de los nodos se evaluó mediante 5000 replicas de re-muestreo por medio de bootstrap.

Mediante el test de Mantel (1967) se probó aislamiento por distancia como modelo de diferenciación genética alternativo a la panmixia. Se comparó las matrices de distancia genética [$F_{ST} / (1 - F_{ST})$] con el logaritmo de la distancia geográfica, estimada como la trayectoria mínima por la línea de la costa, recomendado para un hábitat con dos

dimensiones (latitud y longitud) (Rousset, 2008). El cálculo del índice de similitud (r) se realizó en el programa GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996) y la significancia de la asociación se probó con 10.000 iteraciones.

7.6 Asignación de individuos a localidades

Se usó el criterio de frecuencia (Paetkau *et al.*, 1995), que asigna el individuo a la población donde su frecuencia alélica es más probable, aunque este método supone equilibrio de H-W dentro de las localidades, se ha descrito que en presencia de alelos nulos su desempeño es mejor que otros, como el criterio basado en distancias (Cornuet *et al.*, 1999). Este algoritmo se implementó en el programa GeneClass2 (Piry, 2004). Se seleccionó el método de verosimilitud sin probabilidad asociada para evaluar el desempeño del método de asignación, luego se realizó una prueba de reasignación de los individuos del banco natural y de los centros de captación de semillas a las localidades desde donde fueron extraídas. Para evaluar el desempeño del método de asignación se usaron los índices:

- *Sensibilidad*: calculada como el número de asignaciones correctas a la categoría j -ésima dividido por el número total de individuos de la categoría j -ésima.
- *Especificidad*: calculada como el número de individuos correctamente excluidos de la población j -ésima dividido por el número de individuos que no pertenecen al grupo j -ésimo (Altman *et al.*, 1994; Loong, 2003).
- *Razón de verosimilitud (LR+)*: calculada como sensibilidad dividida por uno menos especificidad. Este estadístico resume cuantas veces más (o menos) los individuos pertenecientes a la categoría j -ésima serán asignados a esta categoría que los individuos pertenecientes a otra categoría (Deeks *et al.*, 2004).
- *Probabilidad total de asignación a la categoría*: es el promedio de la probabilidad de cada asignación correcta a la categoría respectiva.

Para verificar la información contenida en los registros de los centros de engorda respecto del origen de sus semillas, se realizó una prueba de asignación de los individuos de los centros de engorda a las seis localidades de origen (un banco natural y cinco centros de captación de semillas). La asignación se realizó con el programa GeneClass2 utilizando el algoritmo basado en frecuencias (Paetkau *et al.*, 1995).

8. RESULTADOS

8.1 Selección y estandarización de loci microsatélites

Se obtuvo amplificación en tres de los once loci (Anexo 1), en los loci restantes no se obtuvo amplificación nítida o no hubo amplificación. Los tres loci seleccionados para este estudio fueron: el locus *Med737* (motivo repetido dinucleótido), *MIT02* (motivo repetido dinucleótido) y *MGE005* (motivo repetido trinucleótido).

Los tres loci fueron amplificados por PCR según los protocolos estandarizados en este trabajo. Las condiciones térmicas de amplificación se programaron con una denaturación inicial a 95°C por 5 min, seguida de 35 (*Med737* y *MIT02*) o 30 (*MGE005*) ciclos de amplificación, cada uno consistente en denaturación a 95°C por 1 min, hibridación a temperatura y tiempo de unión específicos (Tabla 2) y extensión a 72°C por 50 seg. Luego de concluido los 30 o 35 ciclos respectivamente, se programó una extensión final a 72°C por 10 min. El volumen total de cada reacción fue de 15 µl (Tabla 2).

Tabla 2: Mezcla de reacción, tiempo y temperatura de amplificación de los tres loci microsatélite.

	<i>Med737</i>	<i>MIT02</i>	<i>MGE005</i>
Componente [concentración]			
MgCl ₂ [mM]	2,00	2,50	2,00
dNTP [µM]	80	100	100
Partidor F y R (cada uno) [µM]	0,20	0,35	0,27
Taq [U]	0,35	0,50	0,50
DNA [ng]	40	40	40
Condiciones de alineamiento			
Temperatura [°C]	63	53	67
Tiempo [seg]	35	35	30

Los tamaños observados de los alelos fluctuaron entre 113 y 243 pb para los tres loci (Tabla 3).

Tabla 3: Condiciones de resolución, tamaño descrito y observado, número de alelos descritos y observados.

Locus	Genbank N°	Tamaño descrito (pb)	N° alelos descritos	Tamaño observado (pb)	N° de alelos observados
Med737	FJ174681	153-267	27	122-184	10
MIT02	EH663073	192-242	4	197-243	5
MGE005	AJ623869	220-244	10	113-149	10

Para el locus *Med737* se pudo genotipar 534 individuos de 550, para el locus *MIT02* se logró genotipar 540 individuos de 550, y para el locus *MGE005* 541 de 550 individuos. Usando el programa Micro-Checker no se detectaron errores de conteo ni descarte de alelos grandes, si se detectó un posible tartamudeo en el locus *Med737* en dos localidades, en Estero Chope y Caleta La Arena. El error por descarte de alelos grandes se debe a la amplificación menos eficiente o a la no amplificación del alelo de mayor tamaño, llevando a considerar como homocigoto a un individuo heterocigoto (Van Oosterhout *et al.*, 2004; Pompanon *et al.*, 2005).

El programa Micro-Checker también informó de la posible presencia y frecuencia de alelos nulos basándose en las frecuencias alélicas esperadas de acuerdo al equilibrio de H-W. Para el locus *Med737* se advirtió la posible presencia de alelos nulos en nueve localidades (Piedra Azul, Estero Chope, Canal Chidguapi, Canutillar, Canal Caicaén, Isla Peel, Canal Coldita–Piedra Blanca, Canal Coldita–Patagonia y Caleta La Arena), para el locus *MIT02* advirtió la posible presencia de alelos nulos en todas las localidades muestreadas y para el locus *MGE005* no indicó la posible presencia de alelos nulos en ninguna de las localidades.

La prueba del desequilibrio del ligamiento entre pares de loci indicó que los tres loci microsatélite analizados eran independientes.

8.2 Diversidad genética y Parentesco

Los tres loci analizados fueron polimórficos en las once localidades estudiadas (Anexo 3). Se detectaron un total de 25 alelos en los 550 individuos genotipados. El locus con mayor número de alelos fue el *MGE005*, con nueve alelos en la localidad de Piedra Azul y en la localidad de Estero Chauquiar. El locus con menor número de alelos fue el *MIT02* con tres alelos en la localidad de Canal Chidguapi. Todos los loci mostraron distribución de alelos comunes entre las localidades, encontrándose sólo un alelo privado en baja frecuencia (0,01) en el locus *MGE005*, en la localidad de Canutillar (Anexo 4). Se define alelo privado o exclusivo como un alelo que aparece sólo en una localidad de las analizadas (Li *et al.*, 2009).

El locus *Med737* tuvo un valor promedio de PIC de 0,679 siendo el valor mayor de PIC para los tres loci, para el locus *MIT02* se obtuvo un valor de 0,536 y para el locus *MGE005* de 0,322 (Tabla 5). El locus que presentó el menor valor promedio de H_o fue *MGE005* con un valor de 0,320 y el más alto fue *Med737* con un valor de 0,451, en tanto el locus *MIT02* obtuvo un valor de H_o de 0,346. En tanto los valores promedios de H_e fueron para *Med737* 0,719, *MIT02* 0,610 y para *MGE005* de 0,336 (Tabla 4).

Los valores positivos de F_{IS} observados en varios loci provocados por déficit de heterocigotos respecto a lo esperado indican desviación significativa del equilibrio de H-W en 17 de las 33 combinaciones locus-localidad, después de aplicar el Test Secuencial de Bonferroni (Rice, 1989). El locus *Med737* presentó en diez de once localidades desviación significativa del equilibrio de H-W, el locus *MIT02* en siete de once localidades, y el locus *MGE005* no presentó desviación significativa del equilibrio de H-W en ninguna de las once localidades evaluadas (Tabla 4).

Todos los valores r_{XY} de parentesco obtenidos fueron no significativos (Tabla 6).

Tabla 4: Estimadores de diversidad genética en muestras de *M. chilensis* (n=50) de once localidades.

Locus		Localidad										
		3-IP	1-PA	1-PI	1-LA	1-CC	1-EC	1-CN	1-CH	1-EH	2-CB	2-CP
Med737	n	50	50	50	50	50	50	50	50	34	50	50
	A	8	8	8	8	8	6	8	6	7	7	8
	Ho	0,500	0,480	0,600	0,420	0,400	0,560	0,340	0,200	0,382	0,560	0,500
	He	0,792	0,634	0,706	0,673	0,661	0,660	0,675	0,512	0,624	0,764	0,710
	PIC	0,758	0,595	0,650	0,630	0,611	0,606	0,628	0,457	0,576	0,719	0,646
	F _{IS}	0,371*	0,245*	0,152*	0,378*	0,397*	0,153	0,499*	0,612*	0,391*	0,269*	0,298*
MIT02	n	50	50	50	50	50	48	50	48	46	49	49
	A	5	5	5	5	5	5	4	3	4	5	5
	Ho	0,440	0,280	0,300	0,400	0,320	0,479	0,320	0,313	0,283	0,449	0,224
	He	0,613	0,609	0,635	0,580	0,624	0,639	0,593	0,559	0,565	0,666	0,547
	PIC	0,527	0,531	0,567	0,490	0,542	0,577	0,508	0,461	0,468	0,596	0,486
	F _{IS}	0,284	0,543*	0,530*	0,313	0,489*	0,252	0,462*	0,443*	0,503*	0,329	0,592*
MGE005	n	50	50	50	50	50	50	50	50	40	50	50
	A	6	9	7	7	8	9	6 (1)	7	6	8	8
	Ho	0,300	0,320	0,320	0,280	0,340	0,420	0,360	0,260	0,225	0,340	0,360
	He	0,275	0,373	0,323	0,308	0,342	0,417	0,393	0,275	0,293	0,310	0,387
	PIC	0,264	0,361	0,310	0,297	0,331	0,402	0,367	0,265	0,276	0,300	0,374
	F _{IS}	-0,093	0,143	0,011	0,092	0,005	-0,007	0,085	0,056	0,234	-0,099	0,072

*Desviación significativa del equilibrio de H-W ($P \leq 0,05$) fueron corregidos con Test Secuencial de Bonferroni, A = número de alelos, (entre paréntesis) = número de alelos privados, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada, PIC = contenido de información polimórfica, F_{IS} = índice de fijación según Weir & Cockerham. 3-IP: Isla Peel, 1-PA: Piedra Azul, 1-PI: Pichicolo, 1-LA: Caleta La Arena, 1-CC: Canal Caicaén, 1-EC: Estero Chauquiar, 1-CN: Canutillar, 1-CH: Canal Chidguapi, 1-EH: Estero Chope, 2-CB: Canal Coldita-Piedra Blanca, 2-CP: Canal Coldita-Patagonia.

Tabla 5: Estimadores de diversidad genética global por locus de *M. chilensis* (n = 550).

<i>Locus</i>	<i>A</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>F_{ST}</i>
Med737	10	0,451	0,719	0,679	0,334	0,063
MIT02	5	0,346	0,610	0,536	0,428	0,009
MGE005	10	0,320	0,336	0,322	0,044	0
Global	25	0,372	0,555	0,512	0,309	0,030

A = número de alelos, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada, PIC = contenido de información polimórfica, F_{IS} = índice de fijación de acuerdo a Weir & Cockerham, F_{ST} = índice de fijación F_{ST}.

Tabla 6: Valor promedio de parentesco (r_{xy}) entre pares de individuos resultante al comparar localidades basado en tres loci microsatélites.

	3-IP	1-PA	1-PI	1-LA	1-CC	1-EC	1-CN	1-CH	1-EH	2-CB	2-CP
3-IP	0,038	-0,068	-0,066	-0,046	-0,063	-0,103	-0,056	-0,050	-0,004	-0,009	-0,013
1-PA		0,034	0,008	0,051	0,027	0,006	0,033	0,104	0,071	-0,088	-0,037
1-PI			0,018	0,023	0,002	-0,013	0,001	0,047	0,041	-0,030	0,005
1-LA				0,045	0,035	0,012	0,039	0,106	0,090	-0,055	-0,010
1-CC					0,007	-0,005	0,013	0,092	0,055	-0,067	-0,036
1-EC						-0,035	-0,009	0,048	0,020	-0,105	-0,041
1-CN							0,006	0,078	0,070	-0,070	-0,015
1-CH								0,185	0,130	-0,055	-0,042
1-EH									0,049	-0,028	0,024
2-CB										0,020	-0,002
2-CP											0,040

3-IP: Isla Peel, 1-PA: Piedra Azul, 1-PI: Pichicolo, 1-LA: Caleta La Arena, 1-CC: Canal Caicaén, 1-EC: Estero Chauquiar, 1-CN: Canutillar, 1-CH: Canal Chidguapi, 1-EH: Estero Choque, 2-CB: Canal Coldita–Piedra Blanca, 2-CP: Canal Coldita–Patagonia.

8.3 Estructura poblacional

El análisis de correspondencia factorial (AFC) por localidades de captación de semilla y banco natural muestra la similitud de los genotipos multilocus en un gráfico tridimensional (Figura 3), que explica el 85,24% de la variación total. El 50,75% de la variación de los genotipos multilocus de los individuos entre las localidades es explicada por el eje 1, el 20,21% por el eje 2 y el 14,28% por el eje 3. La localidad de Isla Peel se

puede apreciar que está más separada de las demás localidades, y también la localidad de Canal Coldita–Piedra Blanca se encuentra separada de las otras localidades.

Al realizar el mismo análisis usando las once localidades, los tres ejes del gráfico explican el 66,42% de la variación (Figura 4). Se puede apreciar que tanto la localidad de Isla Peel como la localidad de Canal Coldita–Piedra Blanca se encuentran separadas entre ellas y de las restantes localidades.

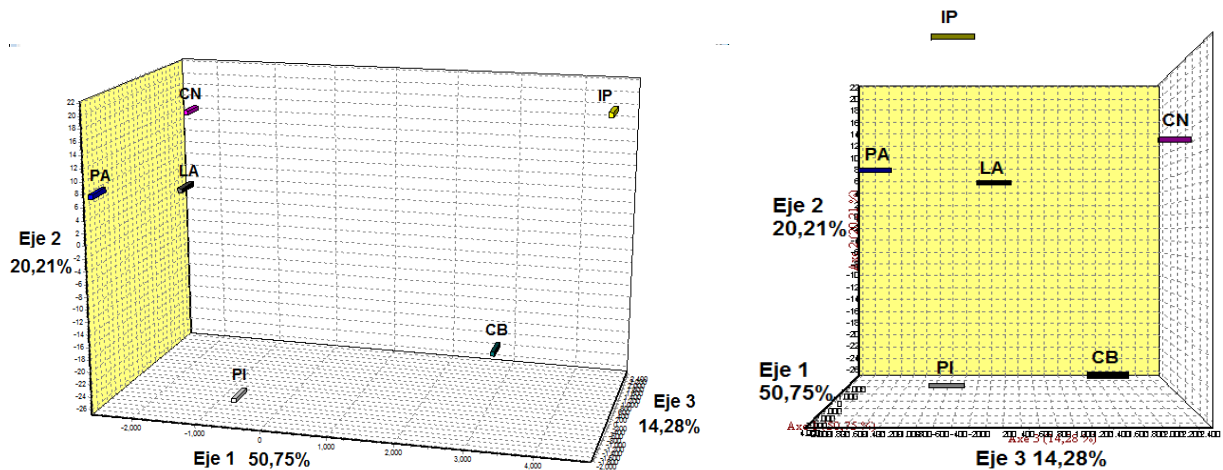


Figura 3: Análisis de Correspondencia Factorial (AFC) por localidades de captación de semilla y un banco natural.

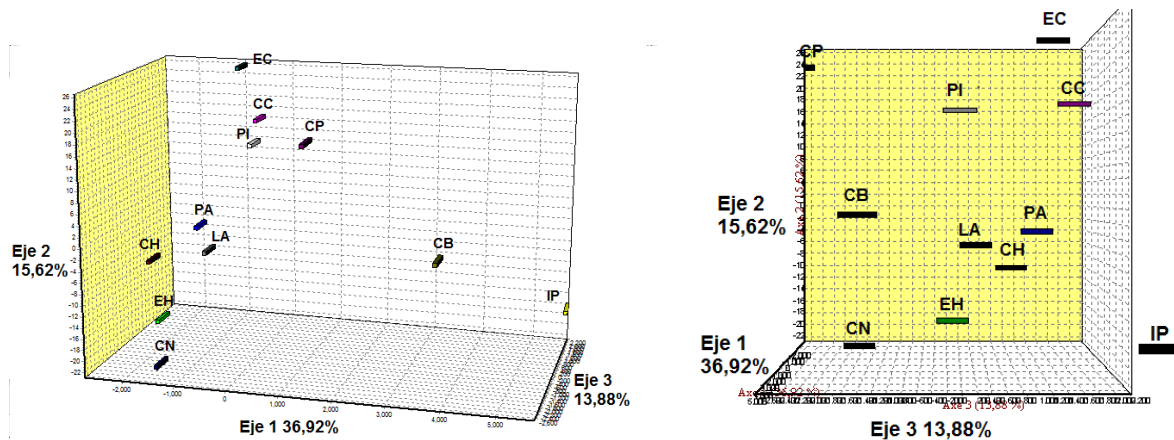


Figura 4: Análisis de correspondencia factorial (AFC) por once localidades.

El valor de F_{ST} global considerando las once localidades es significativo ($P = 0,00$) e indica que el 3,04 % de la varianza total de las frecuencias alélicas está entre las localidades (Tabla 5), y que el 96,96 % de la varianza de las frecuencias alélicas se

explica por la variación intra localidades. El valor de F_{ST} global obtenido de las seis localidades (banco natural y centros de captación de semillas) indica que un 3,19% de la varianza total de las frecuencias alélicas está entre las localidades, y que el 96,81% de la varianza de las frecuencias alélicas se explicaría por la variación intra localidades, el valor de F_{ST} global para seis localidades resultó ser un valor significativo ($P = 0,00$).

Al analizar entre pares de localidades (Tabla 7), el mayor valor de F_{ST} (0,112) se da entre las localidades de Canal Coldita–Patagonia y Canal Chidguapi. De los 55 test realizados, 21 mostraron valores de F_{ST} significativos después de realizada la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice, 1989).

Tabla 7: Estimación de F_{ST} entre pares de localidades de *M. chilensis* basada en tres loci microsatélites.

F_{ST}	1-PA	1-PI	1-LA	1-CC	1-EC	1-CN	1-CH	1-EH	2-CB	2-CP
3-IP	0,067*	0,055*	0,055*	0,054*	0,063*	0,054*	0,106*	0,067*	0,018	0,041*
1-PA		0,011	0	0	0	0	0,011	0	0,071*	0,056*
1-PI			0,006	0,005	0,001	0,007	0,042*	0,014	0,029	0,018
1-LA				0	0	0	0,012	0	0,057*	0,043
1-CC					0	0	0,009	0	0,050*	0,045*
1-EC						0	0,033	0,002	0,057*	0,030
1-CN							0,019	0	0,053*	0,035
1-CH								0,008	0,101*	0,112*
1-EH									0,071*	0,053*
2-CB										0,020

*Valores estadísticamente significativos después de la corrección secuencial de Bonferroni ($P \leq 0,05$). 3-IP: Isla Peel, 1-PA: Piedra Azul, 1-PI: Pichicolo, 1-LA: Caleta La Arena, 1-CC: Canal Caicaén, 1-EC: Estero Chauquiar, 1-CN: Canutillar, 1-CH: Canal Chidguapi, 1-EH: Estero Chocho, 2-CB: Canal Coldita-Piedra Blanca, 2-CP: Canal Coldita-Patagonia.

El resultado para N_m considerando las seis localidades (banco natural y centros de captación de semillas), es de 15,17, y considerando las once localidades es de 15,95. Ambos valores son mayores a 1.

El dendrograma no enraizado (Figura 5) de relaciones entre las localidades de captación de semillas y banco natural construido a partir de la matriz de distancia genética de Reynolds no mostró localidades más separadas que otras, y los valores de bootstrap que indican la confianza de los nodos, fueron bajos. Lo mismo ocurrió al realizar el análisis considerando las once localidades estudiadas (Figura 5). Se eligió un dendrograma no enraizado, porque representa de mejor manera las relaciones entre grupos parcialmente

mezclados, como es frecuente en organismos marinos, ya que no asume relaciones jerárquicas entre ellos (Toro *et al.*, 2009).

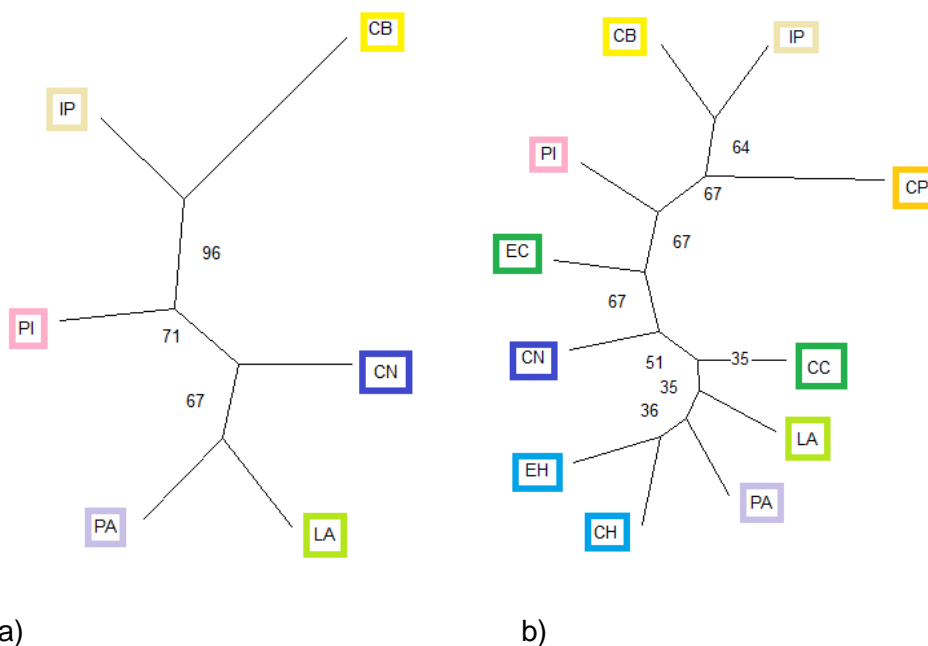


Figura 5: Dendrograma no enraizado que muestra la relación entre las localidades utilizando la distancia genética de Reynolds a) entre seis localidades (banco natural y centros de captación de semilla) y b) entre las once localidades (banco natural, centros de captación de semillas y centros de engorda).

El test de Mantel no mostró una correlación significativa ($r = -0,065$; $P = 0,398$) entre la matriz de distancia genética [$F_{ST} / (1 - F_{ST})$] y la de distancia geográfica entre las seis localidades (banco natural y centros de captación de semillas). Al realizar el test de Mantel para las once localidades, tampoco mostró una correlación significativa ($r = 0,784$; $P = 0,208$).

8.4 Asignación de individuos a localidades

El método basado en frecuencias realizado en GeneClass2 pudo reubicar correctamente 120 individuos (44,71%) en las localidades de origen (Tabla 8) y la probabilidad de asignación fue de 0,80.

El algoritmo que asigna el individuo al sitio donde su frecuencia alélica es más probable (Paetkau *et al.*, 1995), reasignó correctamente el 58% de los individuos de la localidad Isla Peel, pero solo 26% de los individuos de Canutillar. La sensibilidad, que

indica la proporción de individuos correctamente incluidos de la localidad, alcanzó un máximo de 0,58 en Isla Peel y un valor mínimo de 0,26 en Canutillar. La especificidad, que indica la proporción de individuos correctamente excluidos de la localidad, alcanzó un máximo de 0,93 en Piedra Azul y un valor mínimo de 0,82 en Isla Peel. La razón de verosimilitud mayor (4,2) se obtuvo en la localidad de Canal Coldita-Piedra Blanca, éste último índice informa que los individuos de esta localidad fueron reasignados a ella con una frecuencia 4,2 veces mayor que los individuos de otras localidades. Las localidades de Piedra Azul y de Canal Coldita-Piedra Blanca mostraron los máximos valores para probabilidad total de asignación (0,82).

Tabla 8: Número y porcentaje de individuos correctamente reasignados, sensibilidad, especificidad, razón de verosimilitud y probabilidad total de asignación del algoritmo de Paetkau *et al.* (1995) basado en frecuencias.

Asignación Correcta		Localidad							
N° Individuos	(%)	3-IP	1-PA	1-PI	1-LA	1-CN	2-CB	Total	
120	44,71	S	0,58	0,28	0,44	0,42	0,26	0,42	0,40
		E	0,82	0,93	0,86	0,85	0,92	0,90	0,88
		LR+	3,29	4,12	3,24	2,84	3,10	4,20	3,46
		PA	0,78	0,82	0,79	0,78	0,81	0,82	0,80

S: Sensibilidad, E: Especificidad, LR+: Razón de verosimilitud, PA: Probabilidad total de asignación a la categoría. 3-IP: Isla Peel, 1-PA: Piedra Azul, 1-PI: Pichicolo, 1-LA: Caleta La Arena, 1-CN: Canutillar, 2-CB: Canal Coldita-Piedra Blanca.

La asignación de los individuos muestreados desde los centros de engorda a las seis localidades de origen (banco natural y cinco centros de captación de semillas) (Tabla 9) realizada usando el algoritmo de Paetkau *et al.* (1995) muestra que para la localidad de Canal Caicaén, que es un centro de engorda, el mayor número de individuos fue asignado a la localidad Caleta La Arena, la misma que figuraba en los registros de trazabilidad de la empresa mitilicultora, aunque con una probabilidad total de asignación baja (34,3%).

Para los individuos del centro de engorda de Canal Coldita–Patagonia el mayor número de individuos fue asignado a la localidad de Canal Coldita-Piedra Blanca, siendo la misma localidad que figuraba en los registros de la empresa.

En el caso de los individuos de los centros de engorda de Estero Chauquiar, Canal Chidguapi y Estero Chope, el número de individuos “correctamente asignados” a las localidades que figuraban en los registros, fue bajo (11, 5 y 11 individuos) y se encontró que otras localidades presentaban mayor número de individuos asignados y las mayores probabilidades totales de asignación.

Tabla 9: Asignación de individuos de centros de engorda a banco natural y centros de captación de semillas usando criterio frecuentista en programa GeneClass2.

<i>Origen Declarado</i>	<i>Centro de Engorda</i>	<i>Asignación Correcta</i>		<i>Asignación Incorrecta</i>					
		N° de Individuos	%	3-IP	1-PA	1-PI	1-LA	1-CN	2-CB
1-LA	1-CC	13	26	11	8	9	-	4	5
		(34,3)		(50,3)	(33,1)	(39,5)		(39,8)	(35,4)
1-CN	1-EC	11	22	4	9	12	-	9	5
		(31,9)		(70,9)	(40,7)	(40,0)		(35,5)	(37,5)
2-CB	1-CH	5	10	2	8	6	20	-	9
		(43,8)		(43,0)	(30,6)	(34,4)	(29,4)		(44,8)
2-CP	1-EH	11	22	2	29	2	14	-	1
		(39,4)		(68,9)	(74,5)	(43,3)	(73,5)		(58,6)
		21	42	10	3	11	4	1	-
		(39,0)		(43,2)	(28,7)	(40,5)	(30,4)	(32,4)	

(Entre paréntesis) = probabilidad total de asignación a la categoría. 3-IP: Isla Peel, 1-PA: Piedra Azul, 1-PI: Pichicolo, 1-LA: Caleta La Arena, 1-CN: Canutillar, 2-CB: Canal Coldita–Piedra Blanca, 2-CP: Canal Coldita–Patagonia, 1-CC: Canal Caicaén, 1-EC: Estero Chauquiar, 1-CH: Canal Chidguapi y 1-EH: Estero Chope.

9. DISCUSIÓN

9.1 Selección y estandarización de loci microsatélites

Los marcadores microsatélites se han usado extensivamente en el estudio de la diversidad genética de especies marinas tanto naturales como cultivadas, a pesar de esto en el género *Mytilus* hay un número reducido (236) de microsatélites disponibles (Cruz *et al.*, 2005; Gardeström *et al.*, 2008; Lallias *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2011; Ouagajjou *et al.*, 2011; Presa, 2002; Varela *et al.*, 2007; Vidal *et al.* 2009; Yu *et al.*, 2007) en comparación con otras especies como salmón y trucha.

El hecho de que los microsatélites descritos para *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. californianus* amplifiquen en el genoma de *M. chilensis* se debe a que las regiones flanqueantes de la zona microsatélite se encuentran conservadas entre especies relacionadas, lo que permite la transferencia del microsatélite usando partidores heterólogos (Araneda, 2005).

Respecto al número de alelos observados, para el locus *Med737* y *MGE005* no coincide con lo descrito en la bibliografía consultada (Tabla 3), posiblemente porque estos microsatélites fueron desarrollados en otras especies (*M. edulis* y *M. galloprovincialis*) y por la metodología de genotipado (genotipado de fragmentos amplificados con partidores fluorescentes en secuenciador automático v/s separación de fragmentos mediante PAGE y tinción con plata). En el caso del locus *MIT02* el tamaño de los alelos observados coincide con el tamaño de los alelos descritos en la bibliografía.

Antes de realizar los análisis de estructura poblacional, es esencial probar que se cumplen los supuestos básicos de: neutralidad selectiva, inexistencia de alelos nulos e independencia de los loci (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

Respecto a la neutralidad selectiva, los loci involucrados en adaptaciones locales muestran valores de F_{ST} significativamente mayores que aquellos neutros (Beaumont *et al.*, 2004; Excoffier *et al.*, 2009). Para identificar las regiones del genoma que han sido blanco de selección se debe obtener la distribución esperada del estadístico F_{ST} a través de muchos loci (sobre quince), lo que no se pudo realizar en este caso habiendo estudiado solo tres (Tabla 5).

La presencia de alelos nulos ha sido encontrada en muchas taxa presentándose en los moluscos en una frecuencia particularmente alta (Chapuis *et al.*, 2007), y

particularmente en microsatélites de *Mytilus* han sido ampliamente descritos (Gardeström *et al.*, 2007; Ouagajjou *et al.*, 2011; Presa *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2007). Otra razón que hace esperable la presencia de alelos nulos es que ésta aumenta cuanto mayor es la distancia filogenética entre la especie en la que se desarrolló el microsatélite y la especie en la cual se usa. Los microsatélites utilizados se desarrollaron para *M. galloprovincialis*, *M. edulis* o *M. californianus* y se usaron en *M. chilensis*, por lo que la presencia de alelos nulos es esperable. Finalmente, los loci utilizados son independientes, ya que no muestran desequilibrio del ligamiento.

9.2 Diversidad genética y Parentesco

Los tres loci microsatélites usados fueron polimórficos en la especie *M. chilensis* de las once localidades del Sur de Chile evaluadas, ya que la frecuencia del alelo más común no excedió de 0,95, lo mismo sucedió en otros estudios realizados en mejillones con el mismo tipo de marcadores (Diz *et al.*, 2008; Diz *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009). En todos los estudios anteriores, al igual que en este trabajo, se encontró déficit de heterocigotos en los dos loci que presentaron desequilibrio de H-W (*Med737* y *MIT02*). En teoría, el déficit de heterocigotos que causa el desequilibrio de H-W puede ser provocado por una variedad de causas, en primer lugar se atribuiría a la presencia de subestructuración dentro de la población (efecto Wahlund), en segundo lugar a altos niveles de consanguinidad en la población, producto del apareamiento entre individuos emparentados, en tercer lugar puede deberse a que el locus esté bajo selección y finalmente podría deberse a la presencia de alelos nulos (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

La consanguinidad no sería la causa del déficit de heterocigotos encontrado en estas localidades. Esta especie libera los gametos al medio acuático dónde ocurre la fecundación, y existe evidencia (Veliz *et al.*, 2006) que señala que parches discretos de larvas pueden mantenerse en la columna de agua durante días y hasta semanas. Esto hace posible que algunas veces las larvas emparentadas se dispersen en grupos, sin mezclarse y que, bajo ciertas condiciones, larvas del mismo grupo familiar, sean transportadas en la misma masa de agua y se fijen en un mismo lugar, influenciando así la estructura genética de las poblaciones de los individuos adultos. Sin embargo, no se encontró evidencia de grandes niveles de consanguinidad en las localidades estudiadas, ya que al estimar el parentesco mediante el índice r_{XY} los valores obtenidos están cercanos a 0, siendo valores no significativos.

La razón más conocida para la subestimación de la heterocigosidad en microsatélites es la presencia de alelos nulos (Shields *et al.*, 2010), éste es un fenómeno frecuente en genética de poblaciones de bivalvos marinos de forma que muchos de los individuos que aparecen como homocigotos, son en realidad heterocigotos entre un alelo visible y el alelo nulo (Brookfield, 1996). Los autores Gardeström *et al.* (2007) y Presa (2002) que desarrollaron SSR en *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, respectivamente, reportaron déficit de heterocigotos y posible presencia de alelos nulos en algunos loci.

La presencia de alelos nulos podría explicar parte del déficit de heterocigotos en los loci *Med737* y *MIT02* que mostraron desequilibrio de H-W en gran parte de las once localidades. En los estudios de estructura poblacional realizados en la misma especie y zona usando alozimas (Toro *et al.*, 2006), también se describió déficit generalizado de heterocigotos en todos los loci en desequilibrio H-W.

A pesar de que está ampliamente descrito que la presencia de alelos nulos puede distorsionar los análisis de diferenciación poblacional (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005) se decidió no corregir las frecuencias alélicas para la presencia de alelos nulos. Gardeström *et al.* (2007) y Diz *et al.* (2008) encontraron que la corrección de las frecuencias alélicas para alelos nulos entre poblaciones de *Mytilus* no modificó el resultado de las pruebas estadísticas de diferenciación. De igual manera otros autores (Chapuis *et al.*, 2007; Hauser *et al.*, 2006) demostraron que la presencia de alelos nulos en loci microsatélites tuvo un efecto menor en la estimación de la diferenciación poblacional, determinación de distancias genéticas y asignación de individuos a poblaciones.

Los loci *Med737* y *MIT02* son altamente informativos (PIC > 0,5) y el locus *MGE005* es medianamente informativo (PIC 0,25 - 0,5). El PIC indica que tan informativo es un marcador, su valor depende tanto del número de alelos como de la distribución de frecuencias, los tres loci utilizados resultaron ser informativos, esto serviría para que pudieran ser incluidos en otros estudios que evalúen la diversidad genética de *M. chilensis*.

9.3 Estructura poblacional

La estructura poblacional de *M. chilensis* en el sur de Chile ha sido estudiada anteriormente con marcadores de tipo RAPD (Toro *et al.*, 2004b) y alozimas (Toro *et al.*, 2006), pero no con marcadores microsatélites, encontrándose diferenciación genética

baja ($F_{ST} = 0,03$). En este estudio también se observó un valor de F_{ST} global bajo (0,03) aunque significativo ($P = 0,00$), lo cual no constituye una unidad panmíctica, aún teniendo un valor de F_{ST} global bajo.

El flujo genético se ve ayudado por el sistema reproductivo (fertilización externa), por la prolongada etapa pelágica de las larvas de esta especie y por las condiciones oceanográficas de la zona (Toro *et al.*, 2004a), que a pesar de las barreras geográficas de la línea de la costa (fiordos y canales), promueven la dispersión. El flujo genético también puede estar favorecido por la operación de las empresas mitilicultoras, que trasladan juveniles (semilla) desde áreas de captación (Yaldad, Ilque-Huelmo, Quillaípe-Metri, Estuario del Reloncaví, y Hornopiren-Pichicolo, Coldita, Curanue, Puerto Carmen, Cochamo y Buil) hacia los centros de engorda ubicados principalmente en el Archipiélago de Chiloé y en Calbuco, debido a la calidad de las aguas y a las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de este recurso (Bagnara *et al.*, 2008).

En estudios realizados usando alozimas en otros bivalvos de la zona con tasas de producción muy inferiores al chorito, como la almeja (*Venus antiqua*) (Gallardo *et al.*, 1998) y la cholga (*Aulacomya ater*) (Mena *et al.*, 2001), se encontraron valores de diferenciación genética mayores (F_{ST} 0,107 y 0,147 respectivamente), lo que podría sugerir que parte de la homogeneidad genética interlocalidades encontrada en este estudio, se podría atribuir al efecto del masivo traslado de semillas, como se reportó en Galicia (Diz *et al.*, 2009).

Marcadores del tipo microsatélite se han usado para estudiar poblaciones de mejillones en la península Ibérica (Diz *et al.*, 2008; Diz *et al.*, 2009) y en el lago Poyang en China (Li *et al.*, 2009), encontrándose en el primer caso niveles de diferenciación menores ($F_{ST} = 0,0240$ y $0,0122$) que los del presente estudio o no encontrando diferenciación significativa en el caso de las localidades de China, escenario que no se puede descartar para el presente estudio.

9.4 Asignación de individuos a localidades

Un objetivo de este estudio fue asignar individuos a localidades con el propósito de verificar la trazabilidad de tipo administrativa de *M. chilensis* en el Sur de Chile.

Considerando que la prevalencia o pertenencia a priori a cada grupo (banco natural y centro de captación de semillas) es de 17% (uno sobre seis), el método probado

consiguió reasignar correctamente al menos el doble de los individuos esperados por azar. Para utilizar este método, aplicado en este estudio, como herramienta forense para el control de calidad y refuerzo de la legislación, es necesario encontrar un equilibrio aceptable entre los niveles de certeza estadística requeridos en investigación y aquellos requeridos por la comunidad científica forense. Además para aplicaciones en este campo es necesario haber producido los datos usando técnicas validadas y robustas para presentar evidencia clara e inequívoca (Ogden, 2008).

La probabilidad de asignación correcta depende no solo del grado de diferenciación entre poblaciones, sino también del tamaño de la muestra, del número de loci y su nivel de polimorfismo (Manel *et al.*, 2005). Para valores de F_{ST} entre 0,05 y 0,1 los métodos de asignación se desempeñan bien, pero para este caso ($F_{ST} = 0,03$) sería necesario incrementar la resolución, por lo que se recomienda incorporar más loci microsatélites y marcadores del tipo SNPs (Polimorfismos de un solo nucleótido) en el panel, para así intentar detectar la estructura cuando existen bajos niveles de diferenciación poblacional (Ogden, 2008).

Con el método de asignación que emplea el criterio basado en frecuencias fue posible verificar la información de los registros de trazabilidad de las empresas sobre el origen de la semilla que era cultivada en los centros de engorda, determinándose que en tres de los cinco casos estudiados, la información no concordó con los resultados de las pruebas de asignación, ya que los individuos fueron asignados a un centro de captación de semilla distinto del registrado por la empresa mitilicultora.

Los métodos de asignación se han usado también para detectar estructura poblacional en forma más sensitiva que las pruebas tradicionales basadas en frecuencias y F_{ST} . Las poblaciones marinas presentan uno de los patrones más extremos de heterogeneidad espacial y temporal, por lo que modelos basados en F_{ST} que asumen tamaños poblacionales y tasas de migración iguales y constantes, desconocen la realidad demográfica del mar en los análisis genéticos. En el método de asignación utilizado, la proporción de asignaciones correctas fue mayor a la esperada por azar, lo que confirmaría que la estructura poblacional de *M. chilensis* en la zona existe como alternativa a la panmixia (Manel *et al.*, 2005).

Como proyección de este trabajo, para aumentar su aplicabilidad en el sector mitilicultor y alcanzar estándares para aplicación forense, se propone mejorar el panel de

marcadores utilizando un mayor número de marcadores microsatélites sin alelos nulos, incorporar otro tipo de marcadores como los SNPs y validar la metodología utilizada.

10. CONCLUSIONES

La diversidad genética y la estructura poblacional de *M. chilensis* en el Sur de Chile determinada utilizando tres loci microsatélites, permitieron establecer su origen geográfico y evaluar el sistema de trazabilidad.

No se apreció una disminución en la diversidad genética entre centros de captación de semillas y los centros de engorda de choritos.

Se encontró un alto nivel de flujo genético entre las localidades estudiadas. El flujo genético puede explicarse en parte por las condiciones de reproducción, larga fase planctónica de la larva y condiciones oceanográficas, así como por la intensa actividad mitilicultora realizada en la zona.

Se constató que la información contenida en los registros de las empresas sobre el traslado de semillas de choritos, desde los centros de captación a los centros de engorda, no siempre corresponden con los resultados de la asignación de individuos a localidades, con esto se deduce que puede haber ocurrido algún error o adulteración en estos registros.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. **AGRIMONTI, C.; VIETINA, M.; PAFUNDO, S.; MARMIROLI, N.** 2011. The use of food genomics to ensure the traceability of olive oil. *Trends in Food Science & Technology*. 22: 237-244.
2. **ALTMAN, D.; BLAND, M.** 1994. Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *BMC*, 308, 1552.
3. **AQUA.** 2011. Crecimiento de la mitilicultura insta a pesqueras a abrirse a nuevos mercados. [en línea]. <<http://www.aqua.cl/noticias/index.php?doc=43140>> [consulta: 11-05-2011].
4. **ARANEDA, C.** 2005. Marcadores genéticos basados en PCR. Capítulo 2. **In:** El uso de los marcadores genético moleculares en el mejoramiento genético de peces. (Serie de Publicaciones para la Acuicultura N°4). U. Chile, Fac. Cs. Agronómicas. 64 p.
5. **ARANGUREN-MÉNDEZ, J. A.; ROMÁN-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): 30-42.
6. **ASTORGA.** 2007. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. **In:** Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Puerto Montt, Chile. 20-24 Agosto 2007. Taller Técnico Regional de la FAO. pp. 277-287.
7. **BAGNARA, M.; MALTRAÍN, G.** 2008. Descripción del sector mitilicultor en la región de Los lagos, Chile: Evolución y proyecciones. **In:** Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Puerto Montt, Chile. 20-24 de Agosto de 2007. Taller Técnico Regional de la FAO. pp. 189-198.
8. **BARRERA, M. F.** 2009. Estudio de la variabilidad genética de dos poblaciones de *Mytilus chilensis* mediante marcadores microsatélites. Tesis Magíster en Ciencias

Animales y Veterinarias, mención Patología Animal. Santiago, Chile. U. Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 147 p.

9. **BEAUMONT, M. A.; BALDING, D. J.** 2004. "Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans". *Molecular Ecology* 13(4): 969-980.
10. **BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOMME, F.** 1996. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
11. **BELKHIR, K.; CASTRIC, V.; BONHOMME, F.** 2002. Program Note IDENTIX: software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Molecular Ecology Notes*, 2: 611-614.
12. **BORSA, P.; ROLLAND, V.; DAGUIN-THIÉBAUT, C.** 2012. Genetics and taxonomy of Chilean smooth-shelled mussels, *Mytilus* spp. (Bivalvia: *Mytilidae*). *Comptes Rendus Biologies* 335 (1): 51-61.
13. **BROOKFIELD, J. F. Y.** 1996. A simple method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5, 453-455.
14. **CÁRCAMO, C.; COMESAÑA, A. S.; WINKLER, F. M.; SANJUAN, A.** 2005. Allozyme identification of Mussels (Bivalvia: *Mytilus*) on the Pacific coast of South America. *Journal of Shellfish Research* 24: 1101-1115.
15. **CHAPUIS, M.; ESTOUP, A.** 2007. "Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation". *Molecular Biology and Evolution* 24(3): 621-631.
16. **CHILE, INN (INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN).** 2011. Norma Oficial Chilena Nch 2861/of. 2011. Sistema de de análisis de peligros y de puntos críticos de control (HACCP) - Directrices para su aplicación - Parte 3: Términos y Definiciones. 27p.
17. **CE.Nº178/2002.** Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan los procedimientos

relativos a la seguridad alimentaria. (p. L 31 / 31). Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

18. **CLASING, E.; OÑATE, A.; ARRIAGADA, H.** 1998. Cultivo de choritos en Chile. Docentes Instituto de Biología Marina "Dr. Jürgen Winter". Valdivia, Chile. 36 p.
19. **CODEX ALIMENTARIUS.** 2003. Principios Generales de Higiene de los Alimentos [en línea]. <<http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/es/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CAC/RCP>> [consulta: 13-01-2013].
20. **CODEX ALIMENTARIUS.** 2006. Principios para la rastreabilidad/rastreo de productos como herramienta en el contexto de la inspección y certificación de alimentos [en línea]. <http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp> [consulta: 28-07-11].
21. **CORNUET, J.M.; PIRY, S.; LUIKART, G; ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.** 1999 "New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals" *Genetix*, 153, pp1989-2000.
22. **CRUZ, F.; PÉREZ, M.; PRESA, P.** 2005. "Distribution and abundance of microsatellites in the genome of bivalves". *Gene* 346(0): 241-247.
23. **DALVIT, C.; DE MARCHI, M.; CASSANDRO, M.** 2007. Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science* 77: 437-449.
24. **DALVIT, C.; DE MARCHI, M.; TARGHETTA, C.; GERVASO, M.; CASSANDRO, M.** 2008. Genetic traceability of meat using microsatellite markers. *Food Research International* 41: 301-307.
25. **DEEKS, J. J.; ALTMAN, D. G.** 2004. Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *BMJ*, 329.
26. **DE VICENTE, M. C.; LÓPEZ, C.; FULTON, T.** 2004. Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: Módulo de aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogénéticos (IPGRI). Roma, Italia. 571 p.

27. **DIZ, A. P.; PRESA, P.** 2008. "Regional patterns of microsatellite variation in *Mytilus galloprovincialis* from the Iberian Peninsula". *Marine Biology* 154(2): 277-286.
28. **DIZ, A. P.; PRESA, P.** 2009. "The genetic diversity pattern of *Mytilus galloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries)". *Aquaculture* 287(3-4): 278-285.
29. **EXCOFFIER, L.; HOFER, T.; FOLL, M.** 2009. "Detecting loci under selection in a hierarchically structured population". *Heredity* 103(4): 285-298.
30. **FAO.** 2003. *Acuicultura: principales conceptos y definiciones*. [en línea] <<http://www.fao.org/spanish/newsroom/focus/2003/aquaculture-defs.htm>>. [consulta: 22-01-2013].
31. **FDA.** 2004. Title I -- National Preparedness for Bioterrorism and Other Public Health Emergencies. U.S.- Food and Drug Administration. Public Law 107-188. [en línea] <<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Legislation/ucm155733.htm>>. [consulta: 14-01-2013].
32. **FDA.** 2007. Guide for the control of molluscan shellfish. National shellfish sanitation program-U.S. Food and Drug Administration. [en línea] <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/Product-SpecificInformation/Seafood/FederalStatePrograms/NationalShellfishSanitationProgram/UCM241512.pdf>> [consulta: 14-01-2013].
33. **FELMER, R.; SAGREDO, B.; CHÁVEZ, R.; IRAIRA, H.; FOLCH, C.; PARRA, L.; CATRILEO, A.; ORTÍZ, M.** 2008. Implementation of a molecular system for traceability of beef based on microsatellite markers. *Chilean Journal of Agricultural Research* 68 (4): 342-351.
34. **FELSENSTEIN, J.** 2005. PHYLIP (Phylogeny inference package) version 3.6. [en línea] <<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>> [consulta: 16-10-2012].
35. **GALLARDO, M. H.; PEÑALOZA, L.; CLASING, E.** 1998. Gene flow and allozymic population structure in the clam *Venus antiqua* (King of Broderip), (Bivalvia,

- Veneriidae) from Southern Chile. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 230 (2): 193-205.
36. **GARDESTRÖM, J.; PEREYRA, R. T.; 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 (4): 1003-1005.
37. **GÉRARD, K.; BIERNE, N.; BORSA, P.; CHENUIL, A.; FÉRAL, J. P.** 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 (1): 84-91.
38. **HAUSER, L.; SEAMONS, T. R.; DAUER, M.; NAISH, K. A.; QUIN, T. P.** 2006. "An empirical verification of population assignment methods by marking and parentage data: hatchery and wild steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) in Forks Creek, Washington, USA". *Molecular Ecology* 15(11): 3157-3173.
39. **HUPE, L.** 1854. Moluscos de Chile. **In:** C. Gay (ed.). *Historia Física y Política de Chile*. Zool. 8:1-500.
40. **ISO.9000:2005.** Sistema de gestión de la calidad – Fundamentos y vocabulario. International Standardization Organization ISO.
41. **JULLIEN, N.** 2007. AmplifX version 1.44. [en línea] <<http://ifrjr.nord.univ-mrs.fr/AmplifX-Home-page>>. [consulta: 05-05-11].
42. **LALLIAS, D.; STOCKDALE, R.; BOUDRY, P.; LAPEGUE, S.; BEAUMONT, A.R.** 2009. Characterization of ten microsatellite loci in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Journal of Shellfish Research*, Vol 28, No. 3: 547-551.
43. **LAMY, E.** 1936. Révision des Mytilidae vivants du Muséum National d'Historie Naturelle du Paris. *Journal of Conchology*, 80, 66-102, 107-198.
44. **LARRAÍN, M. A.** 2012. Utilización de marcadores genético moleculares en calidad e inocuidad de alimentos. Aplicaciones en trazabilidad y denominación de origen geográfico de *Mytilus chilensis*. Tesis de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Santiago, Chile. Universidad de Santiago de Chile, Facultad Tecnológica. 101 p.

45. **LARRAÍN, M. A.; DÍAZ, N. F.; LAMAS, C.; VARGAS, C.; ARANEDA, C.** 2012. Genetic composition of *Mytilus* species in mussel populations from southern Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research* 40 (4): 1077-1084.
46. **LENSTRA, J. A.; GROENEVELD, L. F.; EDING, H.; KANTANEN, J.; WILLIAMS, J. L.; TABERLET, P.; NICOLAZZI, E. L.; SOLKNER, J.; SIMIANER, H.; CIANI, E.; GARCÍA, J. F.; BRUFORD, M. W.; AJMONE-MARSAN, P.; WEIGEND, S.** 2011. Molecular tools and analytical approaches for the characterization of farm animal genetic diversity. *Animal Genetics* 1-20.
47. **LI, J.; G. WANG, G.; BAI, Z.** 2009. "Genetic variability in four wild and two farmed stocks of the Chinese freshwater pearl mussel (*Hyriopsis cumingii*) estimated by microsatellite DNA markers". *Aquaculture* 287(3-4): 286-291.
48. **LOONG, T. W.** 2003. Understanding sensitivity and specificity with the right side of the brain. *BMJ* 327 (7417): 716-719.
49. **MANEL, S.; GAGGIOTTI, O. E.; WAPLES, R. S.** 2005. Assignment methods: matching biological questions techniques with appropriate. *Trends in Ecology & Evolution* 20 (3): 136-142.
50. **MANTEL, N.** 1967. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research* 27 (2 Part 1), 209-220.
51. **MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W.** 2011. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Molecular Ecology Resources* 11 (1): 5-18.
52. **MENA, C.; GONZÁLEZ, C.; CLASING, E.; GALLARDO, M.** 2001. Variabilidad genética en *Aulacomya atra* (MOLINA, 1782) en el sur de Chile. *Revista Ciencia y Tecnología del Mar*, 24, 71-79.
53. **MUNDO ACUÍCOLA.** 2013. Mitilicultores de Calbuco aprenderán como innovar en sus empresas [en línea]. <<http://www.mundoacuicola.cl/comun/?modulo=2&cat=4&view=1&idnews=57594>> [consulta: 27-05-2013].
54. **NCh-ISO.22000:2007.** Sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos- Requisitos para cualquier organización en la cadena alimentaria.

55. **NCh.2983-2011** Trazabilidad de alimentos en la cadena alimentaria - Principios generales y guía para el diseño y la implementación del sistema Instituto Nacional de Normalización INN.
56. **NGUYEN, T. T. T.; HAYES, B. J.; GUTHRIDGE, K.; AB RAHIM, E. S.; INGRAM, B. A.** 2011. Use of a microsatellite-based pedigree in estimation of heritabilities for economic traits in Australian blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Journal Animal Breed Genetic* 1-9.
57. **OGDEN, R.** 2008. Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries* 9 (4): 462-472.
58. **OUAGAJJOU, Y.; PRESA, P.; ASTORGA, M.; PÉREZ, M.** 2011. Microsatellites of *Mytilus chilensis*: A genomic print of its taxonomic status within *Mytilus* sp. *Journal of Shellfish Research* 30 (2): 325-330.
59. **OMPI** (Organización Mundial de la Propiedad Intelectual). 2010. [en línea] <<http://www.wipo.int/lisbon/es/general/>> [consulta: 20-06-12].
60. **PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C.** 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4 (3): 347-354.
61. **PAGE.** 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal Computers. *Bioinformatics*, 12 (4), 357-358.
62. **PALUMBI, S. R.; GRABOWSKY, G.; DUDA, T.; GEYER, L; TACHINO, N.** 1997. Speciation and population genetic structure in tropical pacific sea urchins. *Evolution*, 51 (5), 1506-1517.
63. **PARK, S. D. E.** 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [Ph.D. thesis] University of Dublin.
64. **PRESA, P.; PÉREZ, M.; DIZ, A. P.** 2002. Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus* spp). *Conservation Genetics*, 3, 441-443.
65. **PIRY, S.** 2004. GENECLASS 2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* 95 (6): 536-539.

66. **POMPANON, F.; A. BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; TABERLET, P.** 2005. "Genotyping errors: causes, consequences and solutions". *Nat Rev Genet* 6 (11): 847-846.
67. **QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K.F.** 1989. Estimating Relatedness Using Genetic Markers. *Evolution* 43 (2): 258-275.
68. **REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C.** 1983. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105 (3): 767-779.
69. **RICE, W. R.** 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43 (1): 223-225.
70. **ROUSSET, F.** 2008. "GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux". *Molecular Ecology Resources*, 8: pp103-106.
71. **SEGUEL, M.** 2011. Evaluation of the taxonomic status of *Mytilus chilensis* using the mitochondrial gene cytochrome C oxidase subunit I (COI). **In:** XXXI Congreso de Ciencias del Mar. Viña del Mar, Chile.
72. **SERNAPESCA.** 2012a. Anuarios Estadísticos de Pesca, Desembarque total año 2011 por especie y mes (en toneladas). [en línea] <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fil_einfo&id=6323> [consulta: 07-10-2012].
73. **SERNAPESCA.** 2012b. Plan de Contingencia para biotoxinas marinas y otras emergencias de contaminación. [en línea] <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=246&func=fil_einfo&id=189> [consulta: 05-10-2012].
74. **SERNAPESCA.** 2012c. Moluscos Bivalvos. [en línea] <http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_content&view=article&id=378&Itemid=482> [consulta: 20-06-12].
75. **SHIELDS, J. L.; HEATH, J. W.; HEATH, D. D.** 2010. Marine landscape shapes hybrid zone in a broadcast spawning bivalve: introgression and genetic structure in Canadian west coast *Mytilus*. *Marine Ecology Progress Series* 399: 211-223.

76. **SKIBINSKI, D. O. F.; BEARDMORE, J. A.; CROSS, T. F.** 1983. "Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae; Mollusca) in the British Isles." *Biological Journal of the Linnean Society* 19(2): 137-183.
77. **TAGGART, J.B.; HYNES, R.A.; PRODÖHL, P.A.; FERGUSON, A.** 1992."A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes". *Journal of Fish Biology* 40: 963-965.
78. **TORO, J. E.** 1998. PCR-based nuclear and mtDNA markers and shell morphology as an approach to study the taxonomic status of the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Bivalvia). *Aquatic Living Resources* 11 (5): 347-353.
79. **TORO, J. E.; INNES, D. J.; THOMPSON, R. J.** 2004a. Genetic variation among life-history stages of mussels in a *Mytilus edulis*-*M. trossulus* hybrid zone. *Marine Biology* 145 (4): 713-725.
80. **TORO, J. E.; OJEDA, J. A.; VERGARA, A. M.** 2004b. "The genetic structure of *Mytilus chilensis* (Hupé 1854) populations along the Chilean coast based on RAPDs analysis". *Aquaculture Research* 35(15): 1466-1471.
81. **TORO, J. E.; CASTRO, G. C.; OJEDA, J. A.; VERGARA, A. M.** 2006. Allozymic variation and differentiation in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis*, along its natural distribution. *Genetics and Molecular Biology* 29 (1): 174-179.
82. **TORO, M. A.; FERNÁNDEZ, J.; CABALLERO, A.** 2009. "Molecular characterization of breeds and its use in conservation". *Livestock Science* 120(3): 174-195.
83. **USDA.** 2004. Mandatory Country of Origin Labeling (COOL) of Fish and Shellfish; Interim Rule. *Federal Register* Vol 69 N° 192.
84. **VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON W. F.; WILLS, D.; SHIPLEY, P.** 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535–538.
85. **VARELA, M. A.; GONZÁLEZ-TIZÓN, A.; MARIÑAS, L.; MARTÍNEZ-LAGE, A.** 2007. Genetic divergence detected by ISSR markers and characterization of microsatellite regions in *Mytilus* mussels. *Biochemical Genetics* 45 (7-8): 565-578.

86. **VELIZ, D.; DUCHESNE, P.; BOURGET, E.; BERNATCHEZ, L. 2006.** "Genetic evidence for kin aggregation in the intertidal acorn barnacle (*Semibalanus balanoides*)." *Molecular Ecology* 15(13): 4193-4202.
87. **VIDAL, R.; PEÑALOZA, C.; URZÚA, R.; TORO, J. E. 2009.** Screening of ESTs from *Mytilus* for the detection of SSR markers in *Mytilus californianus*. *Molecular Ecology Resources* 9: 1409-1411.
88. **WEIR, B. S.; COCKERHAM, C.C. 1984.** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
89. **WRIGHT, S. 1942.** "Isolation by Distance." *Genetics* 28: 114-138.
90. **WRIGHT, S. 1949.** "THE GENETICAL STRUCTURE OF POPULATIONS." *Annals of Eugenics* 15(1): 323-354.
91. **WRIGHT, S. 1965.** Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, 19, 395 - 420.
92. **YU, H.; LI, Q. 2007.** Development of EST-SSRs in the Mediterranean blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Molecular Ecology Notes* 7: 1308-1310.

ANEXOS

ANEXO 1: Información de los loci microsatélite probados, número de acceso, motivo repetido, pareja de secuencias partidoras, referencia y especie.

N°	LOCUS REFERENCIA	Y	N° ACCESO	MOTIVO REPETIDO	SECUENCIAS PARTIDORAS	ESPECIE
1	<i>Med 737</i> (1)		FJ174681	(CA)C(CA) ₁₄ (GA) ₂ (CA) ₃	F: CGGCAAATGTGGTCAAACT R: GGGTCGACCATTGATAGTATCTG	<i>M. edulis</i>
2	MIT 02 (2)		EH663073	(AG) ₅	F: GGACCATCTGCGTAGATTCA R: GGTGGGCGTAGTTATTTCTG	<i>M. galloprovincialis</i>
3	MIT 03 (2)		AJ625258	(AGC) ₅	F: AGGAGGAGCAGGTGCAATAG R: GCGGTTCCACTTCCATGTC	<i>M. galloprovincialis</i>
4	MIT 05 (2)		ES398035	(AT) ₅	F: AGTTGCTTTCCCGCAATGACTC R: TCCGTTTTACCGAAGCTGCGAT	<i>M. californianus</i>
5	MIT 07 (2)		AM880065	(GAT) ₆	F: AGACCAAGGTATTGCAACCATGTG R: GTTCCCAAAGTTGAGCCCTTGATG	<i>M. edulis</i>
6	MIT 08 (2)		AM880415	(AAG) ₆	F: CTGAAGCCCCTGAAGTAGCA R: TATGCCAGAGGTCAAGTGCCA	<i>M. edulis</i>
7	MGE001 (3)		AJ625367	(TA) ₇	F: AGTAGCAGGTGGCAGCATTGAA R: CACATCAGGTATCATGTGCACAAC	<i>M. galloprovincialis</i>
8	MGE005 (3)		AJ623869	(TGA) ₆	F: AGACCAAGGTATTGCAACCATGTG R: TCGAAAGCATGGTACCTGGTCA	<i>M. galloprovincialis</i>
9	MGE006 (3)		AJ516720	(AC) ₅	F: GCACTGGTCATCCAGCTTTTAC R: GCCCCGTGGCTTAAAGTTTTGT	<i>M. galloprovincialis</i>
10	MGE007 (3)		AJ516476	(CAA) ₅	F: GGGAAAGGGTATGATTCCTC R: GGAGACACCATTTCTTTGGG	<i>M. galloprovincialis</i>
11	My650 (4)		FL488888	(GAG) ₅	F: TGTAGAACCTCCAAAGCCTGCAGA R: TAACAGCTGACGAGGAGCTATGTG	<i>M. galloprovincialis</i>

(1) Lallias *et al.* 2009

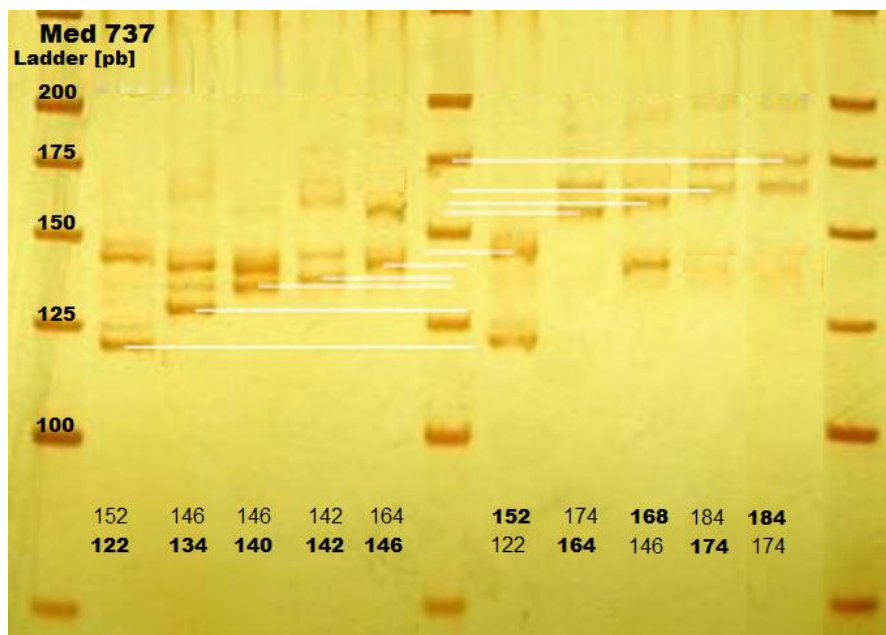
(2) Vidal *et al.* 2009

(3) Yu *et al.* 2007

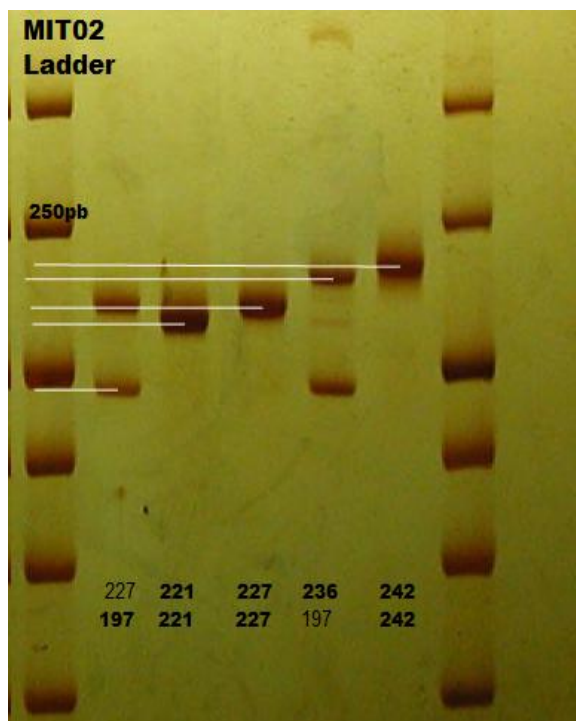
(4) Nguyen *et al.* 2011

ANEXO 2: Geles en que se determinó el tamaño y número de alelos por locus.

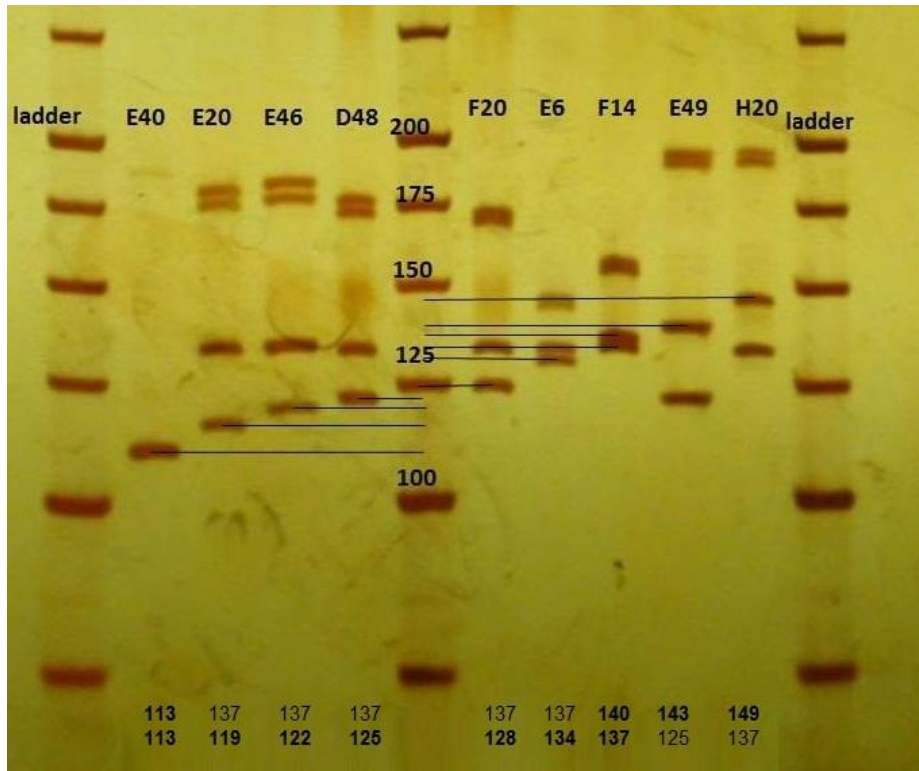
Locus *Med737*



Locus *MIT02*



Locus *MGE005*



ANEXO 3: Genotipos de individuos de *M. chilensis* de once localidades.

	Med737	Med737	MIT02	MIT02	MGE005	MGE005
3-IP01	164	174	197	243	125	137
3-IP02	168	174	243	243	137	137
3-IP03	140	164	227	243	137	137
3-IP04	146	164	197	227	137	137
3-IP05	168	174	227	227	137	137
3-IP06	164	164	197	227	137	137
3-IP07	140	146	197	243	137	137
3-IP08	164	164	227	227	137	137
3-IP09	140	164	243	243	137	137
3-IP10	164	174	227	243	137	137
3-IP11	140	184	227	227	137	137
3-IP12	164	168	227	243	128	137
3-IP13	140	140	227	227	137	137
3-IP14	164	168	221	243	137	137
3-IP15	152	152	227	243	137	137
3-IP16	140	140	243	243	125	137
3-IP17	152	152	197	243	128	137
3-IP18	168	174	227	243	137	137
3-IP19	164	174	227	227	134	137
3-IP20	140	164	237	243	137	143
3-IP21	146	168	197	227	122	137
3-IP22	140	140	237	243	137	137
3-IP23	146	174	227	243	137	137
3-IP24	164	164	227	243	137	137
3-IP25	152	152	227	243	137	137
3-IP26	164	168	227	227	137	137
3-IP27	168	168	227	243	137	137
3-IP28	164	164	237	243	137	137
3-IP29	146	146	243	243	137	137
3-IP30	140	140	227	243	137	137
3-IP31	140	140	243	243	122	137
3-IP32	168	168	243	243	137	137
3-IP33	164	164	197	243	122	137
3-IP34	164	164	227	227	137	137
3-IP35	164	164	227	227	137	137
3-IP36	164	174	243	243	128	137
3-IP37	164	164	227	227	137	137
3-IP38	164	174	243	243	137	137
3-IP39	140	164	227	227	125	137

3-IP40	184	184	227	227	137	137
3-IP41	140	164	221	243	134	137
3-IP42	146	146	227	227	122	137
3-IP43	140	140	243	243	137	137
3-IP44	174	174	243	243	137	137
3-IP45	164	164	243	243	137	137
3-IP46	164	164	227	227	137	137
3-IP47	164	174	243	243	122	137
3-IP48	164	174	227	227	125	137
3-IP49	142	164	227	227	137	137
3-IP50	168	184	227	227	137	137

	<i>Med737</i>	<i>Med737</i>	<i>MIT02</i>	<i>MIT02</i>	<i>MGE005</i>	<i>MGE005</i>
1-PA01	164	174	243	243	137	137
1-PA02	140	146	227	243	137	137
1-PA03	142	152	243	243	137	137
1-PA04	142	142	243	243	125	137
1-PA05	140	140	197	237	137	137
1-PA06	146	146	243	243	134	137
1-PA07	146	146	227	227	137	137
1-PA08	140	140	243	243	137	137
1-PA09	140	146	227	227	128	137
1-PA10	140	146	197	227	137	137
1-PA11	140	146	227	227	137	140
1-PA12	140	146	243	243	137	137
1-PA13	140	168	227	227	137	137
1-PA14	140	140	243	243	137	137
1-PA15	140	140	227	227	137	137
1-PA16	140	164	243	243	134	137
1-PA17	140	168	227	243	137	137
1-PA18	140	164	227	227	137	137
1-PA19	140	164	243	243	137	137
1-PA20	140	140	227	227	119	137
1-PA21	140	140	243	243	128	137
1-PA22	122	152	221	243	134	137
1-PA23	140	140	221	227	137	137
1-PA24	140	140	243	243	137	137
1-PA25	140	174	227	243	137	137
1-PA26	142	164	227	227	122	134
1-PA27	140	140	243	243	137	137
1-PA28	146	164	221	227	125	137
1-PA29	140	140	197	227	137	137

1-PA30	140	140	227	227	122	137
1-PA31	140	140	227	227	137	137
1-PA32	152	164	243	243	137	137
1-PA33	146	146	227	227	137	137
1-PA34	140	140	227	227	134	140
1-PA35	140	146	243	243	137	137
1-PA36	140	146	227	227	137	137
1-PA37	140	140	227	243	137	137
1-PA38	140	146	227	227	137	137
1-PA39	140	140	221	221	137	137
1-PA40	140	146	227	227	113	113
1-PA41	140	140	227	227	137	137
1-PA42	140	164	227	243	137	137
1-PA43	140	140	227	227	119	137
1-PA44	140	140	221	237	137	137
1-PA45	146	152	227	227	137	137
1-PA46	152	152	221	227	122	137
1-PA47	152	152	197	227	137	137
1-PA48	140	140	227	227	125	137
1-PA49	140	146	243	243	125	143
1-PA50	140	140	227	227	137	137

	<i>Med737</i>	<i>Med737</i>	<i>MIT02</i>	<i>MIT02</i>	<i>MGE005</i>	<i>MGE005</i>
1-PI01	140	146	227	227	137	137
1-PI02	140	140	243	243	137	137
1-PI03	140	146	243	243	137	137
1-PI04	146	146	221	227	125	137
1-PI05	146	146	227	243	137	137
1-PI06	168	184	243	243	119	137
1-PI07	140	140	221	227	137	137
1-PI08	140	146	221	227	137	137
1-PI09	140	146	227	227	125	137
1-PI10	164	168	243	243	125	137
1-PI11	140	140	227	227	122	137
1-PI12	140	140	243	243	122	137
1-PI13	146	146	227	243	137	137
1-PI14	164	168	227	227	137	140
1-PI15	140	140	237	243	137	137
1-PI16	140	146	227	227	137	137
1-PI17	140	146	227	227	137	137
1-PI18	140	140	227	243	137	137

1-PI19	140	146	243	243	137	137
1-PI20	134	146	227	227	128	137
1-PI21	140	140	221	221	137	137
1-PI22	146	146	227	227	137	137
1-PI23	146	146	227	227	125	137
1-PI24	140	164	227	227	137	137
1-PI25	140	140	227	227	137	137
1-PI26	152	152	237	243	137	137
1-PI27	140	146	227	243	137	137
1-PI28	140	146	227	227	137	137
1-PI29	146	146	221	221	137	137
1-PI30	140	146	243	243	137	137
1-PI31	140	140	243	243	137	137
1-PI32	146	164	227	243	137	137
1-PI33	146	146	227	227	137	140
1-PI34	146	146	237	237	125	137
1-PI35	140	146	227	227	122	125
1-PI36	146	152	227	227	137	143
1-PI37	146	164	221	243	137	137
1-PI38	140	146	221	221	137	137
1-PI39	140	164	243	243	137	137
1-PI40	140	164	221	227	128	137
1-PI41	168	184	227	227	137	137
1-PI42	140	146	221	227	137	137
1-PI43	140	174	243	243	137	137
1-PI44	140	164	243	243	137	137
1-PI45	140	146	227	227	137	137
1-PI46	140	140	227	227	119	125
1-PI47	164	174	227	227	137	137
1-PI48	164	174	197	221	137	137
1-PI49	164	164	227	227	137	137
1-PI50	140	146	221	227	137	143

	<i>Med737</i>	<i>Med737</i>	<i>MIT02</i>	<i>MIT02</i>	<i>MGE005</i>	<i>MGE005</i>
1-LA01	140	140	243	243	137	137
1-LA02	140	140	227	227	125	137
1-LA03	146	168	227	243	128	137
1-LA04	146	146	227	227	125	137
1-LA05	140	140	243	243	137	137
1-LA06	134	140	227	227	137	137
1-LA07	146	146	227	243	122	137
1-LA08	140	168	227	227	137	137

1-LA09	142	142	227	243	137	137
1-LA10	146	146	227	243	137	137
1-LA11	140	140	197	237	137	137
1-LA12	140	146	243	243	137	137
1-LA13	140	140	243	243	137	137
1-LA14	146	146	227	227	137	137
1-LA15	140	146	227	243	137	137
1-LA16	140	140	243	243	140	140
1-LA17	140	146	221	227	137	137
1-LA18	140	146	197	237	137	137
1-LA19	146	146	243	243	137	137
1-LA20	164	174	227	227	137	137
1-LA21	140	152	227	227	137	140
1-LA22	140	140	237	237	137	137
1-LA23	164	164	243	243	137	143
1-LA24	140	146	221	227	137	137
1-LA25	140	140	227	227	137	137
1-LA26	140	164	227	227	137	137
1-LA27	164	174	227	227	137	137
1-LA28	140	140	227	227	137	137
1-LA29	140	140	221	227	137	137
1-LA30	140	140	243	243	137	137
1-LA31	164	174	243	243	137	137
1-LA32	140	140	227	227	134	137
1-LA33	140	140	243	243	137	137
1-LA34	140	140	227	243	137	140
1-LA35	140	140	227	243	134	137
1-LA36	140	140	227	227	122	137
1-LA37	140	140	243	243	137	137
1-LA38	142	146	227	243	137	137
1-LA39	164	164	227	227	137	137
1-LA40	152	164	227	243	137	137
1-LA41	142	164	227	227	137	137
1-LA42	140	140	227	243	125	137
1-LA43	140	140	227	243	137	137
1-LA44	140	140	227	227	125	137
1-LA45	142	146	227	243	122	137
1-LA46	140	146	227	243	137	137
1-LA47	140	140	243	243	137	137
1-LA48	146	164	227	227	125	134
1-LA49	142	174	227	243	137	137
1-LA50	142	146	227	243	137	137

	<i>Med737</i>	<i>Med737</i>	<i>MIT02</i>	<i>MIT02</i>	<i>MGE005</i>	<i>MGE005</i>
1-CC01	140	146	227	243	122	134
1-CC02	146	146	227	243	137	137
1-CC03	140	140	227	243	125	137
1-CC04	140	146	243	243	113	137
1-CC05	140	140	243	243	125	137
1-CC06	146	146	227	243	125	137
1-CC07	140	140	243	243	137	137
1-CC08	140	146	243	243	113	128
1-CC09	140	146	197	221	137	137
1-CC10	140	140	227	243	137	137
1-CC11	140	146	227	227	137	137
1-CC12	164	168	243	243	125	137
1-CC13	140	140	237	243	137	137
1-CC14	146	152	243	243	137	137
1-CC15	146	146	243	243	137	137
1-CC16	140	164	243	243	137	137
1-CC17	164	168	227	243	137	137
1-CC18	168	168	197	227	122	137
1-CC19	164	164	227	227	137	137
1-CC20	140	146	221	243	119	137
1-CC21	140	146	243	243	137	137
1-CC22	140	146	227	227	137	137
1-CC23	140	140	237	237	137	137
1-CC24	140	140	243	243	137	137
1-CC25	140	174	227	227	137	137
1-CC26	146	146	227	227	119	137
1-CC27	164	164	227	237	134	137
1-CC28	140	140	227	227	137	137
1-CC29	168	168	227	227	137	137
1-CC30	140	184	227	227	128	137
1-CC31	168	174	227	227	137	137
1-CC32	146	146	227	243	137	137
1-CC33	140	140	237	237	137	143
1-CC34	146	146	243	243	137	137
1-CC35	140	140	227	227	137	137
1-CC36	140	140	227	227	137	137
1-CC37	140	146	227	243	122	137
1-CC38	134	140	227	227	137	137
1-CC39	140	140	243	243	137	137
1-CC40	140	140	227	227	134	137
1-CC41	140	152	227	227	137	137

1-CC42	140	146	237	237	137	137
1-CC43	164	164	227	243	137	137
1-CC44	140	140	243	243	137	137
1-CC45	140	140	237	243	137	137
1-CC46	164	164	227	227	137	137
1-CC47	140	140	243	243	137	137
1-CC48	140	146	227	227	119	137
1-CC49	140	140	227	237	137	137
1-CC50	140	140	227	227	137	143

	<i>Med737</i>	<i>Med737</i>	<i>MIT02</i>	<i>MIT02</i>	<i>MGE005</i>	<i>MGE005</i>
1-EC051	140	140	227	227	119	128
1-EC052	146	146	227	227	137	137
1-EC053	140	140	0	0	125	137
1-EC054	146	146	227	227	137	137
1-EC055	140	146	243	243	134	137
1-EC056	146	146	227	237	137	137
1-EC057	146	164	237	243	137	143
1-EC058	140	164	243	243	134	137
1-EC059	140	146	227	227	137	137
1-EC060	140	140	227	237	137	137
1-EC061	146	146	227	243	137	137
1-EC062	140	140	221	237	137	137
1-EC063	140	140	243	243	137	143
1-EC064	164	174	243	243	137	137
1-EC065	164	174	227	243	137	137
1-EC066	140	140	227	237	137	137
1-EC067	140	140	197	221	137	137
1-EC068	140	140	227	227	137	137
1-EC069	146	152	221	227	122	125
1-EC070	140	146	227	243	128	137
1-EC071	146	164	227	227	137	137
1-EC072	140	164	227	227	137	137
1-EC073	140	146	227	243	137	137
1-EC074	140	146	243	243	134	137
1-EC075	140	146	227	243	137	137
1-EC076	140	140	227	227	128	137
1-EC077	140	140	221	237	128	137
1-EC078	146	146	243	243	125	137
1-EC079	140	140	243	243	137	137
1-EC080	140	146	227	243	128	137

1-EC081	140	146	227	227	137	140
1-EC082	164	174	227	227	137	137
1-EC083	140	146	227	227	137	137
1-EC084	146	164	237	243	128	137
1-EC085	140	146	197	243	137	137
1-EC086	142	164	227	237	137	137
1-EC087	142	152	0	0	113	137
1-EC088	140	140	227	243	125	137
1-EC089	140	146	227	243	122	137
1-EC090	140	152	221	227	137	137
1-EC091	140	146	237	237	137	137
1-EC092	140	140	227	243	137	137
1-EC093	140	140	227	227	137	137
1-EC094	140	152	227	227	119	122
1-EC095	164	174	237	221	134	137
1-EC096	140	140	227	243	137	137
1-EC097	140	140	227	227	137	137
1-EC098	140	164	227	227	137	137
1-EC099	140	140	227	227	125	137
1-EC100	164	174	227	227	137	137

	<i>Med737</i>	<i>Med737</i>	<i>MIT02</i>	<i>MIT02</i>	<i>MGE005</i>	<i>MGE005</i>
1-CN01	140	140	227	243	137	137
1-CN02	140	140	243	243	137	137
1-CN03	142	164	227	243	137	137
1-CN04	140	140	243	243	137	137
1-CN05	140	140	197	197	137	137
1-CN06	146	146	221	227	134	137
1-CN07	140	140	227	243	137	137
1-CN08	146	146	227	227	137	137
1-CN09	140	152	227	243	137	137
1-CN10	140	140	227	227	137	137
1-CN11	146	146	243	243	137	137
1-CN12	140	140	227	227	134	137
1-CN13	140	164	197	197	125	137
1-CN14	140	152	227	227	137	140
1-CN15	140	146	227	227	137	137
1-CN16	164	164	197	197	125	137
1-CN17	140	164	227	243	137	137
1-CN18	140	140	227	227	137	137
1-CN19	142	164	227	243	137	137
1-CN20	140	146	227	243	137	149

1-CN21	140	140	227	227	137	143
1-CN22	140	140	243	243	125	134
1-CN23	164	164	227	243	134	137
1-CN24	140	140	227	243	137	137
1-CN25	134	140	221	221	137	137
1-CN26	142	152	227	227	134	137
1-CN27	140	140	221	221	137	137
1-CN28	140	140	227	243	137	137
1-CN29	164	168	227	243	137	137
1-CN30	134	134	243	243	137	137
1-CN31	140	164	243	243	137	137
1-CN32	164	164	227	243	137	137
1-CN33	146	146	227	243	137	137
1-CN34	184	184	227	227	134	137
1-CN35	146	146	227	227	137	137
1-CN36	140	140	227	227	137	137
1-CN37	146	146	227	227	137	137
1-CN38	142	164	227	243	137	137
1-CN39	146	146	227	227	134	137
1-CN40	140	140	243	243	125	140
1-CN41	140	140	243	243	125	125
1-CN42	140	140	227	227	134	140
1-CN43	140	146	227	227	134	137
1-CN44	146	164	227	227	137	137
1-CN45	140	140	243	243	137	137
1-CN46	140	146	243	243	134	137
1-CN47	146	146	243	243	137	137
1-CN48	140	140	227	227	134	137
1-CN49	140	140	227	243	125	137
1-CN50	140	146	227	227	137	137

	<i>Med737</i>	<i>Med737</i>	<i>MIT02</i>	<i>MIT02</i>	<i>MGE005</i>	<i>MGE005</i>
1-CH01	140	140	243	243	137	137
1-CH02	142	146	227	227	137	137
1-CH03	140	140	0	0	137	137
1-CH04	140	140	227	227	137	137
1-CH05	140	140	221	221	134	137
1-CH06	140	164	243	243	137	137
1-CH07	164	174	221	243	137	137
1-CH08	140	140	227	243	125	128
1-CH09	140	140	227	227	137	143
1-CH10	146	146	243	243	137	137

1-CH11	140	140	227	227	137	137
1-CH12	146	146	221	243	137	137
1-CH13	146	146	243	243	137	140
1-CH14	140	140	227	243	137	137
1-CH15	146	146	227	227	137	137
1-CH16	140	140	227	227	137	143
1-CH17	140	140	243	243	137	137
1-CH18	140	140	227	243	137	137
1-CH19	140	140	227	227	125	137
1-CH20	140	140	227	243	137	143
1-CH21	140	140	227	243	137	137
1-CH22	140	140	227	227	134	137
1-CH23	140	140	243	243	137	137
1-CH24	140	140	227	243	125	134
1-CH25	140	140	243	243	137	137
1-CH26	140	140	243	243	137	137
1-CH27	140	140	243	243	137	137
1-CH28	140	140	243	243	137	143
1-CH29	146	146	227	227	137	137
1-CH30	140	140	227	243	137	137
1-CH31	146	146	243	243	137	137
1-CH32	140	146	243	243	137	137
1-CH33	140	164	227	227	137	137
1-CH34	168	168	221	221	125	137
1-CH35	146	146	227	243	137	137
1-CH36	140	140	243	243	137	137
1-CH37	168	168	243	243	137	137
1-CH38	140	140	243	243	137	137
1-CH39	164	164	243	243	137	137
1-CH40	140	146	227	243	134	137
1-CH41	140	140	0	0	137	137
1-CH42	140	140	243	243	137	137
1-CH43	140	140	227	227	137	137
1-CH44	140	140	227	243	137	137
1-CH45	146	146	243	243	122	137
1-CH46	140	146	221	227	137	137
1-CH47	140	146	227	227	137	137
1-CH48	140	140	243	243	137	137
1-CH49	140	146	227	243	137	137
1-CH50	140	146	227	243	137	137

	<i>Med737</i>	<i>Med737</i>	<i>MIT02</i>	<i>MIT02</i>	<i>MGE005</i>	<i>MGE005</i>
1-EH051	0	0	227	243	137	137
1-EH052	140	140	243	243	122	137
1-EH053	174	184	0	0	137	137
1-EH054	140	140	227	227	134	137
1-EH055	140	140	243	243	134	137
1-EH056	140	164	227	243	137	137
1-EH057	140	140	221	221	137	137
1-EH058	164	164	243	243	125	137
1-EH059	140	140	227	243	134	134
1-EH060	140	140	221	221	137	137
1-EH061	140	140	243	243	137	137
1-EH062	122	164	227	227	0	0
1-EH063	142	142	227	227	137	137
1-EH064	142	142	243	243	137	137
1-EH065	0	0	227	227	0	0
1-EH066	0	0	0	0	0	0
1-EH067	0	0	227	227	119	122
1-EH068	0	0	243	243	0	0
1-EH069	140	140	227	243	137	143
1-EH070	0	0	0	0	137	137
1-EH071	0	0	227	227	0	0
1-EH072	0	0	227	227	0	0
1-EH073	0	0	243	243	0	0
1-EH074	0	0	0	0	137	137
1-EH075	140	140	227	243	137	137
1-EH076	140	140	227	227	137	137
1-EH077	0	0	243	243	0	0
1-EH078	0	0	227	227	0	0
1-EH079	0	0	227	243	134	137
1-EH080	164	164	227	227	137	137
1-EH081	0	0	243	243	0	0
1-EH082	140	140	227	227	137	137
1-EH083	0	0	227	227	137	137
1-EH084	0	0	243	243	137	137
1-EH085	140	164	243	243	137	137
1-EH086	140	146	243	243	137	137
1-EH087	146	146	227	227	137	137
1-EH088	146	164	227	243	137	137
1-EH089	140	146	197	227	137	137
1-EH090	140	140	227	243	137	137
1-EH091	140	140	227	227	137	137

1-EH092	140	146	227	243	134	137
1-EH093	140	146	227	227	137	137
1-EH094	140	140	227	227	134	143
1-EH095	140	146	227	243	137	137
1-EH096	142	146	221	227	137	137
1-EH097	140	146	221	227	137	137
1-EH098	146	146	243	243	137	137
1-EH099	140	146	227	227	137	137
1-EH100	140	140	227	227	137	137

	<i>Med737</i>	<i>Med737</i>	<i>MIT02</i>	<i>MIT02</i>	<i>MGE005</i>	<i>MGE005</i>
2-CB01	146	146	237	243	119	137
2-CB02	164	164	227	227	137	137
2-CB03	146	168	0	0	137	137
2-CB04	146	164	197	243	137	137
2-CB05	146	164	227	227	137	140
2-CB06	142	142	197	243	137	137
2-CB07	164	164	243	243	137	137
2-CB08	168	168	221	227	134	137
2-CB09	164	174	221	227	137	137
2-CB10	140	146	227	243	137	137
2-CB11	168	174	243	243	137	137
2-CB12	164	164	227	227	134	137
2-CB13	146	168	227	243	137	137
2-CB14	142	168	197	227	137	137
2-CB15	146	146	197	221	137	137
2-CB16	146	146	227	227	137	137
2-CB17	146	146	227	243	137	140
2-CB18	140	146	197	221	137	137
2-CB19	146	164	227	227	137	137
2-CB20	164	164	221	221	128	137
2-CB21	140	140	227	227	137	137
2-CB22	164	164	243	243	137	137
2-CB23	140	164	243	243	137	137
2-CB24	164	164	243	243	137	137
2-CB25	146	164	227	243	137	137
2-CB26	140	164	243	243	137	137
2-CB27	146	164	243	243	134	137
2-CB28	164	164	243	243	137	137
2-CB29	142	164	227	227	125	137
2-CB30	140	168	227	243	137	137
2-CB31	140	146	243	243	122	137

2-CB32	146	168	227	227	137	137
2-CB33	146	168	243	243	122	137
2-CB34	146	146	227	227	137	137
2-CB35	168	168	227	227	137	137
2-CB36	140	146	221	243	137	140
2-CB37	146	146	197	243	122	137
2-CB38	140	168	227	243	137	137
2-CB39	152	152	221	227	137	143
2-CB40	146	146	243	243	137	137
2-CB41	140	146	227	243	137	143
2-CB42	164	174	243	243	137	137
2-CB43	146	146	227	227	128	137
2-CB44	140	174	197	221	137	137
2-CB45	164	164	243	243	137	137
2-CB46	146	146	221	227	137	137
2-CB47	146	164	227	227	125	137
2-CB48	146	164	227	243	137	137
2-CB49	140	168	227	227	137	137
2-CB50	146	164	237	243	125	137

	<i>Med737</i>	<i>Med737</i>	<i>MIT02</i>	<i>MIT02</i>	<i>MGE005</i>	<i>MGE005</i>
2-CP01	164	164	227	227	134	137
2-CP02	140	140	243	243	137	137
2-CP03	134	164	227	227	137	137
2-CP04	146	164	227	227	137	137
2-CP05	140	164	227	243	137	137
2-CP06	140	140	243	243	137	137
2-CP07	146	164	227	227	137	137
2-CP08	164	164	227	227	137	137
2-CP09	146	164	227	227	137	137
2-CP10	146	146	227	227	137	137
2-CP11	146	146	227	227	137	137
2-CP12	140	164	227	227	134	137
2-CP13	146	146	227	227	137	137
2-CP14	146	146	237	237	137	143
2-CP15	146	146	237	243	122	134
2-CP16	164	164	227	243	137	137
2-CP17	140	164	243	243	137	137
2-CP18	140	164	227	227	137	143
2-CP19	140	146	197	197	134	137
2-CP20	164	164	227	227	137	137
2-CP21	140	168	237	237	137	137

2-CP22	146	146	221	221	113	137
2-CP23	146	146	243	243	137	137
2-CP24	140	140	227	243	137	137
2-CP25	140	140	227	227	137	137
2-CP26	146	164	243	243	137	137
2-CP27	146	146	227	227	137	137
2-CP28	146	146	227	243	125	137
2-CP29	146	146	243	243	125	137
2-CP30	146	146	227	243	125	128
2-CP31	146	164	227	227	137	137
2-CP32	146	164	227	227	128	140
2-CP33	146	164	227	227	137	143
2-CP34	164	164	227	227	137	137
2-CP35	140	164	227	227	137	137
2-CP36	140	140	227	227	134	137
2-CP37	142	164	227	227	134	140
2-CP38	140	140	243	243	137	137
2-CP39	140	164	243	243	137	137
2-CP40	140	164	227	227	113	137
2-CP41	164	164	227	227	122	137
2-CP42	146	164	227	227	137	137
2-CP43	142	164	227	243	137	137
2-CP44	140	168	0	0	137	137
2-CP45	146	146	227	243	128	137
2-CP46	146	146	227	243	137	137
2-CP47	164	174	221	227	137	140
2-CP48	140	164	221	237	137	137
2-CP49	146	152	227	227	137	137
2-CP50	140	164	227	227	137	137

ANEXO 4: Frecuencias alélicas para tres loci microsatélite en *M. chilensis* de once localidades del Sur de Chile

Locus	Localidades										
Med737	3-IP	1-PA	1-PI	1-LA	1-CC	1-EC	1-CN	1-CH	1-EH	2-CB	2-CP
122		1,00							1,47		
134			1,00	1,00	1,00		3,00				1,00
140	19,00	57,00	40,00	52,00	52,00	51,00	51,00	66,00	57,35	13,00	24,00
142	1,00	4,00		7,00		2,00	4,00	1,00	7,35	4,00	2,00
146	8,00	18,00	35,00	21,00	24,00	26,00	22,00	23,00	19,12	35,00	36,00
152	6,00	8,00	3,00	2,00	2,00	4,00	3,00			2,00	1,00
164	37,00	8,00	12,00	11,00	11,00	12,00	14,00	5,00	11,76	29,00	33,00
168	12,00	2,00	4,00	2,00	7,00		1,00	4,00		13,00	2,00
174	13,00	2,00	3,00	4,00	2,00	5,00		1,00	1,47	4,00	1,00
184	4,00		2,00		1,00		2,00		1,47		
MIT02	3-IP	1-PA	1-PI	1-LA	1-CC	1-EC	1-CN	1-CH	1-EH	2-CB	2-CP
197	7,00	4,00	1,00	2,00	2,00	2,08	6,00		1,09	7,14	2,04
221	2,00	7,00	14,00	3,00	2,00	6,25	5,00	7,29	6,52	10,20	4,08
227	45,00	51,00	51,00	52,00	46,00	52,08	52,00	38,54	53,26	39,80	62,24
237	3,00	2,00	4,00	4,00	10,00	11,46				2,04	6,12
243	43,00	36,00	30,00	39,00	40,00	28,13	37,00	54,17	39,13	40,82	25,51
MGE005	3-IP	1-PA	1-PI	1-LA	1-CC	1-EC	1-CN	1-CH	1-EH	2-CB	2-CP
113		2,00			2,00	1,00					2,00
119		2,00	2,00		3,00	2,00			1,25	1,00	
122	5,00	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00		1,00	2,50	3,00	2,00
125	4,00	4,00	7,00	5,00	4,00	5,00	7,00	4,00	1,25	3,00	3,00
128	3,00	2,00	2,00	1,00	2,00	6,00		1,00		2,00	3,00
134	2,00	5,00		3,00	3,00	4,00	11,00	4,00	8,75	3,00	6,00
137	85,00	79,00	82,00	83,00	81,00	76,00	77,00	85,00	83,75	83,00	78,00
140		2,00	2,00	4,00		1,00	3,00	1,00		3,00	3,00
143	1,00	1,00	2,00	1,00	2,00	2,00	1,00	4,00	2,50	2,00	3,00
149							1,00				