

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *MYTILUS* UTILIZANDO
MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIALES Y NUCLEARES**

Tesis para optar al grado de Magíster en Alimentos, Mención Gestión Calidad e
Inocuidad de los Alimentos

Pía Loreto González Pérez

Directores de Tesis
Dra. María Angélica Larraín B.
Dr. Cristián Araneda T.

SANTIAGO CHILE
2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por la candidata:

PIA LORETO GONZÁLEZ PÉREZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de *Magister en Alimentos, mención Gestión, Calidad e Inocuidad de los Alimentos*, en el examen privado rendido el día_____

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. María Angélica Larraín B. _____

Dr. Cristián Araneda T. _____

COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS:

Dra. Pilar Oviedo H. _____

Dr. David Veliz B. _____

Dr. Ricardo Galleguillos G. _____

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, Dra. María Angélica Larraín B. por su apoyo, confianza y compromiso, y Dr. Cristian Araneda T. por su orientación, apoyo y buena disposición.

A la presidenta de la comisión evaluadora, Dra. Pilar Oviedo H. y a los demás integrantes de ésta: Dr. Ricardo Galleguillos G. y Dr. David Veliz B., por sus recomendaciones, correcciones y dedicación para mejorar este trabajo.

A Dr. Eduardo Tarifeño – Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas – por proporcionar muestras de *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*. A Dra. Alicia Rodríguez – Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas – y Dr. Santiago Aubourg – Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC) – Vigo, España por proporcionar muestras comerciales de *M. galloprovincialis*. Al Dr. Carlos Varela – Universidad de Los Lagos – por proporcionar contactos con mitilicultores. A Eugenio Yolota y Julio Bañads de Granja Marina Chasquear, Marcela Cárcamo de Cultivos Quillaípe Armando Salinas de Aguas del Sur S.A., que permitieron muestras en sus cultivos. A José Villarroel por coleccionar la muestra del banco natural.

A Dr. Elie Poulin –Universidad de Chile, Facultad de Ciencias por facilitar el uso del espectrofotómetro NanoDrop. A Raquel Becerra por su ayuda en extracción de ADN y preparación de soluciones. A Claudio Pérez, Ivonne Lazano, Dr. Juric Wasyck, Dra. Natalia Lam, Felipe Gilberto y María Eugenia López por sus recomendaciones para mejorar la presentación de este trabajo y la ayuda brindada en la solución de problemas varios a lo largo del trabajo en laboratorio. A Carla Uribe por su preocupación y apoyo.

A mi madre por sus constantes palabras de aliento, a mi padre por su apoyo y a mis hermanos por su confianza. A mis amigos por su motivación. A César Avendaño por su orientación, afecto y entrega ayudandome en el proceso.

A Universidad de Chile, Vice rectoría de Investigación - Proyecto Domeyko Alimentos y CONICYT – Beca de apoyo a la realización de la tesis doctoral 2011 AT 24110174 por financiamiento de este trabajo.

A Dirección general de graduados de la Universidad de Chile por las becas de arancel otorgadas durante mi permanencia en el programa de Magíster en Alimentos, Mención Gestión Calidad e Inocuidad de los Alimentos.

TABLA DE CONTENIDOS

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1. Mitilicultura en Chile	1
1.2. Mitílidos	2
1.3. Calidad de alimentos: Trazabilidad y Autenticidad	4
1.4. Análisis de DNA, Marcadores Moleculares	7
1.5. Marcadores Moleculares vinculados a la Identificación de Mitílidos.....	8
HIPOTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
2. METODOLOGIA	13
2.1. Obtención de las muestras.....	13
2.2. Extracción de DNA	15
2.3. Genotipado.....	16
2.4. Identificación de especie	16
2.4.1. Marcador nuclear.....	18
2.4.1.1. Intrón 1 del Gen de la Actina (<i>mac -1</i>).....	18
2.4.2. Marcadores mitocondriales	18
2.4.2.1. RFLP-PCR del Gen de la Enzima <i>Citocromo Oxidasa I</i> (COI <i>Xba</i> I)....	18
2.4.2.2. RFLP-PCR del Gen de <i>mtDNA 16s rRNA</i>	18
2.5. Análisis estadístico	19
2.5.1 Equivalencia	19
2.5.2 Calidad de la identificación.....	20
2.5.3.- Determinación del panel de marcadores más informativo.....	21
2.5.4.- Capacidad de identificación en productos procesados	21
3. RESULTADOS	22
3.1. Marcador nuclear	22

3.1.1. Intrón 1 del Gen de la Actina (<i>mac -1</i>).....	22
3.2. Marcadores mitocondriales	30
3.2.1. RFLP-PCR del Gen de la Enzima Citocromo Oxidasa I (COI <i>Xba</i> I).....	31
3.2.2. RFLP-PCR del Gen de <i>mtDNA 16s rRNA</i> (16s).....	38
3.3. Determinación del panel de marcadores más informativo.....	46
3.4. Asignación de híbridos	68
3.5. Evaluar la capacidad de identificación de la especie de los marcadores moleculares en productos procesados	69
4. DISCUSIÓN	72
4.1. Evaluación de la equivalencia y calidad de identificación de marcadores...	72
4.2. Determinación del panel de marcadores más informativo.....	79
4.3. Evaluar la capacidad de discriminar distintas especies de los marcadores moleculares en productos procesados	81
5. CONCLUSIONES	84
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
7. ANEXOS	94
7.1. ANEXO 1: Método de extracción de DNA fenol cloroformo para <i>Mytilus</i>	94
7.2. ANEXO 2: Identificación del género	97
7.3. ANEXO 3: Me 15-16 <i>AcI</i>	97
7.4. ANEXO 4: <i>mac -1</i>	100
7.5. ANEXO 5: COI <i>Xba</i> I	102
7.6. ANEXO 6: <i>mtDNA 16 rRNA</i>	105
7.7. ANEXO 7: Extracción de DNA en muestras de productos procesados	69
7.8. ANEXO 8: Genotipos de individuos de los grupos de estudios.....	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lugar y Fecha de Muestreo, Tipo y número de individuos de cada especie	14
Tabla 2. Lugar y fecha de muestreo de los Presuntos híbridos detectados de acuerdo con el análisis de RFLP-PCR Me 15-16 <i>Acil</i>	14
Tabla 3. Procedencia, presentación y número de individuos analizados en distintas presentaciones de mejillones procesados en conserva.	15
Tabla 4. Frecuencias alélicas para el locus <i>mac-1</i> en los grupos de estudio	23
Tabla 5. Evaluación de equivalencia y calidad de identificación para el marcador <i>mac-1</i> según la especie mediante el criterio frecuentista de GeneClass2..	24
Tabla 6. Reasignación de individuos según especie basada en el marcador <i>mac-1</i> usando criterio frecuentista en programa GeneClass2.	26
Tabla 7. Evaluación de equivalencia y calidad de identificación de especie en el marcador <i>mac-1</i> según el grupo de estudio	27
Tabla 8. Reasignación de individuos al grupo de estudio según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con el marcador <i>mac-1</i>	28
Tabla 9. Asignación de los presuntos híbridos según Me 15-16 <i>Acil</i> a las especie con el marcador <i>mac-1</i> según criterio frecuentista de GeneClass2	30
Tabla 10. Identificación de la especie de los individuos de cada grupo con los marcadores mitocondriales COI <i>XbaI</i> y <i>mtDNA 16S rRNA</i>	31

Tabla 11. Evaluación de equivalencia y calidad de identificación del marcador RFLP COI <i>Xba</i> I según la especie	33
Tabla 12. Reasignación de individuos según especie basado en el marcador RFLP COI <i>Xba</i> I usando el criterio frecuentista en programa GeneClass2.	34
Tabla 13. Equivalencia y calidad de identificación del grupo de estudio (especie y lugar) del marcador RFLP COI <i>Xba</i> I	34
Tabla 14. Reasignación de individuos con el marcador RFLP COI <i>Xba</i> I al grupo de estudio según el criterio frecuentista en programa GeneClass2	35
Tabla 15. Tamaño de los fragmentos e identificación de la especie de los presuntos híbridos detectados con los marcadores mitocondriales COI <i>Xba</i> I.	37
Tabla 16. Equivalencia y calidad de identificación de la especie del marcador RFLP <i>mtDNA</i> 16s <i>rRNA</i>	41
Tabla 17. Reasignación de individuos a especie con el marcador <i>mtDNA</i> 16s <i>rRNA</i> usando criterio frecuentista en programa GeneClass2.....	42
Tabla 18. Evaluación de equivalencia y calidad de identificación de especie en el marcador <i>mtDNA</i> 16s <i>rRNA</i> para el grupo de estudio.....	43
Tabla 19. Reasignación de individuos a grupo de estudio con el marcador <i>mtDNA</i> 16s <i>rRNA</i> usando el criterio frecuentista en programa GeneClass2.	44
Tabla 20. Tamaño de los fragmentos e identificación de la especie de los presuntos híbridos detectados con el marcador mitocondrial <i>mtDNA</i> 16S <i>rRNA</i>	45

Tabla 21.1. Número y porcentaje de individuos correctamente reasignados y evaluación de capacidad de identificación de la especie de los marcadores moleculares en conjunto y sus combinaciones	48
Tabla 21.2. Número y porcentaje de individuos correctamente reasignados y evaluación de capacidad de identificación de la especie de los marcadores moleculares en conjunto y sus combinaciones (continuación).....	49
Tabla 22.1. Reasignación de individuos a especie con cada combinación de marcadores moleculares usando el criterio frecuentista en programa GeneClass2.....	51
Tabla 22.2. Reasignación correcta o incorrecta de individuos según especie basado en el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con cada combinación de marcadores moleculares (continuación).....	52
Tabla 22.3. Reasignación correcta o incorrecta de individuos según especie basado en el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con cada combinación de marcadores moleculares (continuación).....	53
Tabla 22.4. Reasignación correcta o incorrecta de individuos según especie basado en el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con cada combinación de marcadores moleculares (continuación).....	54
Tabla 23.1. Número y porcentaje de individuos correctamente reasignados y evaluación de la equivalencia y calidad de identificación en los grupos de estudio con los marcadores moleculares en conjunto y sus combinaciones	56
Tabla 23.2. Número y porcentaje de individuos correctamente reasignados y evaluación de la equivalencia y calidad de identificación en los grupos de estudio con los marcadores moleculares en conjunto y sus combinaciones (continuación).....	58

Tabla 24.1. Reasignación de individuos correcta e incorrecta de grupos de estudio analizadas según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con todos los marcadores moleculares en conjunto y combinados.....	60
Tabla 24.2. Reasignación de individuos correcta e incorrecta de grupos de estudio analizadas según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con todos los marcadores moleculares en conjunto y combinados (continuación).	61
Tabla 24.3. Reasignación de individuos correcta e incorrecta de grupos de estudio analizadas según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con todos los marcadores moleculares en conjunto y combinados (continuación).	62
Tabla 24.4. Reasignación de individuos correcta e incorrecta de grupos de estudio analizadas según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con todos los marcadores moleculares en conjunto y combinados (continuación).	63
Tabla 24.5. Reasignación de individuos correcta e incorrecta de grupos de estudio analizadas según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con todos los marcadores moleculares en conjunto y combinados (continuación).	64
Tabla 24.6. Reasignación de individuos correcta e incorrecta de grupos de estudio analizadas según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con todos los marcadores moleculares en conjunto y combinados (continuación).	65
Tabla 25. Identificación de especie en muestras procesadas por medio del marcador RFLP PCR Me 15-16 <i>AcI</i>	70
Tabla 26. Identificación de especie en muestras procesadas por medio del marcador RFLP PCR COI <i>XbaI</i>	71

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Tamaño de los alelos obtenidos del marcador <i>mac – 1</i>	23
Figura 2. Análisis de correspondencia realizado sobre la base de las frecuencias alélicas del marcador <i>mac-1</i>	29
Figura 3. Gel Poliacrilamida con Productos de PCR-RFLP COI <i>Xba I</i>	32
Figura 4. Esquema del resultado según especie de la Digestión con Enzimas de Restricción del RFLP <i>mtDNA 16s rRNA</i> , incluyendo el alelo nuevo.....	39
Figura 5. Gel Poliacrilamida con Productos de PCR-RFLP <i>mtDNA 16 rRNA</i>	40
Figura 6. Porcentaje de asignación correcta del panel de todos los marcadores moleculares ensayados considerando el marcador de referencia Me 15-16 <i>Acil</i> empleando el Programa BELS. A: Individuos agrupados según especie y la localidad donde fueron obtenidas. B: Individuos agrupados según especie.....	66
Figura 7. Porcentaje de asignación correcta del panel de los marcadores moleculares ensayados sin considerar el marcador de referencia Me 15-16 <i>Acil</i> . empleando el Programa BELS C: Individuos agrupados según especie y la localidad donde fueron obtenidas. D: Individuos agrupados según especie.....	68

RESUMEN

Los mitílidos son una de las especies de bivalvos más cultivadas y comercializadas. Existen variedad de mercados que exigen la veracidad de la información contenida en el etiquetado de estos productos, es por ello que independientemente del estatus taxonómico que puedan tener los mitílidos presentes en Chile, es importante para la industria establecer un etiquetado veraz y que evidencie de manera fiel la procedencia e identificación de la especie del producto que será consumido.

Se realizó una evaluación de los marcadores moleculares usados internacionalmente para la identificación de especies de mitílidos en muestras provenientes de Chile, Canadá y Galicia para determinar la equivalencia y calidad de identificación de estos en relación al gen de la proteína adhesiva polifenólica (Me 15-16 *Acil*). Además, se evaluó la capacidad de identificar especies con los marcadores Me 15-16 *Acil* y *COI Xbal* en productos procesados.

Al evaluar los marcadores moleculares se pudo concluir que el panel más informativo de marcadores para este propósito son Me 15-16 *Acil* y *mac-1*, utilizados en conjunto. El marcador nuclear *mac-1* es equivalente a Me 15-16 *Acil* en la distinción de la especie *M. galloprovincialis*. Por su parte el marcador mitocondrial *COI Xbal* y *mtDNA 16s rRNA* resulta ser totalmente equivalente a Me 15 -16 *Acil* para distinguir a *M. chilensis* de las demás especies.

Es posible utilizar los marcadores moleculares Me 15 16 *Acil* y *COI Xbal* empleados en productos procesados al natural, en ahumado en aceite y congelados. La amplificación de fragmentos grandes en productos procesados como los marcadores *mac-1* y *mtDNA 16s rRNA* no resulta adecuada. Se recomienda el uso de Me 15-16 *Acil* en productos procesados.

ABSTRACT

The mussels are one of the most cultivated and world wide commercialized species of bivalves. There are variety of countries of destination that require the accuracy of the information contained in the labeling of these products, which is why regardless of the taxonomic status that the mussel species have in Chile, it is important for the industry to establish a truthful labeling and that represent accurately the origin and identification of the species of the product to be consumed.

An evaluation of the most internationally used molecular markers for species identification in mussels samples from Chile, Canada and Galicia was performed to determine the equivalence and quality of identifying these markers comparing them with the gene of the *polyphenolic adhesive protein* (Me 15-16 *Acil*). It was evaluated as well the ability to identify species with markers Me *Acil* 15-16 and COI *Xbal* in processed products .

The most informative panel of markers evaluated were Me 15-16 *Acil* and *mac-1* combined. The nuclear marker *mac-1* is equivalent to Me 15-16 *Acil* in identified *M. galloprovincialis*. Meanwhile mitochondrial marker COI *Xbal* and *mtDNA 16s rRNA* are fully equivalent to Me 15 -16 *Acil* to identified *M. chilensis* from other species.

Me 15 16 *Acil* and COI *Xbal* can be used processed raw, smoked in oil and frozen. The amplification of large fragments from markers like *mac -1* and *mtDNA 16s rRNA* in processed products is not applicable. The use of Me 15-16 *Acil* in processed products is recommended.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Mitilicultura en Chile

La mitilicultura es el nombre que recibe la actividad de cultivo de moluscos bivalvos de la familia *Mytilidae*. Dentro de las especies de mitílidos más importantes que se cultivan en Chile se encuentra el Choro Zapato (*Choromitilus chorus*) que en el año 2009 representó el 0,5% de la producción total de moluscos en el país, la Cholga (*Aulacomya ater*) con un 1,8% y el Mejillón Chileno o Chorito (*Mytilus chilensis*) con un 97,8% (GUERRERO 2006; SERNAPESCA 2012)

La producción mundial de choritos corresponde a un 20% de producción silvestre y un 80% de cultivos. De acuerdo a estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), unos 50 países generan la oferta mundial de mitílidos, que alcanzó para el año 2009 la cantidad de 6.186.995 toneladas. Entre los principales países cultivadores se encuentran China, Noruega, Tailandia, Vietnam, Estados Unidos, Dinamarca, Chile, Canadá, España y Holanda (FAO 2005; FAO 2011).

Las principales formas de presentación de los mitílidos procesados en Chile son congelado y en conserva, y en muy bajas cantidades cocido o fresco-refrigerado y en su mayoría, es exportado (URIARTE 2008). Actualmente, más del 90% de los productos elaborados se destinan a mercados internacionales y los principales destinos son: España, Portugal, Italia, Argentina y Estados Unidos. Según la Asociación Gremial de Mitilicultores de Chile (AMICHILE), se exportaron 38.571 toneladas netas, de las cuales 35.716 toneladas corresponden al producto congelado y 2.854 toneladas al producto en conserva (AMICHILE 2010; CORFO 2003; URIARTE 2008) En el año 2011, se notificó un desembarque total de choritos en el país de 288.995 toneladas (SERNAPESCA 2012).

Según AMICHILE y la Dirección de Promoción de Exportaciones (PROCHILE), la estrategia del sector se orientará, entre otras, hacia el desarrollo y posicionamiento de la marca mejillón chileno, para mejorar el precio de comercialización por medio de la incorporación de mayores estándares de calidad, valor agregado y con ello posicionar y distinguir el producto de la competencia (AQUA 2009).

1.2. Mitílicos

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

El género *Mytilus* incluye un complejo de 3 especies emparentadas, *M. edulis* L. 1758, *M. trossulus* Gould 1850 y *M. galloprovincialis* Lamark 1819, que forman el complejo *M. edulis* (INOUE *et al.* 1995). Estas tres especies están distribuidas en todo el mundo y han formado zonas híbridas que se superponen (WONHAM 2004). *M. trossulus* se limita a las regiones boreales y sub-boreales. *M. edulis* y *M. galloprovincialis* están presentes en las regiones templadas y frías de ambos hemisferios. Según la información obtenida de los perfiles de alozimas, marcadores de DNA y descripción morfológica, los ejemplares de *M. galloprovincialis* y *M. edulis* que se encuentran en el Hemisferio Sur resultan ser distintos de los individuos de estas mismas especies del

Hemisferio Norte (BORSA *et al.* 2012). Por otra parte, también se ha propuesto la existencia de una especie particular endémica de Chile (*M. chilensis*), cuya posición en la taxonomía de los mitílidos conocidos es controversial a causa de la proximidad fenotípica y genética con otras especies del género (BORSA *et al.* 2012; CÁRCAMO *et al.* 2005; McDONALD *et al.* 1991).

Recientemente se han realizado estudios que proponen que *M. chilensis* es una especie diferente dentro del género. Por ejemplo, Ouagajjou *et al.* (2011) desarrollaron nueve microsatélites para *M. chilensis* sugiriendo que es una especie válida que se distingue del resto de las especies conocidas, en otro estudio Seguel (2011) realizó una evaluación del estatus taxonómico de *M. chilensis* mediante el gen mitocondrial *citocromo oxidasa I (COI)* obteniendo conclusiones similares (OUAGAJJOU *et al.* 2011; SEGUEL 2011). En otros estudios en cambio, como el de Daguin y Borsa (2000) utilizando el marcador del gen de la *proteína adhesiva polifenólica Glu-5'* y el intrón del gen de la *actina mac-1*, encontraron que las muestras de Chile eran casi idénticas al *M. galloprovincialis* del Mediterráneo. En un trabajo posterior los mismos autores afirman que la especie presente en las costas chilenas corresponde a la variante del Hemisferio Sur de *M. edulis* y en particular, las poblaciones muestreadas en el centro-sur de Chile mostraron evidencia de ligera introgresión de *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur (BORSA *et al.* 2012; DAGUIN y BORSA 2000). Por otro lado, Hilbish *et al.* (2000) utilizaron partidores basados en RFLP del gen mitocondrial 16s DNA y con las endonucleasas *EcoRV* y *SpeI*, encontraron una gran similitud entre los mejillones del Hemisferio Sur y *M. edulis* y *M. galloprovincialis* del Hemisferio Norte (HILBISH *et al.* 2000).

Independientemente del estatus taxonómico que puedan tener los mitílidos presentes en Chile, es importante para la industria establecer un etiquetado veraz y que establezca de manera fiel la procedencia e identificación del producto que será consumido. Por tanto resulta ser un tema de interés normativo y comercial el poder

diferenciar el *M. galloprovincialis* del Hemisferio Norte o mejillón de Galicia, del mejillón chileno. Es por ello que se han desarrollado técnicas moleculares para diferenciar ambas especies (FERNANDEZ-TAJES *et al.* 2011; REGO *et al.* 2002; SANTA CLARA *et al.* 2006).

1.3. Calidad de alimentos: Trazabilidad y Autenticidad

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

Hoy en día, los consumidores prestan mayor atención a la calidad alimentaria y los temas de inocuidad. Se han vuelto más exigentes, en particular en lo que respecta a la trazabilidad y el uso de etiquetado detallado de los productos, debido a que con el incremento en la complejidad de la industria, desean conocer el origen, las transformaciones durante el procesamiento y la distribución de los productos alimenticios (ARRIAGADA 2005; BARBUTO *et al.* 2010).

Por las razones antes mencionadas, las autoridades gubernamentales y los sectores productivos, principalmente de países desarrollados, se han visto en la necesidad de asegurar al consumidor garantías mínimas de inocuidad, calidad e información a través de la formulación de reglamentos y normativas que incorporan la trazabilidad y autenticación como herramientas para lograr estos objetivos. Hoy día, la trazabilidad está ampliamente reconocida como la base de cualquier sistema moderno de control de inocuidad alimentaria, integrando aspectos sanitarios y de higiene de los alimentos (CAPORALE *et al.* 2001). Una definición muy extendida para 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).

Generalmente se usan indistintamente diversos términos para referirse a la trazabilidad, como son autenticación, certificación de productos, marcas y controles de calidad. Muchas veces se ha producido una confusión entre los conceptos de trazabilidad y de identificación de la especie, no obstante, hay que saber diferenciarlos ya que aunque todos forman parte de un sistema de trazabilidad, no pueden ser considerados sinónimos (LÓPEZ *et al.* 2003).

En lo que respecta a la trazabilidad de productos del mar, se puede considerar tres niveles diferentes los cuales son: Identificación de la especie, determinación del origen geográfico y seguimiento a través de la cadena alimentaria (OGDEN 2008). En esta tesis se abordará la identificación de las especies o también denominada autenticación. La presencia de esta información puede marcar la diferencia entre un producto y otro, durante el proceso de compra que hace el consumidor (CABEZAS 2007).

En lo que respecta a las políticas de rotulación de productos pesqueros, algunos países han establecido sus propias reglamentaciones. En 2002, en la Unión Europea (UE) entraron en vigencia las regulaciones (CE) N° 104 y (CE) N° 2065 que establecen la obligatoriedad de informar en el rotulado el nombre científico del producto; el origen y el método de producción (acuicultura o capturados en el medio natural) para todos los productos pesqueros y acuícolas (JACQUET y PAULY 2008; UNION EUROPEA 2000; UNION EUROPEA 2001).

Hay varios factores que se consideran en la rotulación de productos pesqueros, tales como: (a) la identidad de las especies, (b) el país de origen, (c) método de producción, (d) las posibles etiquetas ecológicas. Dado que los consumidores no pueden

asegurarse por sus propios medios que los productos que consumen están debidamente rotulados, confían en que las autoridades verifiquen la veracidad de la información contenida en la etiqueta. El rotulado incorrecto de productos pesqueros afecta negativamente al comercio y a los consumidores en términos de precio, garantía de inocuidad del producto, además limita su capacidad para elegir productos elaborados respetando el medio ambiente. Un etiquetado incorrecto debilita las regulaciones de importación/exportación de éstos productos y no permite que los consumidores tomen decisiones informadas en relación a la explotación racional de los recursos acuícolas (JACQUET y PAULY 2008).

Considerando todas las implicancias respecto a la veracidad del etiquetado de los alimentos, es importante considerar que al momento de someterlos a procesamiento, la identificación basada en las características morfológicas resulta insuficiente, lo que puede conllevar a casos de sustitución de especies o fraude comercial, porque no es posible verificar visualmente la veracidad de lo declarado en el etiquetado (AGUILERA-MUÑOZ *et al.* 2008).

La identificación de especies de organismos vivos y sus productos derivados mediante metodologías basadas en el estudio del ácido desoxirribonucleico (DNA), y surge como una poderosa herramienta en la autenticación de los productos. La molécula de DNA es variable entre los individuos de una misma especie por lo que ésta permite distinguirlos. Otras características importantes del DNA son: a) relativamente inalterable durante la vida del organismo; b) parcialmente estable frente a diferentes tratamientos de elaboración de alimentos y c) está presente en prácticamente cada célula del organismo (AGUILERA-MUÑOZ *et al.* 2008; DALVIT *et al.* 2007). En el pasado, las pruebas de autenticidad de los productos pesqueros se realizaban utilizando técnicas basadas en el análisis de proteínas. Sin embargo, éstas con frecuencia no logran una precisión cercana al 100% y tienen un poder de identificación limitada. En

consecuencia, los métodos basados en análisis de ácidos nucleicos son los más usados actualmente para la identificación de especies a causa de su mayor especificidad y sensibilidad. Se ha iniciado la aplicación de estos métodos para la trazabilidad (MALDINI *et al.* 2006).

1.4. Análisis de DNA, Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares corresponden a una amplia gama de herramientas para análisis directo e indirecto del DNA, que han sido fuertemente desarrolladas en las últimas décadas. Estas herramientas permiten visualizar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de cambio en la molécula de DNA en las poblaciones a través del tiempo evolutivo. A esta variación genética detectada se le conoce como polimorfismo, y es lo que permite separar grupos, poblaciones, cepas, especies o grupos taxonómicos mayores. El objetivo del uso de marcadores moleculares es identificar variantes polimórficas que permitan discriminar entre los grupos bajo estudio, es decir, son herramientas que permiten obtener una marca que diferencia un grupo de otro (ASTORGA 2008).

El uso de marcadores de DNA como una solución para los problemas de autenticidad y trazabilidad resulta atractivo porque pueden ser utilizados tomando una muestra del producto en cualquier etapa a lo largo de la cadena alimentaria (HAYES *et al.* 2005; MALDINI *et al.* 2006).

Desde la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 1989, se han desarrollado muchos tipos de marcadores (DALVIT *et al.* 2007). Dentro de las diversas herramientas moleculares podemos destacar RFLP (*Restriction fragment length polymorphic*); RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*); AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*); Microsatélites (SSR Simple sequence repeats) ó STR

(Short tandem repeats)); SNP (*Single nucleotide polymorphism*) y EST (*Expressed sequence tags*). La aplicación de estas herramientas es muy amplia y la elección de alguno de estos métodos moleculares está dada por el tipo de situación a resolver. Los marcadores moleculares aplicados a la acuicultura han permitido: caracterizar la diversidad genética de un grupo, identificar especies y cepas, excluir paternidad, conocer el parentesco genético, asignar individuos a poblaciones, apoyar la autenticación y trazabilidad, identificar loci asociados a caracteres de importancia económica y realizar selección asistida por marcadores, entre las principales. Para algunos tipos de seguimientos en las líneas de producción de especies acuícolas, se han propuesto metodologías moleculares como herramientas rápidas y altamente seguras. Para este tipo de análisis es posible utilizar diversos métodos, sin embargo algunos son de alto costo o requieren de mayor tiempo para obtener el resultado, lo que no los hace eficientes para la aplicación necesaria para la autenticación y trazabilidad a nivel industrial, consecuentemente la utilización de SSR y RFLP-PCR son más apropiados (MALDINI *et al.* 2006).

1.5. Marcadores Moleculares vinculados a la Identificación de Mitílicos

Debido a que la comercialización de mitílicos en formato desconchado, impide la identificación por la morfología de las valvas, se generó la necesidad de desarrollar métodos basados en técnicas no morfológicas para garantizar la veracidad del etiquetado de cada país (CÁRCAMO *et al.* 2005; KRAPIVKA *et al.* 2007; SANTA CLARA *et al.* 2006).

Se han realizado un gran número de estudios genéticos en mejillones, analizando su capacidad para generar individuos híbridos cuando los rangos de distribución de dos especies se superponen debido a sus barreras reproductivas incompletas (COGLAN y GOSLING 2007; DIAS *et al.* 2009; HILBISH *et al.* 2002; INOUE *et al.* 1995; KJEWski *et al.*

2009; RAWSON *et al.* 1999; RAWSON *et al.* 2003; TORO *et al.* 2004; TORO *et al.* 2002); Por otra parte se ha analizado su forma exclusiva de herencia del DNA mitocondrial (ZOUROS 2000). Además se ha descrito su estructura poblacional y patrón de distribución de las especies (DAGUIN *et al.* 2001; HILBISH *et al.* 2002; INOUE *et al.* 1995; KIJEWski *et al.* 2009; TORO *et al.* 2004; TORO *et al.* 2006). En el campo de la identificación genética ha habido muchos trabajos sobre los métodos que permitan realizar la diferenciación de especies del complejo *M. edulis* (BORSA *et al.* 1999; BORSA *et al.* 2012; FERNANDEZ-TAJES *et al.* 2011; INOUE *et al.* 1995; OHRESSER *et al.* 1997; REGO *et al.* 2002; SANTA CLARA *et al.* 2006; TORO 1998a; WESTFALL *et al.* 2010; WOOD *et al.* 2003), además de la identificación de especies en ambos hemisferios (HILBISH *et al.* 2000; RAWSON y HILBISH 1995; WESTFALL *et al.* 2010). A pesar de la amplia batería de marcadores moleculares, la identificación precisa de los mitílidos reconocidos a nivel mundial se ha fiado de la utilidad del método de RFLP-PCR.

Uno de los RFLP-PCR más difundido en la identificación de mitílidos es el que se ha desarrollado utilizando partidores que amplifican parte de la región no repetitiva del gen de la *proteína adhesiva polifenólica*, un componente clave en la formación de los biso con el que el mejillón se fija al sustrato. Una de las parejas de partidores más utilizadas que amplifican esta zona es el Me 15-16 produciendo amplicones de tamaño diferente: *M. edulis* (180 pares de base (pb)), *M. trossulus* (168 pb), *M. galloprovincialis* y *M. chilensis* (126 pb) (INOUE *et al.* 1995; SANTA CLARA *et al.* 2006). Con el fin de diferenciar entre estas dos últimas especies, un RFLP con la enzima de restricción *AcI* corta sólo al producto de PCR *M. galloprovincialis* en dos fragmentos de 51 y 75 pb, permitiendo la discriminación entre *M. galloprovincialis* y *M. chilensis* (SANTA CLARA *et al.* 2006).

En este estudio se decidió utilizar este marcador como referencia para realizar la comparación de la equivalencia con otros marcadores disponibles debido a que ha sido ampliamente utilizado (COGHLAN y GOSLING 2007; DIAS *et al.* 2009; KIJEWski *et al.* 2009;

SANTA CLARA *et al.* 2006; SKURIKHINA *et al.* 2001; TORO *et al.* 2005; WOOD *et al.* 2003), para identificar las especies *Mytilus*; permite realizar la diferenciación entre *M. galloprovincialis* y *M. chilensis*. Además debido al tamaño de los amplicones que se obtienen se puede utilizar la técnica en mejillones en conserva donde el proceso de esterilización induce a una fragmentación del DNA en pequeños trozos de alrededor de 200 pb (QUINTEIRO *et al.* 1998; SANTA CLARA *et al.* 2006). Además los resultados obtenidos utilizando los partidores Me 15-16 resultan más consistentes y reproducibles en comparación a otro marcador DNA nuclear como es el Glu-5' desarrollado por Rawson *et al.* (1996). Otra ventaja del marcador Me 15-16 es que se determinó por cruces controlados en el laboratorio tiene un modelo de herencia mendeliana y que se recomienda para identificar de manera inequívoca las larvas y los adultos de la especie *Mytilus* (WOOD *et al.* 2003).

A la fecha en el país se han descrito cuatro especies de mitílidos: *Mytilus chilensis*, *Choromytilus chorus*, *Aulacomya ater* y *Perumytilus purpuratus* (TORO 1998a), gracias a regiones ITS (*Internal transcribed spacer*) y Glu-5. Además se ha estimado la diversidad genética de *Mytilus chilensis* a lo largo de su distribución y se han identificado otras especies no descritas anteriormente en las costas de Chile, como es el caso de *M. galloprovincialis* (TARIFEÑO *et al.* 2005; TORO *et al.* 2005).

Debido al uso de diferentes marcadores moleculares en las especies de mitílidos presentes en el país, no ha sido posible llegar a un consenso sobre el estatus taxonómico de *M. chilensis*. A raíz de esto y a las diferencias poco claras entre las especies que residen en ambos hemisferios, resulta necesario realizar estudios de equivalencia entre los marcadores empleados para identificar especies. En este trabajo se realizó una evaluación de los marcadores moleculares usados internacionalmente para la identificación de especies de mitílidos en muestras provenientes de Chile, Canadá y Galicia para determinar su capacidad para identificar las especies y

determinar la equivalencia entre ellos. Estos marcadores corresponden a intrón 1 del gen de la actina (*mac -1*), RFLP-PCR del gen de la enzima *citocromo oxidasa I (COI)* y RFLP-PCR del gen ribosomal *mtDNA 16s rRNA* en relación al gen de la *proteína adhesiva polifenólica* (Me 15-16).

HIPÓTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

HIPOTESIS

La evaluación de marcadores genéticos utilizados en la identificación y autenticación de especies de mitílidos permite establecer su poder diagnóstico.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los marcadores genéticos utilizados en la identificación y autenticación de especies de mitílidos para determinar la equivalencia entre ellos y conocer la calidad de las identificaciones realizadas para elegir los mejores marcadores para este propósito.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar la equivalencia y calidad en la identificación de la especie del marcador nuclear del intrón del gen de la actina (*mac-1*) con el marcador del gen de la región no repetitiva de la proteína adhesiva polifenólica, Me 15-16 *AcI*, en mitílidos provenientes del Hemisferio Sur y Norte.

Evaluar la equivalencia y calidad en la identificación de la especie de los genes mitocondriales *citocromo oxidasa I (COI)* y *mtDNA 16s rRNA* con el marcador del gen de la región no repetitiva de la proteína adhesiva polifenólica, Me 15-16 *AcI* en mitílidos provenientes del Hemisferio Sur y Norte.

Determinar el panel de marcadores más informativo para realizar la identificación de especies en mitílidos.

Evaluar la capacidad de identificación de la especie de los marcadores moleculares *Me 15-16 Acl* y *COI Xbal* en productos procesados (conservas en aceite, salmuera, ahumados y congelados).

2. METODOLOGIA

2.1. Obtención de las muestras

Se utilizaron las muestras de *M. chilensis*, *M. galloprovincialis* y *M. edulis* especificadas en la **Tabla 1**, que fueron colectadas con anterioridad (2008-2011) y estaban presentes en el Laboratorio (LARRAÍN *et al.* 2012)

Además se utilizaron diez individuos reconocidos como presuntos híbridos según RFLP-PCR Me 15-16 *Acil* (**Tabla 2**), nueve colectados en el sur de Chile y una obtenida en Galicia, España entre los años 2008-2009.

Los ejemplares colectados de longitud menor o igual a 2,5 cm se consideraron como “semilla” y las tallas superiores como “adultos”. Los individuos fueron disectados hasta 24 horas después de la recolección y en cada individuo se separó un pequeño trozo de tejido del borde del manto (aproximadamente 200 mg), se almacenó en un tubo eppendorf de 1,5 mL, se fijó con etanol al 95% manteniéndolo a -20°C, para la posterior extracción de DNA.

Tabla 1. Lugar, Tipo y número de individuos de cada especie.

Especie según RFLP Me 15 – 16 <i>Acil</i>	Lugar de muestreo	Tipo de muestra	Número de individuos (n)
<i>M. chilensis</i>	Dichato - Chile Hatchery Universidad de Concepción	Semilla	50
	Metri - Chile Centro de captación de semillas	Semilla	49
<i>M. galloprovincialis</i>	Dichato - Chile Hatchery Universidad de Concepción	Semilla	50
	Galicia – España Muestra Comercial	Comercial Fresca – Refrigerada	49
<i>M. edulis</i>	Isla Prince Edward Canadá	Adultos	50

Tabla 2. Lugar y tipo de muestra de los presuntos híbridos detectados de acuerdo con el análisis de RFLP-PCR Me 15-16 *Acil*

Ind	Especie Me 15 -16 <i>Acil</i>	Lugar de muestreo	Tipo de muestra
CT1	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>	Centro de captación de semillas Caleta La Arena	Semilla
CT2	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>		
CT3	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>		
CT4	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>		
CT5	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>	Centro de engorda Canal Chidguapi	Adultos
CT6	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>		
CT7	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>		
CT8	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>		
CG1	<i>M. chilensis – M. galloprovincialis</i>	Centro de captación de semillas Metri	Semilla
CE1	<i>M. galloprovincialis – M. edulis</i>	Galicia, España	Comercial Fresca Refrigerada

Para evaluar la capacidad de identificar especie de los marcadores moleculares en mejillones procesados congelados y en conserva analizando distintas presentaciones de productos comerciales como se describe en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Procedencia, presentación y número de individuos analizados en distintas presentaciones de mejillones procesados en conserva.

Código	Proceso	Tipo de Presentación	Procedencia	Especie declarada	Número de individuos analizados
CNE	Conserva	Mejillón Natural	España	<i>M. galloprovincialis</i>	15
CEE	Conserva	Mejillón en Escabeche	España	<i>M. galloprovincialis</i>	1
CA	Conserva	Chorito Ahumado en Aceite	Chile	ND	8
CN	Conserva	Chorito Natural	Chile	ND	8
CC	Congelado	Chorito	Chile	ND	10
CAK	Conserva	Mejillón Ahumado en Aceite	Corea	ND	12

ND: Especie no declarada.

2.2. Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó por el método de fenol-cloroformo como se describe en Larraín *et al.* (2012) (**Anexo 1**) que incluye una etapa de precipitación de mucopolisacáridos. El DNA extraído se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop, (modelo ND-1000) y fue visualizado en un gel de agarosa al 0,7%. Las muestras que presentaron una razón de pureza de 1,5 o superior y en la que no se observó degradación se almacenaron congelados a -20°C hasta la realización de los análisis genéticos.

2.3. Genotipado

En todos los grupos en estudio se amplificó cada marcador molecular empleado y los alelos se visualizaron en geles de agarosa con bromuro de etidio bajo luz UV y en geles de poliacrilamida con tinción de plata. En los casos de RFLP-PCR se realizó una digestión posterior con endonucleasas de restricción.

Para controlar la calidad del genotipado en cada PCR efectuado se realizó un control negativo, para verificar que no exista contaminación. Además se escogió al azar un 5% del total de individuos de cada grupo analizado, como muestras ciegas, para controlar errores en el genotipado (BONIN *et al.* 2004).

Para la determinación del tamaño de los alelos se utilizaron marcadores de tamaño molecular de 25, 50 y 100 pb, de acuerdo al tamaño esperado de los fragmentos RFLP. La imagen del gel se trabajó con los programas Paint 6.1 (Microsoft ®) y Adobe Photoshop ® CS5 Extended Portable. En el caso particular del locus *mac -1* para determinar el tamaño de los alelos encontrados se realizó un gel ubicando los alelos por orden de tamaño uno al lado del otro. En este gel se midió la distancia de migración de cada fragmento del estándar de tamaño, con estos valores se construyó la curva de: distancia de migración del fragmento en el gel (eje X) v/s log [n° pares de bases] (eje Y). Se hizo el ajuste y se obtuvo la ecuación que da cuenta de esta relación. Para estimar el tamaño en que migraron los alelos se ingresó su distancia de migración en la ecuación obteniendo así el número de pares de base aproximado de cada alelo.

2.4. Identificación de especie

Previo a la identificación de la especie, para descartar la presencia en la muestra, de individuos pertenecientes a los géneros *Aulacomya* (Cholga) y *Choromytilus* (Choro zapato), se utilizó el análisis PCR-RFLP con partidores MusRFLP que amplifican un

fragmento del gen que codifica para la sub unidad pequeña del rDNA (18S rDNA), y la enzima de restricción *BsaHI* (**Anexo 2**) (SANTA CLARA *et al.* 2006). El producto de PCR tiene 237 pb para todos los géneros. Lo que permite diferenciar los géneros *Aulacomya* y *Choromytilus* del género *Mytilus*, es que los primeros no tienen sitio de corte para la enzima *BsaHI* mientras que en el género *Mytilus* se obtienen fragmentos de 169 y 68 pb.

Para realizar la identificación de las especies, se utilizó el RFLP-PCR Me 15 -16, utilizando los partidores Me 15 (5'-CCAGTATACAAACCTGTGAAGA- 3') y Me 16 (5'-TGTTGTCTTAATAGGTTTGTAAGA- 3') (INOUE *et al.* 1995) que amplifican la región no repetitiva del gen de la proteína adhesiva polifenólica. De los productos de PCR se obtienen fragmentos de distintos tamaños 180 pares de bases (pb) en *M. edulis*, 168 pb en *M. trossulus* y 126 pb en *M. galloprovincialis*. En el caso de *M. chilensis* estos partidores también producen un fragmento de 126 pb. Para lograr diferenciar entre *M. galloprovincialis* y *M. chilensis* se digirió el fragmento amplificado con enzima de restricción *AcI* que corta el amplicón de *M. galloprovincialis* en dos fragmentos de 57 y 69 pb y no corta el fragmento amplificado de *M. chilensis* (**Anexo 3**) (SANTA CLARA *et al.* 2006).

Los resultados de este marcador fueron considerados como patrón de referencia en este estudio para hacer la evaluación de la equivalencia y la calidad de la identificación de los siguientes marcadores:

2.4.1. Marcador nuclear

2.4.1.1. Intrón 1 del Gen de la Actina (*mac -1*)

Se utilizaron los partidores *mac-1a* (5' -CGTCTAGCGTAGTACTTAAATTG- 3') y *mac-1b* (5' -CGAAAATTGTAGTCTAGTTTTGTG- 3') que amplifican el intrón 1 del gen de la actina, debido a su capacidad de discriminar entre especies *M. edulis* y *M. galloprovincialis* pertenecientes al Hemisferio Norte y Sur (BORSA *et al.* 2012). Este marcador presenta alelos múltiples, por lo que a partir de la frecuencia de los alelos que poseen distintos tamaños se puede establecer a que especie pertenece cada individuo (DAGUIN y BORSA 1999).

2.4.2. Marcadores mitocondriales

2.4.2.1. RFLP-PCR del Gen de la Enzima *Citocromo Oxidasa I* (COI *Xba*I)

Otro método que se ha desarrollado para diferenciar a *M. chilensis* de las otras especies que componen el complejo *M. edulis* es el RFLP-PCR del gen de la enzima *citocromo oxidasa I* (COI), usando los partidores COIXba F (5'-CCGCCATTGTCTGTATACCC-3') y COIXba R (5'-TAATGCCCCCTCCTAAAACC- 3'). Se obtiene un fragmento de aproximadamente 233 pb en ambas especies. La digestión de los productos amplificados con la endonucleasa de restricción *Xba*I que tiene un sitio de reconocimiento en *M. chilensis*, produce dos fragmentos de 134 y 99 pb, mientras que las otras especies carecen de sitio de corte (FERNANDEZ-TAJES *et al.* 2011).

2.4.2.2. RFLP-PCR del Gen de *mtDNA 16s rRNA*

Se amplificó un fragmento del gen ribosomal 16S, que permite la rápida identificación de las especies del Hemisferio Norte en el complejo de la especie *M. edulis* (WESTFALL

et al. 2010) usando los partidores 16s AR (5' -CGCCTGTTTATCAAAACAT -3') y 16s BR (5' -CCGGTCTGAACTCAGATCACGT- 3') (RAWSON y HILBISH 1995). Se obtienen fragmentos de 527 pb que por medio de una digestión triple usando enzimas *EcoRV*, *NheI* y *SpeI* distingue entre *M. galloprovincialis* del Norte y el Sur. *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur (proveniente de Nueva Zelanda). De modo que individuos pertenecientes a *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur presentarán fragmentos de 342, 167, y 28 pb, *M. galloprovincialis* del Hemisferio Norte presentarán fragmentos de 342 y 195 pb y muestras de *M. edulis* mostrarán fragmentos de 342, 85, 82 y 28 pb (WESTFALL et al. 2010).

2.5. Análisis estadístico

2.5.1 Equivalencia

Para evaluar la equivalencia entre el marcador RFLP Me 15-16 *Acil* con los demás marcadores evaluados en esta tesis (RFLP-PCR y *mac-1*), se determinó la sensibilidad, especificidad y razón de verosimilitud que posee cada marcador para detectar la especie de mitílido con respecto al patrón de referencia.

La sensibilidad (*SE*) es la proporción de individuos identificados correctamente por el marcador evaluado (+) en relación a la especie patrón de referencia (*EP*) y la especificidad (*SP*) es la proporción de individuos que fueron correctamente excluidos en relación a la especie patrón (*NEP*).

$$SP = \frac{P[(NEP) \cap (EP)]}{P(EP)}, \quad SE = \frac{P[(+) \cap (EP)]}{P(EP)}$$

Se calculó la razón de verosimilitud ($LR+$) como:

$$LR+ = \frac{SE}{(1 - SP)}$$

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 y ALTMAN 2004). Mientras más alto es el $LR+$ para un determinado marcador, éste presenta una mayor equivalencia con el marcador usado como referencia.

2.5.2 Calidad de la identificación

Esta capacidad fue medida por la probabilidad de asignación del individuo a la categoría, se determinó usando el criterio de frecuencia del programa Geneclass2 (PIRY *et al.* 2004), realizando pruebas de reasignación de individuos a las especies y a los grupos de estudio (que considera especie y localidad de donde provienen). Según el criterio frecuentista, se asignó el individuo al grupo donde su frecuencia alélica es más probable (PAETKAU *et al.* 1995). Se obtuvo el número y porcentaje de individuos correctamente asignados y la probabilidad total de asignación a la categoría, que corresponde al promedio de la probabilidad de cada asignación correcta a la categoría respectiva. Esto se realizó utilizando la información proporcionada con cada marcador en forma independiente y considerando todos los marcadores de manera conjunta.

En el caso particular del marcador *mac-1*, además se identificó los alelos exclusivos o privados, es decir alelos que son únicos de cada especie y no están presentes en otras. Se calculó el contenido de información polimórfica (PIC) que se usa frecuentemente en marcadores multialélicos para evaluar su capacidad de discriminación y 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). Además, se realizó un análisis de correspondencia (AFC) implementado en Genetix 4.05 y cuyo resultado es una representación gráfica de las poblaciones obtenida a partir de la matriz de las frecuencias alélicas por especie y grupos de estudio, (BELKHIR *et al.* 1996; DAGUIN *et al.* 2001).

2.5.3.- Determinación del panel de marcadores más informativo

Se utilizó el método basado en frecuencias del programa GeneClass2 realizando una reasignación en conjunto con todos los marcadores simultáneamente y sus combinaciones. Además de esto, de manera complementaria se utilizó el programa BELS (BROMAGHIN 2008) que clasifica los loci en función de su contenido informativo calculando el promedio maximizado de la precisión de la asignación individual.

2.5.4.- Capacidad de identificación en productos procesados

Se amplificaron fragmentos según los marcadores Me 15-16 *Acil* y COI *Xbal* y se comparó con la especie declarada en su etiquetado o al grupo de estudio al que pertenece el individuo.

3. RESULTADOS

La calidad del genotipado, evaluada por los controles negativos realizados no mostró amplificación. Respecto a las muestras ciegas escogidas al azar (5%) de cada grupo de estudio para cada ensayo con cada uno de los cuatro marcadores empleados, la totalidad de éstas fueron coincidentes con el genotipo determinado en forma rutinaria.

3.1. Marcador nuclear

3.1.1. Intrón 1 del Gen de la Actina (*mac -1*)

Se establecieron condiciones de amplificación propias, lo que mejoró la nitidez de los productos en los geles de agarosa y poliacrilamida (**Anexo 4**). Se logró amplificar los fragmentos en 242 de los 248 individuos, además de lograr amplificar fragmentos en los presuntos híbridos. Se identificó nueve alelos en el locus *mac-1* (**Figura 1**) y las frecuencias alélicas en los grupos de estudio (especies y lugares) se muestran en **Tabla 4**.

Tabla 4. Frecuencias alélicas para el locus *mac-1* en los grupos de estudio.

Locus	Alelo	<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>
		Dichato	Metro	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward
		Chile			España	Canadá
<i>mac-1</i>	266	0.09	0,06	-	0,02	0,05
	267	0,17	0,35	0,02	0,02	0,21
	269	0,27	0,50	0,03	0,10	0,44
	271	0,32	0,08	0,02	0,22	0,21
	273	0,16	-	-	0,20	0,08
	298	-	-	0,29	0,10	0,01
	300	-	0,01	0,35	0,16	-
	320	-	-	0,07	0,16	-
	353	-	-	0,22	0,02	-

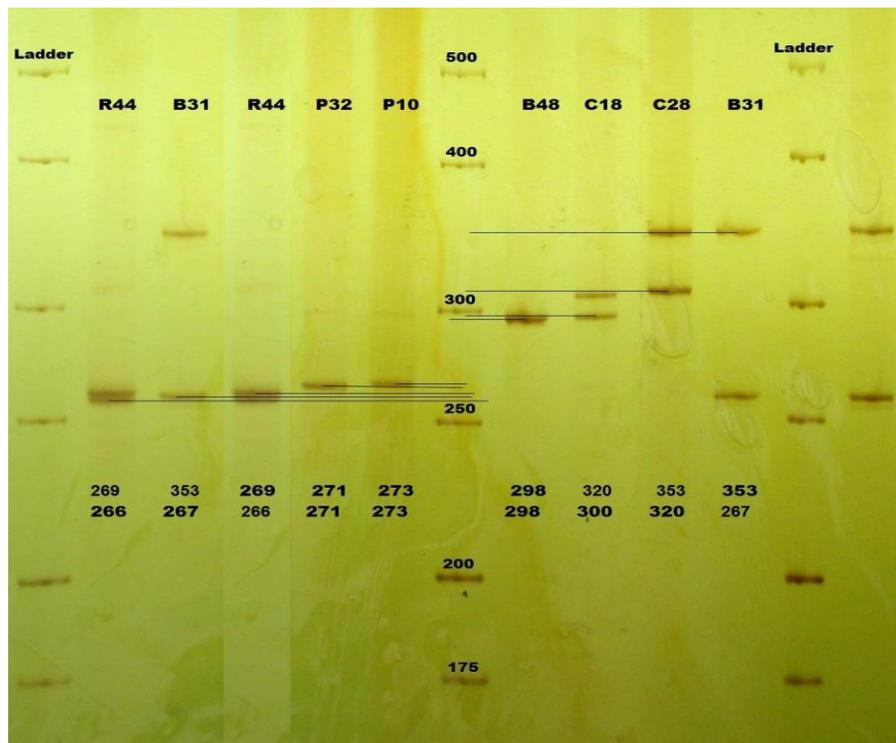


Figura 1. Tamaño de los alelos obtenidos del marcador *mac-1*.

Según la información otorgada por las frecuencias alélicas se encontraron dos alelos exclusivos siendo estos de 320 y 353 pb, propios de *M. galloprovincialis*. El alelo de 353 pb se da con mayor frecuencia en los del Hemisferio Sur con una frecuencia de 0,22 en contraste a un 0,02 en el Hemisferio Norte, mientras que, el alelo 320 pb está con una mayor frecuencia en el Hemisferio Norte (Una frecuencia de 0,16 comparada con un 0,07 en el Hemisferio Sur). Al calcular el contenido de información (PIC) se obtuvo en promedio un valor de PIC de 0,691.

En la **Tabla 5** se muestran los resultados de la equivalencia en la identificación de las especies del marcador *mac-1* y la calidad de identificación que posee este marcador comparándolo con la especie patrón de referencia.

Tabla 5. Evaluación de equivalencia y calidad de identificación para el marcador *mac-1* según la especie mediante el criterio frecuentista de GeneClass2.

Reasignación correcta			Especie			
N° Individuos	(%)		<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>	media
134	54	SE	0,32	0,85	0,36	0,51
		SP	0,81	0,90	0,67	0,79
		LR+	1,72	8,43	1,10	3,75
		PA	0,26	0,39	0,62	0,42

SE: Sensibilidad **SP:** Especificidad **LR+:** Razón de Verosimilitud **PA:** Probabilidad de asignación a la categoría.

La sensibilidad promedio del marcador *mac-1*, que corresponde a la proporción de individuos correctamente asignados fue de 0,51. El mayor valor de sensibilidad obtenido entre las especies fue de 0,85 en *M. galloprovincialis*, por su parte en *M. chilensis* y *M. edulis* la sensibilidad fue muy similar, con valores de 0,32 y 0,36, respectivamente (**Tabla 5**). La especificidad promedio del marcador *mac-1*, que corresponde a la proporción de individuos correctamente excluidos fue de 0,79. En la especie *M. galloprovincialis*, al igual que en el caso de la sensibilidad, el valor de

especificidad fue mayor a la obtenida en las otras dos especies, seguido por *M. chilensis* y *M. edulis* (**Tabla 5**). La razón de verosimilitud (LR+) fue de 8,43 en *M. galloprovincialis*, de 1,72 y 1,70 para la especie *M. chilensis* y *M. edulis* respectivamente, obteniéndose un LR+ promedio de 3,75.

La calidad de identificación de la especie del marcador *mac-1* evaluada mediante la reasignación de los individuos a la especie con la que fueron identificados con el marcador de referencia se puede visualizar en el porcentaje de número de individuos correctamente reasignados y la probabilidad de asignación total y por especie en la **Tabla 5**, donde se reasignaron correctamente el 54% de los individuos en estudio, la probabilidad de asignación total promedio del marcador *mac-1* fue de 0,42. Con *M. edulis* la probabilidad de asignación fue la más alta con un 0,62 y la menor fue obtenida con *M. chilensis* con un 0,26.

En la **Tabla 6** se puede observar los datos de correctas e incorrectas asignaciones efectuadas, aportando información a la calidad de identificación del marcador *mac -1*. El número más alto de individuos correctamente reasignados fue a la especie *M. galloprovincialis* (85,7%), y el número más bajo fue a *M. chilensis* (34%). Gran parte de los individuos que fueron identificados como *M. chilensis* fueron reasignados a *M. edulis*, ocurriendo el mismo efecto en los individuos que fueron identificados como *M. edulis* reasignándose a *M. chilensis*.

Tabla 6. Reasignación de individuos según especie basada en el marcador *mac-1* usando criterio frecuentista en programa GeneClass2.

Especie Me 15-16 Acil		Reasignación correcta	Reasignación incorrecta		
			<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>
<i>M. chilensis</i>	N° individuos	32	-	8	54
	(%)	33,60	-	8,40	56,80
	PA	0,26	-	0,08	0,57
<i>M. galloprovincialis</i>	N° individuos	84	3	-	11
	(%)	85,70	3	-	11,20
	PA	0,39	0,03	-	0,11
<i>M. edulis</i>	N° individuos	18	25	7	-
	(%)	36	50	14	-
	PA	0,62	0,50	0,14	-

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

En la **Tabla 7** se estimaron los parámetros descritos anteriormente en los grupos de estudio, que corresponden a la especie y la localidad de donde provienen. En lo que respecta a la evaluación de la equivalencia, la sensibilidad promedio del marcador *mac-1* fue de 0,45 y la especificidad promedio fue de 0,88. La mayor sensibilidad al igual que la especificidad fue en *M. galloprovincialis* proveniente de Dichato y los mínimos valores de sensibilidad y especificidad correspondió a *M. chilensis* también de Dichato.

La razón de verosimilitud (LR+), del marcador *mac-1* fue mayor en *M. galloprovincialis* de Dichato con 14,31 y la menor fue de 1,59 en *M. edulis* de Canadá. Se obtuvo de promedio un LR+ promedio de 5,09.

Tabla 7. Evaluación de equivalencia y calidad de identificación de especie en el marcador *mac-1* según el grupo de estudio, criterio frecuentista de GeneClass2.

Reasignación correcta		Grupo de estudio						
N° de Individuos	(%)		<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>	Media
			Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward	
			Chile			España	Canadá	
109	43,6	SE	0,31	0,34	0,82	0,52	0,22	0,45
		SP	0,84	0,89	0,94	0,89	0,85	0,88
		LR+	1,92	3,04	14,31	4,59	1,59	5,09
		PA	0,60	0,002	0,46	0,08	0,004	0,23

SE: Sensibilidad **SP:** Especificidad **LR+:** Razón de Verosimilitud **PA:** Probabilidad de asignación a la categoría.

La calidad de la identificación del grupo de estudio del marcador *mac -1* evaluada por la reasignación de los individuos mostró una probabilidad de asignación total promedio de 0,23, con un 43,6% de los individuos reasignados correctamente, disminuyendo de la observada al considerar sólo la especie. En *M. galloprovincialis* de Dichato (**Tabla 8**) la probabilidad de asignación y los individuos correctamente asignados fueron las más altas y las menores en esos mismos parámetros fue obtenidos con *M. edulis* de Canadá.

Tabla 8. Reasignación de individuos al grupo de estudio según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con el marcador *mac-1*.

Especie Me 15-16 Acñ			Reasignación correcta	Resignación Incorrecta				
				<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>
				Dichato	Metri	Dichato	Galicia España	Isla Prince Edward Canadá
				Chile				
<i>M. chilensis</i>	Dichato Chile	N° individuos	14	-	11	0	8	12
		(%)	31,10	-	24,40	0	17,70	26,60
		PA	0,74	-	0,24	0	0,20	0,24
	Metri Chile	N° individuos	17	7	-	1	-	24
		(%)	34,70	14	-			
		PA	0,78	0,14	-	0,02	-	0,50
<i>M. galloprovincialis</i>	Dichato Chile	N° individuos	41	0	2	-	7	0
		(%)	82	0	4	-	14	0
		PA	0,92	-	0,04	-	0,14	-
	Galicia España	N° individuos	25	9	1	10	-	3
		(%)	52,10	18,30	2	20,40	-	6,10
		PA	0,81	0,18	0,02	0,22	-	0,06
<i>M. edulis</i>	Isla Prince Edward Canadá	N° individuos	12	16	15	0	7	-
		(%)	24	32	30,0	0	14	-
		PA	0,73	0,32	0,30	0	0,14	-

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

En el análisis de correspondencia (AFC) (**Figura 2**), en los tres ejes graficados se explica el 99,42% de la variación total en las frecuencias génicas. El 73,20% de la variación de los genotipos de los individuos es representada por el eje 1. En el eje 2 se puede ver que los grupos de *M. chilensis* de Dichato y del centro de captación Metri y *M. edulis* de Canadá se mantienen cercanas. En el caso de *M. galloprovincialis* provenientes del Hemisferio Sur y Norte se mantienen distanciados entre si y el grupo anterior.

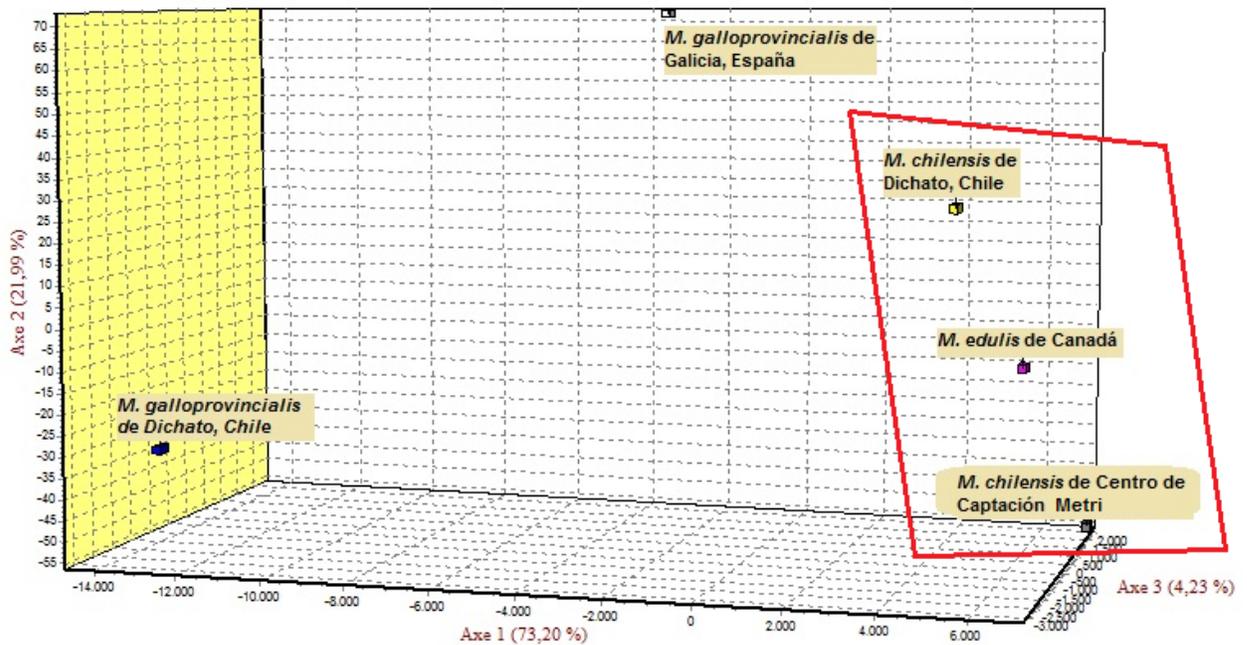


Figura 2. Análisis de correspondencia realizado sobre la base de las frecuencias alélicas del marcador *mac-1*.

En la **Tabla 9** se muestra el resultado de la asignación a especies con el marcador *mac-1* de los individuos presuntamente híbridos según el marcador RFLP Me 15-16 *Ac1*. De los siete individuos híbridos entre *M. chilensis* y *M. trossulus*, tres (CT1; CT4 y CT5) fueron asignados a *M. chilensis*, tres (CT2; CT3 y CT7) a *M. edulis*, y uno (CT6) a *M. galloprovincialis* del Hemisferio Norte. En el caso del híbrido *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*, CG1 fue asignado a *M. chilensis*, y el híbrido *M. galloprovincialis* y *M. edulis* CE1 fue asignado a *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur.

Tabla 9. Asignación de los presuntos híbridos según Me 15-16 *AcI* a las especie con el marcador *mac-1* según criterio frecuentista de GeneClass 2.

Individuos	Especie RFLP Me 15 -16 <i>AcI</i>	Asignación con <i>mac -1</i>
CT1	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>	<i>M. chilensis</i>
CT2	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>	<i>M. edulis</i>
CT3	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>	<i>M. edulis</i>
CT4	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>	<i>M. chilensis</i>
CT5	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>	<i>M. chilensis</i>
CT6	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>	<i>M. galloprovincialis</i> Hemisferio Norte
CT7	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>	<i>M. edulis</i>
CT8	<i>M. chilensis - M. trossulus</i>	<i>M. chilensis</i>
CG1	<i>M. chilensis - M. galloprovincialis</i>	<i>M. chilensis</i>
CE1	<i>M. galloprovincialis - M. edulis</i>	<i>M. galloprovincialis</i> Hemisferio Sur

3.2. Marcadores mitocondriales

Los resultados de equivalencia entre los marcadores mitocondriales y lo obtenido con Me 15-16 *AcI* en las mismas muestras y los presuntos híbridos se resumen en la **Tabla 10.**

Tabla 10. Identificación de la especie de los individuos de cada grupo con los marcadores mitocondriales COI *Xba*I y *mtDNA* 16S *rRNA*

Especie según RFLP Me 15-16 <i>AcI</i>	Origen		N	RFLP-PCR									
				COI <i>Xba</i> I				<i>mtDNA</i> 16s <i>rRNA</i>					
								Triple digestión <i>EcoRV</i> , <i>SpeI</i> , <i>NheI</i>					
				<i>Mch</i>	<i>Mg</i>	<i>Mt</i>	<i>Me</i>	<i>MgHS</i>	<i>MgHN</i>	<i>Mt</i>	<i>Me</i>	<i>Mch</i> x <i>Mg</i>	
<i>M. chilensis</i>	Dichato	Chile	50	50	-				43	-	-	-	7
	Metri	Chile	49	49	-				49	-	-	-	-
<i>M. galloprovincialis</i>	Dichato	Chile	50	2	48				4	28	-	18(1)(*)	-
	Galicia	España	49	-	49				-	4	-	45(1)	-
<i>M. edulis</i>	Isla Prince Edward	Canadá	50	-	50				1	-	-	49	-

Mch: *M. chilensis*; ***Mg***: *M. galloprovincialis*; ***MgHS***: *M. galloprovincialis* Hemisferio Sur; ***MgHN***: *M. galloprovincialis* Hemisferio Norte; ***Mt***: *M. trossulus*; ***Me***: *M. edulis*. (*): Número entre paréntesis corresponde al número de individuo con alelo nuevo en esa categoría.

3.2.1. RFLP-PCR del Gen de la Enzima Citocromo Oxidasa I (COI *Xba*I)

En el total de los 248 individuos analizados, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 233 pb (**Figura 3**). Al realizar la digestión con la endonucleasa de *Xba*I en los individuos de la especie *M. chilensis*, donde existe sitio de restricción se obtuvieron fragmentos de 134 y 99 pb (**Tabla 10**). De los 50 individuos que pertenecen a *M. galloprovincialis* provenientes de Dichato, 48 no mostraron sitio de corte. Sin embargo, en dos individuos (B12 y B42) al momento de realizar la digestión se obtuvieron fragmentos de 134 y 99 pb. A estos individuos se les consideró como *M. chilensis* de acuerdo a este marcador.

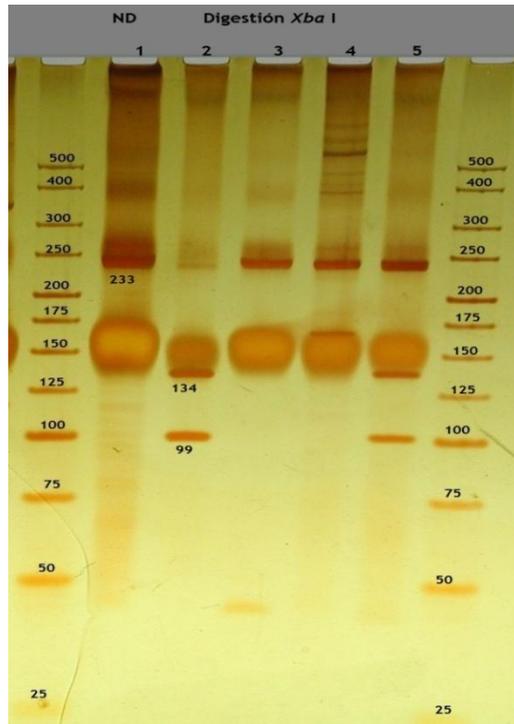


Figura 3. Gel Poliacrilamida con productos de PCR-RFLP COI *Xba*I: **1.** *M. galloprovincialis* de Galicia, España no digerido; **2.** *M. chilensis* de Dichato- Chile; **3.** *M. galloprovincialis* de Dichato – Chile; **4.** *M. edulis* de Canadá; **5.** Presunto híbrido *M. chilensis* x *M. galloprovincialis* ó *M. chilensis* x *M. edulis* (CT7).

En la **Tabla 11** se observan los resultados de la evaluación de la equivalencia en la identificación de las especies del marcador COI *Xba*I y la calidad de identificación que posee este marcador comparándolo según la especie con el patrón de referencia. La sensibilidad y especificidad promedio de este marcador fue de 0,99. Los valores se mantienen similares en las especies evaluadas. Es importante destacar que *M. galloprovincialis* y *M. edulis* no se distinguen entre ellas por ello los valores en su conjunto son altos. 99,10% de los individuos fueron reasignados correctamente.

Tabla 11. Evaluación de equivalencia y calidad de identificación del marcador RFLP COI *Xba*I según la especie, criterio frecuentista de GeneClass2.

Reasignación correcta		Especie			
N° Individuos	(%)		<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i> - <i>M. edulis</i>	Media
246	99.1	SE	1	0,98	0,99
		SP	0,99	1	0,99
		LR+	74,50	-	-
		PA	0,59	0,73	0,66

SE: Sensibilidad **SP:** Especificidad **LR+:** Razón de Verosimilitud **PA:** Probabilidad de asignación a la categoría.

En las especies con el marcador COI *Xba*I, la probabilidad de asignación total promedio fue de un 17,46 y se reasignó correctamente 99,10% de los individuos, correspondiendo esto a información que evalúa la calidad de la identificación. En la **Tabla 12** puede observarse las reasignaciones correctas e incorrectas realizadas con el marcador COI *Xba*I. En este caso particular las especies *M. galloprovincialis* y *M. edulis* se agrupan debido a que este marcador identifica esas especies indistintamente, sólo descartando que sean *M. chilensis*. La probabilidad de asignación más alta fue en *M. galloprovincialis* y *M. edulis*, siendo ligeramente más baja en *M. chilensis*. Se puede apreciar que *M. chilensis* casi en su totalidad fueron reasignadas correctamente y el mismo efecto ocurre en la reasignación en el grupo de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* exceptuando dos individuos (B12 y B42) que no pudieron ser reasignados a ninguna especie.

Tabla 12. Reasignación de individuos según especie basado en el marcador RFLP COI *Xba*I usando el criterio frecuentista en programa GeneClass2.

Especie Me 15-16 AcI		Reasignación correcta	Resignación Incorrecta		
			Especie		
			<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>
<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	99	-	0	
	(%)	100	-	0	
	PA	0,60	-	0	
<i>M. galloprovincialis</i> - <i>M. edulis</i>	N° Individuos	147	2	-	
	(%)	98,60	1,30	-	
	PA	0,76	0,02	-	

SE: Sensibilidad **SP:** Especificidad **LR+:** Razón de Verosimilitud **PA:** Probabilidad de asignación a la categoría.

En la **Tabla 13** se estimaron estos parámetros en los grupos de estudio ya mencionados.

Tabla 13. Equivalencia y calidad de identificación del grupo de estudio (especie y lugar) del marcador RFLP COI *Xba*I, criterio frecuentista de GeneClass2.

Reasignación correcta		Grupo de estudio						
N° Individuos	(%)		<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>	Media
			Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward	
			Chile			España	Canadá	
79	31,60	SE	0,5	0,61	0,48	0	0	0,32
		SP	0,89	0,86	0,49	0,88	0,87	0,80
		LR+	4,50	1,40	1	0	0	1,38
		PA	0,99	0,99	0,59	0	0	0,51

SE: Sensibilidad **SP:** Especificidad **LR+:** Razón de Verosimilitud **PA:** Probabilidad de asignación a la categoría.

La sensibilidad promedio del marcador en esta evaluación fue de 0,32. La mayor sensibilidad fue de 0,61 en *M. chilensis* proveniente de centro de captación Metri y

valores de 0 en *M. galloprovincialis* de Galicia y *M. edulis*. La especificidad promedio fue de 0,80. El mayor valor obtenido en este caso fue en *M. chilensis* de Dichato y la mínima en *M. galloprovincialis* también de Dichato. El valor más alto de la razón de verosimilitud (LR+) fue de 4,50 y se obtuvo en *M. chilensis* de Dichato, en *M. galloprovincialis* de esta misma localidad fue de 1,40. Se evidenció que el 31,60% de los individuos fueron reasignados correctamente a los grupos de estudio.

Tabla 14. Reasignación de individuos con el marcador RFLP COI *Xba*I al grupo de estudio según el criterio frecuentista en programa GeneClass2

Grupo de estudio			Reasignación correcta		Resignación Incorrecta				
			N° Individuos	(%)	<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>
					Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward Canadá
					Chile		España		
<i>M. chilensis</i>	Dichato – Chile		25	50	-	25	0		
		PA	0,81		-	0,50	-		
	Metri		29	59,10	20	-	0		
		PA	0,99		0,4	-	-		
<i>M. galloprovincialis</i>	Dichato – Chile		24	48	2	0	24		
		PA	0,60		0,04	-	0,48		
	Galicia – España		49	100	0	0	0		
		PA	1		-	-	0		
<i>M. edulis</i>	Isla Prince Edward Canadá		0		0	0	50		
		PA	0		-	-	1		

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

La calidad de identificación al evaluar los grupos de estudios con el marcador COI *Xba*I como se observa en la probabilidad de asignación total promedio que fue de 0,51 y se reasigno correctamente sólo el 31,60%. La máxima probabilidad de reasignación fue con el *M. galloprovincialis* de Galicia, contrario a los resultados de *M. edulis* donde se obtuvo 0.

Se reasignaron correctamente según el grupo de estudio (**Tabla 14**) a *M. chilensis* independiente de la localidad donde fue realizada la extracción. En el caso de *M. galloprovincialis* de Dichato, un 48% de los individuos fueron reasignados correctamente, los individuos restantes fueron reasignados indistintamente a *M. galloprovincialis* de Galicia o a *M. edulis* de Canadá, con una probabilidad de asignación de 1. En el caso de *M. galloprovincialis* de Galicia y *M. edulis*, fueron en su totalidad asignados a *M. galloprovincialis* de Dichato.

A ocho de los diez individuos aparentemente híbridos según el marcador Me 15-16 *AcI* (**Tabla 15**), se les identificó como *M. chilensis* debido a que presentaban sitio de corte para la enzima. Uno de estos individuos (CE1), presunto híbrido entre *M. galloprovincialis* x *M. edulis* según Me 15-16 *AcI* que proviene de Galicia España, se identificó como que no poseía sitio de corte para la enzima por lo que no fue identificado como *M. chilensis* por este marcador. En el caso particular del presuntamente híbrido de *M. chilensis* x *M. trossulus* (CT7) según Me 15-16 *AcI*, que presentó fragmentos de 233, 134 y 99 pb al momento de realizar la digestión, de acuerdo a este marcador resulta ser un aparente híbrido de *M. chilensis* con una de las tres especies restantes.

Tabla 15. Tamaño de los fragmentos e identificación de la especie de los presuntos híbridos detectados con los marcadores mitocondriales COI *Xba*I.

Ind	Especie RFLP Me 15-16 <i>Ac</i> I	Tamaño producto de PCR (COI)		Tamaño fragmentos digeridos por <i>Xba</i> I			Identificación
		Genotipos	Genotipos	Genotipos	Genotipos	Genotipos	
CT1	<i>M. chilensis</i> - <i>M. trossulus</i>	233	233	-	134	99	<i>M. chilensis</i>
CT2	<i>M. chilensis</i> - <i>M. trossulus</i>	233	233	-	134	99	<i>M. chilensis</i>
CT3	<i>M. chilensis</i> - <i>M. trossulus</i>	233	233	-	134	99	<i>M. chilensis</i>
CT4	<i>M. chilensis</i> - <i>M. trossulus</i>	233	233	-	134	99	<i>M. chilensis</i>
CT5	<i>M. chilensis</i> - <i>M. trossulus</i>	233	233	-	134	99	<i>M. chilensis</i>
CT6	<i>M. chilensis</i> - <i>M. trossulus</i>	233	233	-	134	99	<i>M. chilensis</i>
CT7	<i>M. chilensis</i> - <i>M. trossulus</i>	233	233	233	134	99	<i>M. chilensis</i> - <i>M. galloprovincialis</i>
							<i>M. chilensis</i> - <i>M. edulis</i>
							<i>M. chilensis</i> - <i>M. trossulus</i>
CT8	<i>M. chilensis</i> - <i>M. trossulus</i>	233	233	-	134	99	<i>M. chilensis</i>
CG1	<i>M. chilensis</i> - <i>M. galloprovincialis</i>	233	233	-	134	99	<i>M. chilensis</i>
GE1	<i>M. galloprovincialis</i> - <i>M. edulis</i>	233	233	-	134	99	<i>M. galloprovincialis</i>
							<i>M. edulis</i>
							<i>M. trossulus</i>

MgHS: *M. galloprovincialis* Hemisferio Sur

Siete de los ocho individuos presuntamente híbridos entre *M. chilensis* y *M. trossulus* según el marcador RFLP Me 15-16 *Ac*I (CT1; CT2, CT3, CT4, CT5 CT6, y CT8), fueron asignados a *M. chilensis* con el marcador COI *Xba*I. El individuo restante (CT7) fue

asignado a *M. edulis* o *M. galloprovincialis* o *M. trossulus* sin distinguirse una especie en particular. En el caso del híbrido *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*, CG1 fue asignado a *M. chilensis*, y el híbrido *M. galloprovincialis* y *M. edulis* CE1 fue asignado a *M. galloprovincialis*.

3.2.2. RFLP-PCR del Gen de *mtDNA* 16s *rRNA* (16s)

Se logró la amplificación del fragmento de aproximadamente 527 pb del gen *mtDNA* 16s *rRNA* en el total de los 248 individuos analizados según el protocolo establecido (**Anexo 6**) (**Figura 5**). En la posterior triple digestión con las enzimas de restricción *EcoRV*, *SpeI* y *NheI* (**Tabla 10**) en los individuos *M. chilensis* proveniente de Dichato, hubo 43 individuos de los que se obtuvieron fragmentos de 342, 167 y 28 pb, característico de *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur. Sin embargo, siete individuos (A01, A02, A03, A04, A05, A06, A08) de este grupo presentaron además el fragmento de 195 pb al momento de realizar la digestión, por lo que pueden considerarse como presuntos híbridos entre *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur y del Norte. En los individuos de la especie *M. galloprovincialis* provenientes de Dichato, 18 individuos fueron clasificados como *M. edulis*, 28 individuos como *M. galloprovincialis* del Hemisferio Norte y cuatro individuos *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur. En el grupo de *M. galloprovincialis* de Galicia se obtuvieron 45 individuos *M. edulis* y cuatro individuos *M. galloprovincialis* del Hemisferio Norte. Todos los individuos del grupo de *M. chilensis* proveniente del centro de captación Metri según lo obtenido al momento de la digestión corresponden a *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur. Con la excepción de un ejemplar, los individuos del grupo *M. edulis* de Canadá, correspondieron a *M. edulis*, debido a que se encontraron fragmentos de 342, 85, 82 y 28 pb. La excepción en este grupo es un individuo (R38) que según los fragmentos obtenidos corresponde a *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur.

En dos individuos de grupos diferentes, se identificó un alelo no descrito por otros autores. En el individuo C01 perteneciente al grupo de *M. galloprovincialis* de España, y en el individuo B40 que pertenece al grupo de *M. galloprovincialis* de Dichato, se observaron fragmentos de 342, 113 y 82 pb. El fragmento de 113 pb es un alelo nuevo que no se ha descrito en otras publicaciones en las que se ha utilizado este marcador (Figura 4).

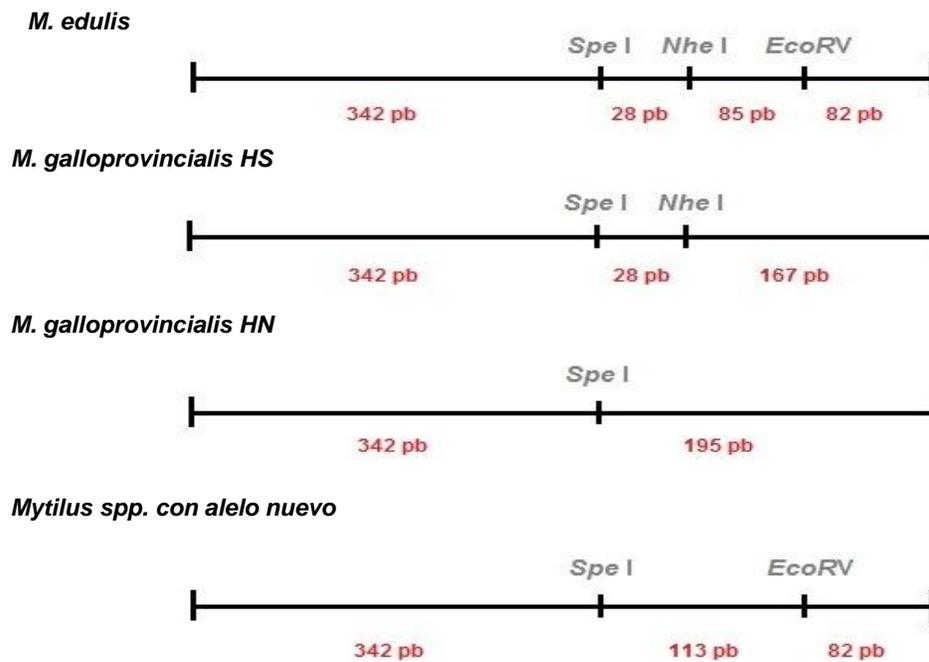


Figura 4. Esquema del resultado según especie de la Digestión con Enzimas de Restricción del RFLP *mtDNA 16s rRNA*, incluyendo el alelo nuevo.

Tabla 16. Equivalencia y calidad de identificación de la especie del marcador RFLP *mtDNA 16s rRNA*, usando criterio frecuentista de GeneClass2

Reasignación correcta		Especie				
N° Individuos	(%)		<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>	Media
151	60,9	SE	1	0,38	0,30	0,56
		SP	0,98	0,77	0,70	0,82
		LR+	49,70	1,68	1,01	17,46
		PA	0,59	0,26	0,61	0,49

SE: Sensibilidad **SP:** Especificidad **LR+:** Razón de Verosimilitud **PA:** Probabilidad de asignación a la categoría.

La sensibilidad promedio del marcador fue de 0,56 y la especificidad promedio fue de 0,82 y la razón de verosimilitud promedio de 17,46. Los mayores valores en estos parámetros fueron en *M. chilensis*, siendo los valores semejantes en *M. galloprovincialis* y en *M. edulis*.

La información referida a la calidad de la identificación se puede observar en que el 60,90% de los individuos fueron reasignados correctamente según su especie y la probabilidad de asignación total promedio fue de 0,49. Los resultados de la reasignación de los individuos a la especie con la que fueron identificados con el marcador *mtDNA 16s rRNA* se resumen en la **Tabla 17**, donde la más alta probabilidad de asignación fue de 0,60 en *M. chilensis* y *M. edulis*. *M. chilensis* fue en su totalidad reasignado correctamente. En *M. galloprovincialis* el 38% fue correctamente asignado y más de la mitad de los individuos fueron reasignados a *M. edulis*. En lo que respecta a *M. edulis* sólo el 30% fue correctamente reasignado y gran parte de los individuos fueron reasignados a *M. galloprovincialis*.

Tabla 17. Reasignación de individuos a especie con el marcador *mtDNA 16s rRNA* usando criterio frecuentista en programa GeneClass2.

Especie Me 15-16 Acil		Reasignación correcta	Resignación Incorrecta		
			Especie		
			<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>
<i>M. chilensis</i>	Nº Individuos	99	-	0	0
	(%)	100	-	0	0
	PA	0,60	-	-	-
<i>M. galloprovincialis</i>	Nº Individuos	38	2	-	59
	(%)	38,30	2	-	59,50
	PA	0,26	0,02	-	0,60
<i>M. edulis</i>	Nº Individuos	15	1	34	-
	(%)	30	2	34,30	-
	PA	0,61	0,02	0,68	-

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

Además se estimaron estos parámetros en los grupos de estudio y se ordenaron en la **Tabla 18** y **19**.

La sensibilidad promedio del marcador fue de 0,29 (**Tabla 18**). El mayor valor obtenido entre las especies fue de 0,66 en *M. chilensis* proveniente de Dichato y el mínimo valor de 0,02 en *M. edulis*. La especificidad promedio del marcador fue de 0,82. El mayor valor obtenido entre las especies fue de 0,95 en *M. chilensis* de Dichato y un mínimo valor de 0,67 en *M. galloprovincialis* de Galicia. En lo que respecta a la razón de verosimilitud, donde el valor más alto se obtuvo en *M. galloprovincialis* de Dichato con 11,16 y un mínimo de 0,10 en *M. edulis* y 0 en el caso de *M. chilensis* proveniente del Centro de Captación Metri. La LR+ promedio fue de 2,84.

Tabla 18. Evaluación de equivalencia y calidad de identificación de especie en el marcador *mtDNA 16s rRNA* para el grupo de estudio.

Reasignación correcta		Grupo de estudio						
N° Individuos	(%)		<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>	media
			Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward Canada	
			Chile			España		
72	28,8	SE	0,66	0	0,62	0,14	0,02	0,29
		SP	0,74	0,95	0,94	0,67	0,81	0,82
		LR+	2,51	0	11,16	0,44	0,10	2,84
		PA	0,60	0	0,40	0,71	0,69	0,48

En lo que respecta a la calidad de la identificación sólo el 28,80% de los individuos fueron reasignados correctamente con una probabilidad de asignación total promedio fue de 0,48. En la reasignación correcta e incorrecta a los grupos de estudio con el marcador *mtDNA 16s rRNA* (Tabla 19). La probabilidad de asignación fue la más alta en *M. galloprovincialis* de Galicia con un 0,71 y la menor fue obtenida en *M. chilensis* del centro de captación de semillas Metri donde fue cero. Los resultados de la reasignación son más dispersos debido a que no existe una correspondencia entre la especie y la localidad de donde provienen. En el caso particular de *M. chilensis* que proviene del centro de captación Metri, ésta en su totalidad fue reasignada a la misma especie proveniente de Dichato. En *M. edulis* proveniente de Canadá, 48 individuos fueron reasignados a *M. galloprovincialis* del Galicia, siendo sólo un individuo correctamente reasignado y un individuo reasignado a *M. galloprovincialis* de Dichato. Importante mencionar que una de las muestras de *M. edulis* (R38), no fue reasignada a ningún grupo de estudio.

Tabla 19. Reasignación de individuos a grupo de estudio con el marcador *mtDNA 16s rRNA* usando el criterio frecuentista en programa GeneClass2.

Grupo de Estudio			Reasignación correcta	Resignación Incorrecta				
				<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>
				Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward Canadá
Chile			España					
<i>M. chilensis</i>	Dichato Chile	N° Individuos	33	-	10	7	0	0
		(%)	66	-	20	14	0	0
		PA	0,60	-	0,20	0,14	0	0
	Metri	N° Individuos	0	49	-	0	0	0
		(%)	0	100	-	0	0	0
		PA	0	1	-	0	0	0
<i>M. galloprovincialis</i>	Dichato Chile	N° Individuos	31	2	0	-	17	0
		(%)	62	4	0	-	34	0
		PA	0,40	0,04	0	-	0,34	0
	Galicia España	N° Individuos	7	0	0	4	-	38
		(%)	14,30	0	0	8,16	-	77,55
		PA	0,70	-	-	0,08	-	0,78
<i>M. edulis</i>	Isla Prince Edward Canadá	N° Individuos	1	1	0	0	48	-
		(%)	2	2	0	0	96	-
		PA	0,69	0,02	-	-	0,96	-

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

En el caso de los individuos aparentemente híbridos (**Tabla 20**), se identificó como *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur a seis individuos, dado que posterior a la triple digestión se obtuvieron fragmentos de 342, 167 y 28 pb. Dos individuos presentaron fragmentos de 342, 85, 82 y 28 pb, característicos de *M. edulis* y dos individuos presentaron fragmentos de 370, 342, 167, 85, 82 y 28 pb, que contienen tamaños de

fragmentos característicos de *M. edulis*, *M. trossulus* y *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur.

Tabla 20. Tamaño de los fragmentos e identificación de la especie de los presuntos híbridos detectados con el marcador mitocondrial *mtDNA 16S rRNA*

Tamaño producto de PCR (<i>mtDNA 16S rRNA</i>)		Tamaño fragmentos digeridos por triple digestión <i>EcoRV</i> , <i>SpeI</i> , <i>NheI</i>						Identificación
Genotipos		Genotipos						
527	527	370	342	167	85	82	28	<i>Mg HS -M. trossulus- M. edulis</i>
527	527	370	342	167	85	82	28	<i>Mg HS -M. trossulus- M. edulis</i>
527	527	-	342	167	-	-	28	<i>Mg HS</i>
527	527	-	342	167	-	-	28	<i>Mg HS</i>
527	527	-	342	167	-	-	28	<i>Mg HS</i>
527	527	-	342	167	-	-	28	<i>Mg HS</i>
527	527	-	342	-	85	82	28	<i>M. edulis</i>
527	527	-	342	167	-	-	28	<i>Mg HS</i>
527	527	-	342	167	-	-	28	<i>Mg HS</i>
527	527	-	342	-	85	82	28	<i>M. edulis</i>

MgHS: *M. galloprovincialis* Hemisferio Sur

Cuando se realizó la identificación de la especie de los individuos presuntamente híbridos según el marcador RFLP Me 15-16 *AcI*, usando el marcador RFLP *mtDNA 16s rRNA*, los híbridos entre *M. chilensis* y *M. trossulus*, CT1; CT2, CT3, CT4, CT5 CT6, y CT8 fueron asignados a *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur. El híbrido entre *M. chilensis* y *M. trossulus* CT7, fue asignado a *M. galloprovincialis* Hemisferio Norte. En el caso del híbrido *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*, CG1 fue asignado a *M. chilensis*, y el híbrido *M. galloprovincialis* y *M. edulis* CE1 fue asignado a *M. edulis*.

3.3. Determinación del panel de marcadores más informativo

Los resultados de la determinación del panel de marcadores más informativo mediante la reasignación a la especie usando todos los marcadores simultáneamente y sus combinaciones se pueden ver en la **Tabla 21.1** y **21.2**. Se obtienen la mejor calidad y equivalencia de identificación con la combinación de los marcadores Me 15-16 *AcI* y *mac-1*, obteniéndose sensibilidad y especificidad del 100% junto con una probabilidad de asignación promedio total de 0,51 y un 98,80% de los individuos correctamente reasignados. Es importante mencionar que el marcador Me 15-16 *AcI* y sus combinaciones con COI *XbaI* y con *mtDNA 16s rRNA* obtienen valores de los parámetros de equivalencia muy similares, variando las probabilidades de asignación y el número de individuos correctamente reasignados. Otras tres combinaciones de marcadores moleculares que tienen un buen desempeño son:

COI *XbaI*, *mtDNA 16s rRNA*, Me 15 16

mac -1, *mtDNA 16s rRNA*, Me 15 16

mac -1, COI *XbaI*, Me 15 16

Las sensibilidades y especificidades en todas las combinaciones mencionadas resultaron ser cercanas a uno, promediando uno en el panel de *mac-1*, *mtDNA 16s rRNA* y Me 15-16 *AcI*, y 0,99 en las otras dos combinaciones. Estas tres combinaciones con tres marcadores se reasignaron correctamente 245 individuos, que corresponde al 98,70%. Se obtienen mayores probabilidades de asignación correctas de las especies utilizando los marcadores COI *XbaI*, *mtDNA 16s rRNA* y Me 15-16 *AcI*, con un 0,59 para *M. chilensis*, 0,47 para *M. galloprovincialis* y 0,48 para *M. edulis*. En la especie *M. chilensis* con este panel de marcadores se obtuvo una razón de verosimilitud máxima de 48,67 informando que la frecuencia de asignación de los

individuos a esta especie fue 48 veces mayor que la de los individuos de otras especies.

Cuando se realiza la evaluación de la equivalencia con los marcadores sin considerar el marcador de referencia, la sensibilidad mayor fue en *M. chilensis*, seguida de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. La especificidad, alcanzó un máximo de 0,98 en los grupos de *M. chilensis*. Un valor mínimo de 0,92 en *M. galloprovincialis*. En *M. chilensis* mostró una razón de verosimilitud máxima de 49,20 informando que la reasignación de los individuos a esta especie fueron 49 veces mayores que la de los individuos de otros grupos. Al evaluar la calidad de la identificación, se reasignaron correctamente 234 individuos que correspondió al 94,30%. La probabilidad de asignación máxima en esta combinación fue de 0,59 en la especie *M. chilensis*.

Tabla 21.1. Número y porcentaje de individuos correctamente reasignados y evaluación de capacidad de identificación de la especie de los marcadores moleculares en conjunto y sus combinaciones, usando el criterio frecuentista de GeneClass2.

Marcador	Reasignación correcta			Especie			
	N° Individuos	(%)		<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>	Media
mac -1			SE	0,99	0,90	0,94	0,94
COI <i>Xba</i> I	234	94,30	SP	0,98	0,92	0,94	0,95
<i>mtDNA</i> 16s <i>rRNA</i>			LR+	49,20	11,25	15,50	25,32
			PA	0,59	0,40	0,59	0,53
COI <i>Xba</i> I			SE	1	0,98	0,98	0,99
<i>mtDNA</i> 16s <i>rRNA</i>	245	98,70	SP	0,98	1	1	0,99
Me 15 16			LR+	48,67	-	-	48,67
			PA	0,59	0,47	0,48	0,51
mac -1			SE	1	1	1	1
<i>mtDNA</i> 16s <i>rRNA</i>	245	98,70	SP	1	1	1	1
Me 15 16			LR+	-	-	-	-
			PA	0,59	0,36	0,49	0,48
mac -1			SE	1	0,43	1	0,81
COI <i>Xba</i> I	245	98,70	SP	1	1	1	1
Me 15 16			LR+	-	-	-	-
			PA	0,59	0,35	0,49	0,48
COI <i>Xba</i> I			SE	1	0,37	0	0,46
<i>mtDNA</i> 16s <i>rRNA</i>	136	54,80	SP	0,99	0,66	0,70	0,78
			LR+	74,50	1,11	0	25,20
			PA	0,59	0,20	0,48	0,42

SE: Sensibilidad **SP:** Especificidad **PA:** Probabilidad de asignación a la categoría **LR+:** Razón de Verosimilitud

Tabla 21.2. Número y porcentaje de individuos correctamente reasignados y evaluación de capacidad de identificación de la especie de los marcadores moleculares en conjunto y sus combinaciones (continuación).

Marcador	Reasignación correcta			Especie			
	N° Individuos	(%)		<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>	Media
<i>mtDNA 16s rRNA</i>			SE	1	0,85	0,76	0,87
<i>mac -1</i>	220	88,70	SP	0,98	0,93	0,93	0,95
			LR+	49,33	11,47	11,52	24,11
			PA	0,59	0,43	0,60	0,54
<i>mac -1</i>			SE	1	0,86	0,84	0,90
COI <i>Xba</i> I	225	90,70	SP	1	0,95	0,93	0,96
			LR+	-	15,96	11,82	13,89
			PA	0,59	0,43	0,55	0,52
<i>mac -1</i>			SE	1	1	0,98	0,99
Me 15 16	247	98,80	SP	1	1	1	1
			LR+	-	-	-	-
			PA	0,59	0,31	0,49	0,46
Me 15 16			SE	1	0,98	1	0,99
COI <i>Xba</i> I	246	98,40	SP	1	1	1	1
			LR+	-	-	-	-
			PA	0,59	0,49	0,50	0,53
<i>mtDNA 16s rRNA</i>			SE	1	1	1	1
Me 15 16	246	98,40	SP	1	1	1	1
			LR+	-	-	-	-
			PA	0,59	0,45	0,50	0,51

SE: Sensibilidad **SP:** Especificidad **PA:** Probabilidad de asignación a la categoría **LR+:** Razón de Verosimilitud

Los resultados de la reasignación de los individuos a las especie como parte de la evaluación de la calidad de la identificación de paneles con combinaciones de marcadores moleculares se pueden ver en las **Tabla 22.1, 22.2, 22.3 y 22.4**. La combinación de marcadores con la que se pudo reasignar correctamente el 100% de los individuos según su especie fue con el uso de *mac -1*, *mtDNA 16s rRNA*, Me 15 16

Acil (**Tabla 22.1**) y con *mac -1*, COI *Xbal*, Me 15 16 *Acil* (**Tabla 22.2**). En ambas combinaciones se obtuvieron probabilidades de asignación para cada especie similares. Es importante destacar que en estos casos dos individuos que correspondían a *M. galloprovincialis* (B12 y B42) y un individuo que correspondía a *M. edulis* (R38) no fueron reasignados a ninguna especie en particular. Al observar las combinaciones de dos marcadores, el mejor desempeño es con el uso conjunto de Me 15-16 *Acil* y *mac-1* (**Tabla 22.3**), con el que se tuvo el 100% de la reasignación de los individuos a las especies correspondientes, y si bien con las combinaciones de Me 15-16 y COI *Xbal* (**Tabla 22.3**) y de Me 15-16 *Acil* y *mtDNA 16s rRNA* (**Tabla 22.4**) , también reasigna al 100% de los individuos, los individuos antes mencionados no fueron reasignados a ninguna especie en particular como ocurre al utilizar *mac -1* y Me 15-16 *Acil*. Entre los paneles previamente descritos, con los que se obtuvieron las mejores probabilidades de asignación fue con Me 15-16 *Acil* y COI *Xbal*.

Tabla 22.1. Reasignación de individuos a especie con cada combinación de marcadores moleculares usando el criterio frecuentista en programa GeneClass2

Marcador	Especie		Reasignación correcta	Resignación Incorrecta			
				<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>	
<i>mac -1</i> COI Xba I	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	99	-	0	0	
		(%)	100		-	-	
		PA	0,98		-	-	
	<i>mtDNA 16s</i> <i>rRNA</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	89	1	-	9
			(%)	89,80	1		9
			PA	0,91	0,01		0,09
		<i>M. edulis</i>	N° Individuos	47	1	11	-
			(%)	86,51	2	22	
			PA	0,94	0,01	0,11	
COI Xba I <i>mtDNA 16s</i> <i>rRNA</i>	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	99	-	0	0	
		(%)	100		-	-	
		PA	0,47		-	-	
	Me 15 -16 Acil	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	97	2	-	0
			(%)	98	2.0		-
			PA	0,59	0,02		-
		<i>M. edulis</i>	N° Individuos	49	1	-	-
			(%)	98	2		
			PA	0,48	0,02		
<i>mac -1</i> <i>mtDNA 16s</i> <i>rRNA</i>	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	99	-	0	0	
		(%)	100		-	-	
		PA	0,59		-	-	
	Me 15 16 Acil	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	97	0	-	0
			(%)	100	-		-
			PA	0,36	-		-
		<i>M. edulis</i>	N° Individuos	49	0	0	-
			(%)	100	-	-	
			PA	0,49	-	-	

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

Tabla 22.2. Reasignación correcta o incorrecta de individuos según especie basado en el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con cada combinación de marcadores moleculares (continuación).

Marcador	Especie		Reasignación correcta	Resignación Incorrecta		
				<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>
<i>mac -1</i> COI <i>Xba</i> I	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	99	-	0	0
		(%)	100		-	-
		PA	0,59		-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	97	0	-	0
		(%)	100	-		-
		PA	0,35	-		-
	<i>M. edulis</i>	N° Individuos	49	0	0	-
		(%)	100	-	-	
		PA	0,49	-	-	
COI <i>Xba</i> I <i>mtDNA 16s</i> <i>rRNA</i>	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	99	-	0	0
		(%)	100		-	-
		PA	0,59		-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	37	2	-	60
		(%)	37,37	2		60,60
		PA	0,2	0,02		0,60
	<i>M. edulis</i>	N° Individuos	0		50	-
		(%)	0	-		
		PA	0,49	-	1	
<i>mtDNA 16s</i> <i>rRNA</i> <i>mac -1</i>	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	99	-	0	0
		(%)	100		-	-
		PA	0,59		-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	83	2	-	13
		(%)	83,84	2,0		13,13
		PA	0,43	0,02		0,13
	<i>M. edulis</i>	N° Individuos	38	1	11	-
		(%)	76	2	22	
		PA	0,6	0,02	0,22	

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

Tabla 22.3. Reasignación correcta o incorrecta de individuos según especie basado en el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con cada combinación de marcadores moleculares (continuación).

Marcador	Especie		Reasignación correcta	Resignación Incorrecta		
				<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>
<i>mac -1</i> COI <i>Xba</i> I	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	99	-	0	0
		(%)	100		-	-
		PA	0,60		-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	84	0	-	14
		(%)	85,71	-		14,10
		PA	0,43	-		0,14
	<i>M. edulis</i>	N° Individuos	42	0	8	-
		(%)	54,21	-	8	
		PA	0,55	-	0,16	
<i>mac -1</i> Me 15 -16 <i>Ac</i> I	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	99	-	0	0
		(%)	100		-	-
		PA	0,59		-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	99	0	-	0
		(%)	100	-		-
		PA	0,31	-		-
	<i>M. edulis</i>	N° Individuos	49	0	0	-
		(%)	100	-	-	
		PA	0,49	-	-	
<i>Me 15 -16 Ac</i> I COI <i>Xba</i> I	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	99	-	0	0
		(%)	100		-	-
		PA	0,59		-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	97	0	-	0
		(%)	100	-		-
		PA	0,49	-		-
	<i>M. edulis</i>	N° Individuos	50	0	0	-
		(%)	100	-	-	
		PA	0,50	-	-	

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

Tabla 22.4. Reasignación correcta o incorrecta de individuos según especie basado en el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con cada combinación de marcadores moleculares (continuación).

Marcador	Especie		Reasignación correcta	Resignación Incorrecta		
				<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. edulis</i>
Me 15 16 Acil mtDNA 16s rRNA	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	99	-	0	0
		(%)	100		-	-
		PA	0,59		-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	98	0	-	0
		(%)	100	-		-
		PA	0,45	-		-
	<i>M. edulis</i>	N° Individuos	49	0	0	-
		(%)	100	-	-	
		PA	0,50	-	-	

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

Se resumieron en las **Tablas 23.1** y **23.2** los resultados de la evaluación de equivalencia y calidad de identificación considerando simultáneamente los marcadores empleados y combinaciones de ellos, evaluando su capacidad de identificación según el grupo de estudio.

Al evaluar la equivalencia de capacidad de identificación al usar la combinación de todos los marcadores, la sensibilidad máxima fue de uno en los individuos *M. edulis*, pero sólo 0,62 en *M. chilensis* que proviene de Dichato. La especificidad, alcanzó un máximo de 0,96 en los grupos de *M. chilensis* de Dichato y *M. galloprovincialis*, de Galicia, y un valor mínimo de 0,90 en *M. chilensis* del Centro de Captación Metri. La razón de verosimilitud máxima fue para *M. galloprovincialis* de Galicia con un 17,30 informando que la reasignación de los individuos a este grupo de estudio fue 17 veces mayor que la de los individuos de otros grupos. Considerando los marcadores

simultáneamente se reasignaron correctamente 198 individuos (79.2%) La probabilidad de asignación promedio fue de 0,49. La probabilidad de asignación más alta fue de 0,63, obtenida con *M. chilensis* de Metri (**Tabla 23.1**).

Con los marcadores Me 15 -16 *Acil*, *mac -1* se obtuvo un porcentaje de individuos reasignados correctamente a grupo, mayor al obtenido al utilizar todos los marcadores simultáneamente, (**Tabla 23.2**). La sensibilidad y especificidad en *M. edulis* de Canadá fue de uno, sin embargo la sensibilidad menor se obtuvo en *M: chilensis* de Dichato y la menor especificidad en *M. galloprovincialis* de Galicia. La razón de verosimilitud máxima fue para *M. chilensis* de Metri con un 18,78 informando que la reasignación de los individuos a este grupo de estudio fue 18 veces mayor que la de los individuos de otros grupos. Al evaluar la calidad de identificación, 80,20% de los individuos correctamente reasignados con una probabilidad de asignación promedio de 0,45, siendo la más alta la correspondiente a *M. chilensis* proveniente de Metri (0,46).

Tabla 23.1. Número y porcentaje de individuos correctamente reasignados y evaluación de capacidad de la equivalencia y calidad de identificación en los grupos de estudio con los marcadores moleculares en conjunto y sus combinaciones

Marcador	Reasignación correcta			Grupo de estudio					Media
	N° Individuos	(%)		<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>	
				Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward Canada	
				Chile		España			
<i>mac -1</i>			SE	0,62	0,84	0,84	0,69	1	0,79
COI XbaI			SP	0,96	0,90	0,92	0,96	1	0,94
<i>mtDNA 16s rRNA</i>			LR+	15,30	8,80	11,10	17,30	0	10,50
Me 15 -16 AciI	198	79,20	PA	0,39	0,63	0,40	0,50	0,49	0,48
<i>mac -1</i>			SE	0,60	0,82	0,82	0,56	0,78	0,72
COI XbaI			SP	0,95	0,90	0,93	0,90	0,97	0,93
<i>mtDNA 16s rRNA</i>			LR+	11,91	8,10	11,60	5,80	22,20	11,92
	178	71,20	PA	0,37	0,62	0,42	0,54	0,59	0,51
COI XbaI			SE	0,16	1	0,65	0,92	0,98	0,74
<i>mtDNA 16s rRNA</i>			SP	1	0,79	0,98	0,91	1	0,94
Me 15 -16 AciI			LR+	-	4,71	32,33	10,70	-	15,91
	183	73,70	PA	0,11	0,98	0,39	0,54	0,48	0,50
<i>mac -1</i>			SE	0,64	0,71	0,82	0,78	1	0,79
<i>mtDNA 16s rRNA</i>			SP	0,93	0,91	0,94	0,95	1	0,95
Me 15 -16 AciI			LR+	9,01	7,86	14,69	17,06	-	12,15
	195	78,90	PA	0,32	0,46	0,39	0,46	0,48	0,42
<i>mac -1</i>			SE	0,52	0,86	0,83	0,76	1	0,79
COI XbaI			SP	0,96	0,88	0,94	0,96	1	0,95
Me 15 -16 AciI			LR+	14,49	7	13,68	18,50	-	13,42
	194	79,10	PA	0,55	0,61	0,50	0,42	0,48	0,51

SE: Sensibilidad **SP:** Especificidad **PA:** Probabilidad de asignación a la categoría **LR+:** Razón de Verosimilitud

Al buscar una alternativa que no incluya al marcador de referencia en el panel, se pudo evidenciar que el uso de los marcadores *mtDNA 16s rRNA* y *mac-1* permiten identificar mejor los individuos según grupo de estudio. (**Tabla 23.2**). Según los datos obtenidos para evaluar la equivalencia de identificación, la sensibilidad *M. galloprovincialis* de Dichato fue la más alta, y su contraparte de Galicia obtuvo la menor. La especificidad, alcanzó un máximo de 0,97 en *M. edulis*, y un valor mínimo de 0,90 en *M. galloprovincialis* de Galicia. La razón de verosimilitud máxima fue para *M. edulis* con un 25,72 informando que la reasignación de los individuos a este grupo de estudio fue 25 veces mayor que la de los individuos de otros grupos. Al revisar la calidad de la identificación, fueron reasignados correctamente 183 individuos (73,70%) La probabilidad de asignación promedio fue de 0,47. La probabilidad de asignación más alta fue de 0,60, obtenido con *M. edulis*.

Tabla 23.2. Número y porcentaje de individuos correctamente reasignados y evaluación de capacidad de la equivalencia y calidad de identificación en los grupos de estudio con los marcadores moleculares en conjunto y sus combinaciones (continuación).

Marcador	Reasignación correcta			Grupo de estudio					Media
	N° Individuos	(%)		<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>	
				Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward Edward Canadá	
				Chile			España		
COI <i>mtDNA</i> 16s <i>rRNA</i>			SE	0,16	1	0,62	0,55	0,59	0,58
			SP	1	0,78	0,97	0,90	0,82	0,89
			LR+	-	4,50	24,43	5,46	3,35	9,43
	144	58.2	PA	0,11	0,98	0,41	0,62	0,53	0,53
<i>mtDNA</i> 16s <i>rRNA</i> <i>mac -1</i>			SE	0,66	0,80	0,84	0,63	0,78	0,74
			SP	0,93	0,92	0,94	0,90	0,97	0,93
			LR+	10,05	9,90	15,12	6,63	25,72	13,48
	183	73.7	PA	0,35	0,46	0,39	0,53	0,60	0,47
<i>mac -1</i> COI <i>XbaI</i>			SE	0,5	0,86	0,83	0,59	0,78	0,71
			SP	0,96	0,87	0,93	0,91	0,96	0,93
			LR+	14	6,75	12,69	6,48	19,11	11,81
	175	71.1	PA	0,53	0,61	0,51	0,07	0,58	0,46
<i>mac -1</i> Me 15 16 <i>Acil</i>			SE	0,54	0,84	0,76	0,86	1	0,80
			SP	0,96	0,94	0,96	0,88	1	0,95
			LR+	15,27	13,86	18,78	7,42	-	13,83
	198	80,2	PA	0,43	0,46	0,42	0,45	0,48	0,45
COI <i>XbaI</i> Me 15 16 <i>Acil</i>			SE	0,56	0,67	1	0,61	1	0,77
			SP	0,90	1	0,92	0,89	1	0,94
			LR+	5,78	-	12,31	5,48	-	7,86
	189	76.5	PA	0,45	0,57	0,50	0,99	0,50	0,60
<i>mtDNA</i> 16s <i>rRNA</i> Me 15 16 <i>Acil</i>		2	SE	0,82	0,65	0,92	0	1	0,68
			SP	0,75	0,98	0,91	0,95	1	0,92
			LR+	0,48	0,40	0,57	0,49	0,47	0,48
	166	67.2	PA	3,28	31,97	10,64	0	-	11,47

SE: Sensibilidad **SP:** Especificidad **PA:** Probabilidad de asignación a la categoría **LR+:** Razón de Verosimilitud

Al evaluar la calidad de identificación mediante la reasignación de individuos según sus grupos de estudio con el uso de combinaciones de marcadores moleculares (**Tabla 24.1, 24.2, 24.3, 24.4, 24.5 y 24.6**), se obtuvo los porcentajes más altos de individuos correctamente reasignados con la combinación de todos los marcadores evaluados incluyendo Me 15-16 *Acil* (**Tabla 24.1**). Si bien la reasignación no se realiza acorde entre la especie y las localidades de los individuos, si presenta un mejor desempeño a nivel de especies ya que en el caso de *M. chilensis* proveniente de Dichato, 31 individuos fueron correctamente reasignados, y los 19 individuos restantes fueron reasignados a *M. chilensis* pero del centro de captación de Metri. Sin embargo en el caso de *M. edulis* 34 individuos fueron correctamente reasignados a *M. edulis* y 15 individuos restantes fueron reasignados a *M. galloprovincialis* proveniente de Galicia.

Con otra de las combinaciones de marcadores moleculares con la que se obtuvo porcentajes altos de individuos correctamente reasignados según especie fue con *mac-1* y Me 15-16 *Acil* (**Tabla 24.3**), aunque no fueron reasignados correctamente según grupo de estudio. En el caso de *M. chilensis* proveniente de Dichato, 27 individuos fueron correctamente reasignados, y los 23 individuos restantes fueron reasignados a *M. chilensis* del centro de captación de Metri. Un 100% de los individuos *M. edulis* fueron correctamente reasignados. En el caso de *M. galloprovincialis* de Dichato 42 individuos fueron reasignados correctamente y ocho individuos fueron reasignados a *M. galloprovincialis* proveniente de Galicia. Fueron reasignados correctamente 37 individuos a *M. galloprovincialis* proveniente de Galicia, y sólo doce individuos que fueron reasignados a *M. galloprovincialis* de Dichato.

Tabla 24.1. Reasignación de individuos a grupos de estudio analizadas según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con todos los marcadores moleculares en conjunto y combinados.

Marcador	Grupo de Estudio		Reasignación correcta	Resignación Incorrecta				
				<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>
				Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward Canadá
				Chile			España	
Me 15 16 AcI COI Xbal mtDNA 16s rRNA mac-1	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	31	-	19	0	0	0
		(%)	62		38	-	-	-
		PA	0,39		0,38	-	-	-
	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	41	7	-	0	0	0
		(%)	83	14,30		-	-	-
		PA	0,63	0,14		-	-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	42	0	0	-	8	0
		(%)	84	-	-		16	-
		PA	0,4	-	-		0,16	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	34	0	0	15	-	0
		(%)	69	-	-	30,60		-
		PA	0,50	-	-	0,32		-
<i>M. edulis</i>	N° Individuos	50	0	0	0	0	-	
	(%)	100	-	-	-	-		
	PA	0,49	-	-	-	-		
COI Xbal mtDNA 16s rRNA mac-1	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	30	-	20	0	0	0
		(%)	60		40	-	-	-
		PA	0,37		0,40	-	-	-
	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	41	8	-	0	0	0
		(%)	83	16,30		-	-	-
		PA	0,62	0,16		-	-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	41	2	0	-	8	0
		(%)	82	4	-		16	-
		PA	0,42	0,04	-		0,16	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	28	0	0	14	-	7
		(%)	57	-	-	28,60		14,30
		PA	0,54	-	-	0,28		0,14
<i>M. edulis</i>	N° Individuos	38	0	0	0	11	-	
	(%)	77	-	-	-	22		
	PA	0,59	-	-	-	0,24		

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

Tabla 24.2. Reasignación de individuos a grupos de estudio analizadas según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con todos los marcadores moleculares en conjunto y combinados (continuación).

Marcador	Grupo de Estudio		Reasignación correcta	Resignación Incorrecta				
				<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>
				Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward
				Chile			España	Canadá
COI Xbal mtDNA 16s rRNA	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	8	-	42	0	0	0
		(%)	16		84			
	Dichato - Chile	PA	0,11		0,93	-	-	-
	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	49	-		-	-	-
		(%)	100		-			
	Metri	PA	0,98	-		-	-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	32	0	0		17	0
		(%)	65,30			-	34	
	Dichato - Chile	PA	0,39	-	-		0,34	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	45	4	0	0		0
(%)		91,80	8,20			-		
Galicia - España	PA	0,54	0,08	-	-		-	
<i>M. edulis</i>	N° Individuos	49	0	0	0	0		
	(%)	100					-	
Isla Prince Edward Canadá	PA	0,48	-	-	-	-		
mac -1 mtDNA 16s rRNA	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	32	-	18	0	0	0
		(%)	64		36			
	Dichato - Chile	PA	0,32		0,36	-	-	-
	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	35	14		0	0	0
		(%)	71	28,60	-			
	Metri	PA	0,46	0,28		-	-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	41	0	0		9	0
		(%)	82			-	18	
	Dichato - Chile	PA	0,39	-	-		0,18	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	38	0	0	11		0
(%)		77			22,40	-		
Galicia - España	PA	0,46	-	-	0,22		-	
<i>M. edulis</i>	N° Individuos	49	0	0	0	0		
	(%)	100					-	
Isla Prince Edward Canadá	PA	0,48	-	-	-	-		

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

Tabla 24.3. Reasignación de individuos a grupos de estudio analizadas según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con todos los marcadores moleculares en conjunto y combinados (continuación).

Marcador	Grupo de Estudio		Reasignación correcta	Resignación Incorrecta				
				<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>
				Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward Canadá
				Chile			España	
mac -1 COI Xbal	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	26		24	0	0	0
		(%)	52	-	48	-	-	-
	Dichato – Chile	PA	0,55		0,48	-	-	-
	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	42	7		0	0	0
		(%)	85,70	14,30	-			
	Metro	PA	0,61	0		-	-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	40	0	0		8	0
		(%)	83			-	16	
	Dichato – Chile	PA	0,5	-	-		0,16	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	37	0	0	12		0
		(%)	75			24,50	-	
	Galicia – España	PA	0,42	-	-	0,24		-
<i>M. edulis</i>	N° Individuos	49	0	0	0	0		
	(%)	100					-	
Isla Prince Edward Canadá	PA	0,48	-	-	-	-		
COI Xbal mtDNA 16s rRNA	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	8		42	0	0	0
		(%)	16	-	84			
	Dichato – Chile	PA	0,15		0,84	-	-	-
	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	49	0		0	0	0
		(%)	100			-		
	Metro	PA	0,98	-		-	-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	31	2	0		17	0
		(%)	62	4		-	34	
	Dichato – Chile	PA	0,41	0,04	-		0,34	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	27	0	0	4		18
		(%)	55			8,20	-	36,70
	Galicia – España	PA	0,62	-	-	0,08		0,36
<i>M. edulis</i>	N° Individuos	29	0	0	1	20		
	(%)	58			2	40		
Isla Prince Edward Canadá	PA	0,53	-	-	0,02	0,4		

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

Tabla 24.4. Reasignación de individuos a grupos de estudio analizadas según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con todos los marcadores moleculares en conjunto y combinados (continuación).

Marcador	Grupo de Estudio		Reasignación correcta	Resignación Incorrecta				
				<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>
				Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward Canadá
				Chile			España	
mtDNA 16s rRNA mac -1	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	33	-	16	1	0	0
		(%)	66		32	2		
	Dichato – Chile	PA	0,35		0,32	0,02	-	-
	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	39	10	-	0	0	0
		(%)	79,5	20,40				
	Metri	PA	0,46	0		-	-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	42	-	-	-	8	-
		(%)	84				16	
	Dichato – Chile	PA	0,39	-	-		0,16	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	31	2	0	10	-	6
		(%)	63	4,1		20,40		
	Galicia – España	PA	0,53	-	-	0,20		0,12
	<i>M. edulis</i>	N° Individuos	38	1	-	-	11	-
		(%)	775	2			22	
Isla Prince Edward Canadá	PA	0,60	0,02	-	-	0,22		
mac -1 COI Xbal	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	25	-	25	-	-	-
		(%)	50		50			
	Dichato – Chile	PA	0,53		0,50	-	-	-
	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	42	7	-	-	-	-
		(%)	85,70	14,3				
	Metri	PA	0,61	0,14		-	-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	40	-	0	-	7	1
		(%)	83,30				14	2
	Dichato – Chile	PA	0,51	-	-		0,14	0,02
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	29	-	-	13	-	7
		(%)	59			26,50		
	Galicia – España	PA	0,06	-	-	0,26		0,14
	<i>M. edulis</i>	N° Individuos	39	-	-	-	11	-
		(%)	78				22	
Isla Prince Edward Canadá	PA	0,58	-	-	-	0,22		

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

Tabla 24.5. Reasignación de individuos a grupos de estudio analizadas según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con todos los marcadores moleculares en conjunto y combinados (continuación).

Marcador	Grupo de Estudio		Reasignación correcta	Resignación Incorrecta				
				<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>
				Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward Canadá
				Chile			España	
mac -1 Me 15 16 Acil	<i>M. chilensis</i>	Nº Individuos	27	-	23	0	0	0
		(%)	54		46	-	-	-
	Dichato – Chile	PA	0,53		0,50	-	-	-
	<i>M. chilensis</i>	Nº Individuos	42	7	-	-	-	-
		(%)	85,70					
	Metri	PA	0,45	0,14		-	-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	Nº Individuos	42	-	0	-	8	-
		(%)	84				16	
	Dichato – Chile	PA	0,46	-	-		0,14	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	Nº Individuos	37	-	-	12	-	-
		(%)	74			24		
	Galicia – España	PA	0,42	-	-	0,26		0,14
	<i>M. edulis</i>	Nº Individuos	50	-	-	-	0	-
		(%)	100					
Isla Prince Edward Canadá	PA	0,48	-	-	-	-		
Me 15 16 Acil COI Xbal	<i>M. chilensis</i>	Nº Individuos	28	-	22	-	-	-
		(%)	56		44			
	Dichato – Chile	PA	0,45		0,50	-	-	-
	<i>M. chilensis</i>	Nº Individuos	30	19	-	-	-	-
		(%)	60	38				
	Metri	PA	0,99	0,14		-	-	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	Nº Individuos	32	-	0	-	16	-
		(%)	64				32	-
	Dichato – Chile	PA	0,57	-	-		0,14	-
	<i>M. galloprovincialis</i>	Nº Individuos	49	-	-	13	-	7
		(%)	100			26,50		14,30
	Galicia – España	PA	0,50	-	-	0,26		0,14
	<i>M. edulis</i>	Nº Individuos	50	-	-	-	-	-
		(%)	100					
Isla Prince Edward Canadá	PA	0,50	-	-	-	-		

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

Tabla 24.6. Reasignación de individuos a grupos de estudio analizadas según el criterio frecuentista en programa GeneClass2 con todos los marcadores moleculares en conjunto y combinados (continuación).

Marcador	Grupo de Estudio		Reasignación correcta	Resignación Incorrecta				
				<i>M. chilensis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. edulis</i>
				Dichato	Metri	Dichato	Galicia	Isla Prince Edward Canadá
				Chile			España	
mtDNA 16s rRNA Me 15 16 Acil	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	41	-	9	-	-	-
		(%)	82					
	Dichato – Chile	PA	0,48					
	<i>M. chilensis</i>	N° Individuos	0	49	-	0	0	0
		(%)	0	100				
	Metri	PA	0,49	0,67				
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	31	-	-	-	17	-
		(%)	62					
	Dichato – Chile	PA	0,4	-	-			
	<i>M. galloprovincialis</i>	N° Individuos	45			4	-	
		(%)	90			8		
	Galicia – España	PA	0,57	-	-	0,20		
	<i>M. edulis</i>	N° Individuos	49	1	-	-	11	-
		(%)	100	2			22	
	Isla Prince Edgard Canadá	PA	0,47	0,02	-	-	0,22	

PA: Probabilidad de asignación a la categoría.

Se calculó de manera complementaria el desempeño de la asignación de los marcadores moleculares estudiados con el programa BELS. Éste programa excluye cada locus temporalmente en los datos utilizados, y se evalúa iterativamente la precisión de la asignación de los loci restantes. Después de que todos los loci se han evaluado, el locus que causa la menor reducción de la potencia es permanentemente excluido, mediante una repetición del procedimiento hasta que sólo queda un locus o el nivel de exactitud alcanza un mínimo definido por el usuario (HELYAR *et al.* 2011). Se obtuvieron los porcentajes de individuos correctamente asignados a especie y a grupo,

con cada panel de marcadores ensayados con y sin considerar el marcador RFLP Me 15-16 *Acil*.

En la **Figura 6**, se ve el porcentaje de asignación correcta de paneles con todos los marcadores moleculares considerando el marcador de referencia Me 15-16 *Acil* y exclusión sucesiva del locus menos informativo.

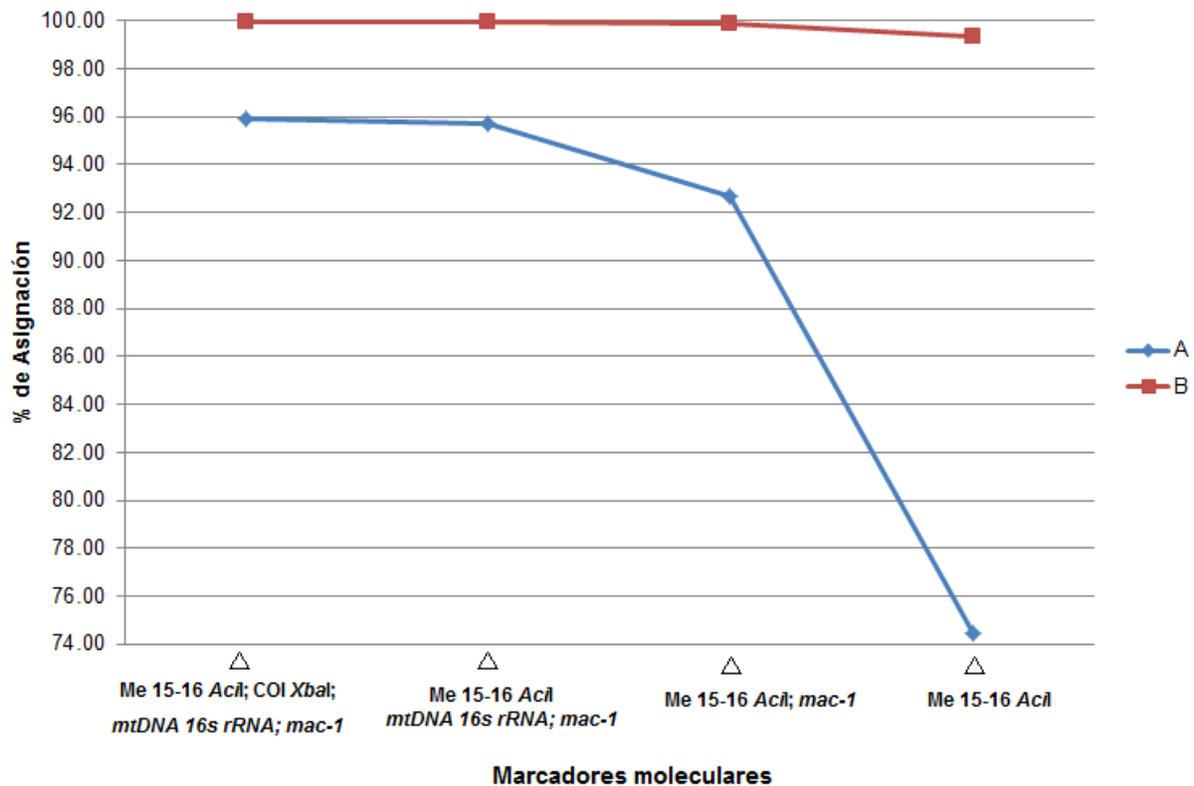


Figura 6. Porcentaje de asignación correcta del panel con todos los marcadores moleculares ensayados considerando el marcador de referencia Me 15-16 *Acil* y paneles que excluyen el locus menos informativo, empleando el Programa BELS. **A:** Individuos asignados a grupo (especie y localidad). **B:** Individuos asignados a especie.

En A, que considera la asignación a grupo de estudio (especie y localidad), el mayor porcentaje de asignación fue de 95,8% considerando todos los marcadores moleculares evaluados. Lo sigue un 95,7% donde se excluye el marcador COI *Xba*I. El porcentaje

de asignación baja a un 92,6% al utilizar los marcadores Me 15-16 *Acī* y *mac-1*. El marcador que no puede ser excluido en este panel de marcadores es Me 15-16 *Acī* con que se obtiene un porcentaje de asignación de 74,4%. En B, que asigna a especie (*M. chilensis*, *M. galloprovincialis* y *M. edulis*), el mayor porcentaje de asignación en este grupo fue de 99,9%, excluyendo el marcador COI *Xbal* del panel. Se obtiene un porcentaje similar de 99,9% al usar todos los marcadores evaluados. Al utilizar los marcadores Me 15-16 *Acī* y *mac-1* combinados el porcentaje de asignación baja a 99,8%, y al utilizar solo el marcador Me 15-16 *Acī*, el cual no puede ser excluido del panel de marcadores, el porcentaje baja a un 99,3%.

En la **Figura 7**, se ve el porcentaje de asignación correcta de paneles sin considerar el marcador de referencia Me 15-16 *Acī*. En C, que asigna a grupo de estudio (especie y localidad), el mayor porcentaje de asignación fue de 90,2% considerando todos los marcadores moleculares evaluados. Lo sigue un 89,6% donde se excluye el marcador COI *Xbal*. El porcentaje de asignación finalmente baja a un 67,7% al utilizar sólo el marcador que no pudo ser excluido, *mtDNA 16s rRNA*. En D, que considera la asignación a especie (*M. chilensis*, *M. galloprovincialis* y *M. edulis*), el mayor porcentaje en este grupo fue de 94,6% de asignación, considerando el uso de los marcadores *mtDNA 16s rRNA*, *mac-1* y COI *Xbal*. Se obtiene un porcentaje similar de 94,1% al excluir a COI *Xbal* del panel de marcadores. Al utilizar sólo el marcador *mtDNA 16s rRNA*, el cual no puede ser excluido, el porcentaje baja a un 80,2%.

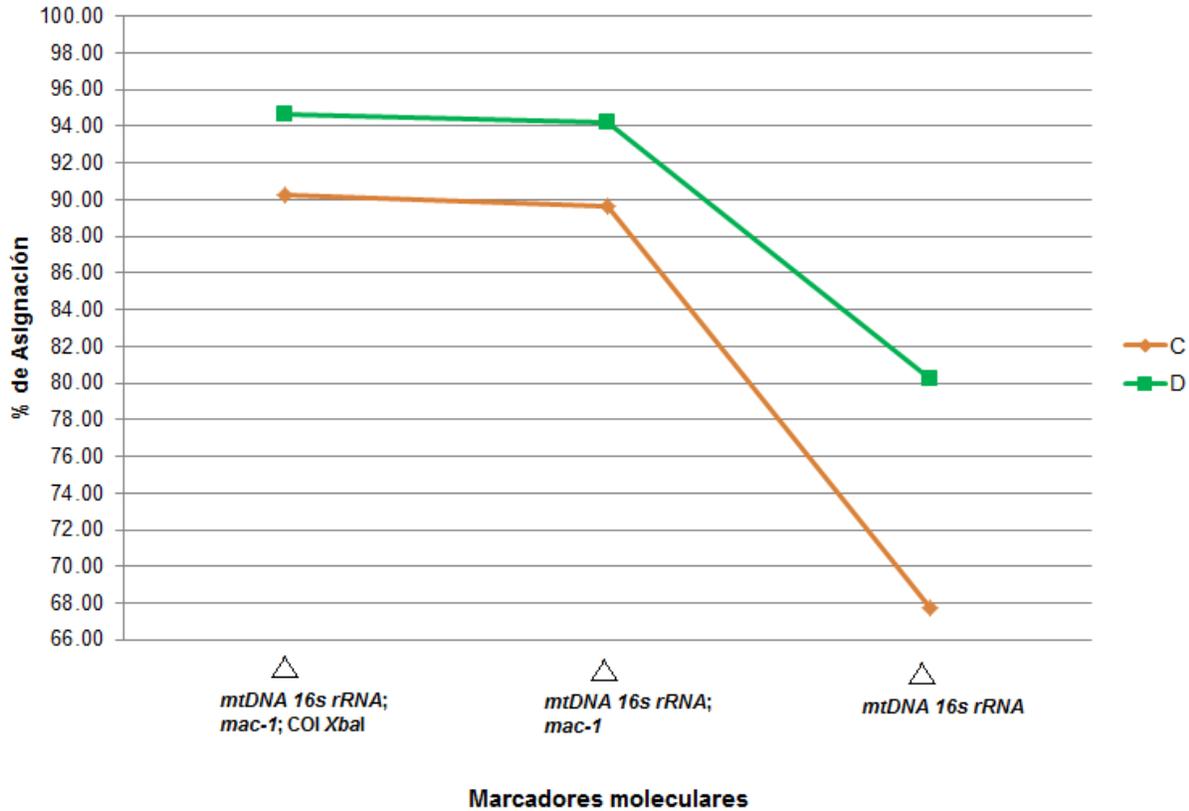


Figura 7. Porcentaje de asignación correcta del panel con los marcadores moleculares ensayados sin considerar el marcador de referencia Me 15-16 *Acil* y paneles que excluyen el locus menos informativo, empleando el Programa BELS **C**: Individuos asignados a grupo (especie y localidad) **D**: Individuos asignados a especie.

3.4. Asignación de híbridos

Los individuos presuntamente híbridos según el marcador RFLP Me 15-16 *Acil* fueron asignados a las especies usando un panel con todos los marcadores de manera simultánea y con un panel que considera todos los marcadores exceptuando el RFLP Me 15-16 *Acil*.

Al utilizar el panel con todos los marcadores simultáneamente para la asignación, los individuos híbridos *M. chilensis* x *M. trossulus* fueron a asignados a *M. chilensis*, exceptuando CT1, CT2 y CT7 que no fueron asignados a ninguna especie. El híbrido *M.*

chilensis x *M. galloprovincialis* fue asignado a *M. chilensis*, y el híbrido *M. galloprovincialis* x *M. edulis* fue asignado *M. galloprovincialis* del Hemisferio Norte.

Al utilizar el panel sin considerar el marcador Me 15-16 *Acil* para la asignación, los individuos híbridos *M. chilensis* x *M. trossulus* fueron a asignados a *M. chilensis*, exceptuando CT1, CT2 que no fueron asignados a ninguna especie, y CT7 que fue asignado a *M. edulis*. El híbrido *M. chilensis* x *M. galloprovincialis* fue asignado a *M. chilensis*, y el híbrido *M. galloprovincialis* x *M. edulis* fue asignado a *M. galloprovincialis* del Hemisferio Norte.

3.5. Evaluar la capacidad de identificación de la especie de los marcadores moleculares en productos procesados

Al observar la integridad del DNA extraído en geles de agarosa (**Anexo 7**), todos los individuos mostraron degradación. La concentración de DNA de los individuos varió entre 20 y 1,162 ng μL^{-1} y la pureza, medida a través de la relación de absorbancia 260/280 nm fluctuó entre 1,5 y 2,4. En los individuos de la conserva de mejillones en escabeche proveniente de España, sólo se logró obtener DNA no degradado en un individuo (CEE9).

Se realizó PCR Me 15 – 16 y se logró amplificar fragmentos de 126 pb en los individuos (**Tabla 25**). Los individuos de las conservas de choritos al natural, ahumado en aceite y los congelados proveniente de Chile no poseen sitio de restricción por lo que se obtuvieron fragmento de 126 pb, identificándolos como *M. chilensis*. El individuo CEE9 presentó sitio de corte para la enzima de restricción identificándolo como *M. galloprovincialis*. En el caso de los individuos analizados de la conserva de mejillón al natural proveniente de España, presentaron sitio de restricción obteniéndose dos fragmentos de 75 y 50 pb, y se identificándolos como *M. galloprovincialis*. En el caso de

la conserva de mejillones ahumados en aceite provenientes de Corea, fueron identificados como *M. galloprovincialis*.

No fue posible amplificar el marcador *mac-1* en las muestras procesadas. El marcador *mtDNA 16s rRNA* junto con su triple digestión no fue utilizado en estas muestras debido a que el tamaño del fragmento es muy grande (527 pb) como para obtenerlo integro de un producto procesado.

Tabla 25. Identificación de especie en muestras procesadas por medio del marcador RFLP PCR Me 15-16 *Acil*.

Código	Proceso	Tipo de Presentación	Procedencia	Especie declarada	Número de individuos analizados	Me 15-16 <i>Acil</i>	
						<i>Mch</i>	<i>Mg</i>
CNE	Conserva	Mejillón Natural	España	<i>M. galloprovincialis</i>	15	-	15
CEE	Conserva	Mejillón en Escabeche	España	<i>M. galloprovincialis</i>	1	-	1
CA	Conserva	Chorito Ahumado en Aceite	Chile	-	8	8	-
CN	Conserva	Chorito Natural	Chile	-	8	8	-
CC	Congelado	Chorito	Chile	-	10	10	-
CAK	Conserva	Mejillón Ahumado en Aceite	Corea	-	12	-	12

Mch: *M. chilensis*
Mg: *M. galloprovincialis*

Se realizó PCR COI y se logró amplificar fragmentos de 233 pb en todas las muestras, exceptuando en los individuos de la conserva de Mejillón en escabeche proveniente de España, donde sólo se pudo amplificar un fragmento en una muestra (CEE9). (**Tabla 26**).

Los individuos de las conservas de choritos al natural, ahumado en aceite y los congelados, provenientes de Chile se identificaron según este RFLP-PCR como *M.*

chilensis debido a que poseen sitio de corte para la enzima de restricción obteniéndose, fragmentos de 134 y 99 pb. Los individuos de las conservas de mejillón en escabeche (CEE9) y de mejillón al natural provenientes de España, no presentaron sitio de corte para la enzima manteniendo el fragmento de 233 pb, por lo que se descarta que sea *M. chilensis*. En el caso de los individuos de la conserva de mejillones ahumados en aceite provenientes de Corea, siete de los doce individuos poseen sitio de corte por lo que se identificaron como *M. chilensis* y los cinco restantes que no poseen el sitio de corte, por lo que se descartan que sea *M. chilensis*.

Tabla 26. Identificación de especie en muestras procesadas por medio del marcador RFLP PCR COI *Xba*I.

Código	Tipo de Presentación	Procedencia	Especie declarada	Número de individuos analizados	COI <i>Xba</i> I			
					<i>Mch</i>	<i>Mg</i>	<i>Me</i>	<i>Mt</i>
CNE	Mejillón Natural	España	<i>M. galloprovincialis</i>	15	-	15		
CEE	Mejillón en Escabeche	España	<i>M. galloprovincialis</i>	1	-	1		
CA	Chorito Ahumado en Aceite	Chile	-	8	8	-		
CN	Chorito Natural	Chile	-	8	8	-		
CC	Chorito	Chile	-	10	10	-		
CAK	Mejillón Ahumado en Aceite	Corea	-	12	7	5		

Mch: *M. chilensis*
Mg: *M. galloprovincialis*
Mt: *M. trossulus*
Me: *M. edulis*

4. DISCUSIÓN

4.1. Evaluación de la equivalencia y calidad de identificación de marcadores

Se evaluó la equivalencia y calidad en la identificación del marcador *mac-1*. No se logró obtener amplicones en seis individuos posiblemente por la probable existencia de alelos nulos. Los alelos nulos son el resultado de una variación en la secuencia de nucleótidos de las regiones de unión de partidores impidiendo la unión de éstos al DNA durante la amplificación en el PCR. La presencia de alelos nulos ha sido descrita en muchos taxa, presentándose en los moluscos en una frecuencia particularmente alta. Una explicación para la frecuente presencia de alelos nulos en la mayoría de los conjuntos de datos reales es el alto nivel de diferenciación que puede existir entre la población original y las poblaciones genotipadas (CHAPUIS y ESTOUP 2007).

4.1.1. Marcador *mac-1*

En este estudio para el locus *mac-1* se describieron nueve alelos de tamaño entre 266 a 353 pb. El número de alelos descrito, previamente para este marcador al usarlo para caracterizar genéticamente *M. galloprovincialis* en la zona noroeste de África, fue de 14 alelos distintos con tamaños que variaron desde 250 a 317 pb (DAGUIN *et al.* 2001; DAGUIN y BORSA 2000). La cantidad de alelos obtenidos en trabajos posteriores por los mismos autores, ha aumentado hasta describir 30 alelos distintos. La discrepancia en el número de alelos entre estos trabajos y este estudio, pueden deberse a que son poblaciones diferentes y por lo mismo pueden no tener el mismo pool génico. Adicionalmente, hubo diferencias en las técnicas de electroforesis utilizadas, ya que, estos autores realizaron una electroforesis vertical por 4 a 5 horas a 50 watts en un gel de poli(acrilamida) denaturado al 4% (DAGUIN y BORSA 1999), distinto

del utilizado en este estudio que fue un gel de poliacrilamida al 6% en una electroforesis vertical a 250 volts durante 2 horas.

Según Borsa *et al.* (2012), el marcador *mac-1* permite distinguir *M. edulis* y *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur con sus contrapartes del Hemisferio Norte (BORSA *et al.* 2012). En esta tesis, según las frecuencias alélicas obtenidas se puede distinguir entre los individuos de la especie *M. galloprovincialis* del Hemisferio Norte de los que pertenecen al Hemisferio Sur, basándose en las frecuencias de los alelos 353 y 320 pb.

Los resultados de la identificación de la especie usando el marcador *mac-1* fueron equivalentes al marcador de referencia en individuos de la especie *M. galloprovincialis*, ya que la sensibilidad y especificidad fueron superiores a 0,8, valor que indica que el ensayo es confiable (BURGUEÑO *et al.* 1995). En este estudio se vio que este marcador en *M. galloprovincialis* poseía alelos exclusivos que no estaban presentes en las otras dos especies, lo que permite no confundir esta especie de las otras. Al considerar los grupos de estudio, la mayor equivalencia con respecto al marcador de referencia fue en *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur en comparación a su contraparte del Hemisferio Norte. En las especies *M. edulis* y *M. chilensis* no hubo equivalencia, esto porque en este marcador no permite distinguir entre ambas de manera clara. Los individuos presuntamente híbridos extraídos de Chile fueron identificados como *M. chilensis* y *M. edulis*, confirmando la similitud genética descrita entre estas dos especies.

La reasignación cruzada entre *M. edulis* y *M. chilensis* observada en este estudio se condice con las conclusiones de estudios anteriores en los que se usaron los marcadores moleculares *ITS*, *Glu-5*, alozimas, *COI*, *mtDNA 16s rRNA* y el mismo *mac-1* que por sí solos o de manera complementaria consideraron que la especie que habita nuestras costas es *M. edulis* perteneciente al Hemisferio Sur o también denominado

recientemente como *M. edulis platensis* d'Orbigny 1846 (BORSA *et al.* 2012; TORO 1998b).

La calidad de identificación del marcador *mac-1*, resulta ser deficiente al evaluar la asignación en especies y en los grupos de estudio, ya que sólo cerca de la mitad de los individuos fueron reasignados correctamente. Las probabilidades de asignación también se mostraron bajas en todas las especies, siendo la probabilidad más alta en *M. galloprovincialis*, condiciéndose con la información obtenida de su equivalencia con Me 15-16 *Acil*.

De este estudio se desprende que *mac-1* resulta ser diagnóstico para la diferenciación de *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur y Norte de las otras especies, sin embargo, no logra hacer una distinción entre *M. edulis* y *M. chilensis*. Esto coincide la observación de que el marcador *mac-1* es útil principalmente para diferenciar entre las especies *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (DAGUIN y BORSA 1999).

4.1.2. Marcador RFLP COI XbaI

En el caso de RFLP de COI XbaI, este marcador resulta ser de especial importancia debido a que logra diferenciar *Mytilus chilensis* de las otras especies del complejo *Mytilus edulis*, pero sin realizar una diferenciación entre ellas. Se menciona en un trabajo reciente que el gen *citocromo oxidasa I* no podría utilizarse para diferenciar entre dos especies de manera clara, reflejando así la incertidumbre taxonómica para el género (HUXLEY-JONES *et al.* 2012).

Los resultados obtenidos con RFLP COI XbaI son equivalentes a los conseguidos con el marcador de referencia, la capacidad de este marcador mitocondrial para detectar la especie *M. chilensis* determinada por el marcador Me 15-16 *Acil* es de un 100% además de descartar en un 99% los individuos que no pertenecen a esta

especie, obteniéndose información redundante entre ambos marcadores inclusive siendo marcadores de distintas naturalezas, nuclear y mitocondrial.

Dos individuos *M. galloprovincialis* de Dichato según Me 15-16 *AcI*, *mac-1* y *mtDNA 16s rRNA* fueron identificados como *M. chilensis* por *COI XbaI*. Esta discrepancia entre *COI XbaI* y los demás marcadores puede deberse a un efecto de hibridación introgresiva que se realiza de manera natural entre las especies de *Mytilus*. Este fenómeno está bien documentado entre los híbridos dentro del complejo de *M. edulis* en América del Norte (RAWSON *et al.* 1999; RAWSON y HILBISH 1995; WOOD *et al.* 2003) y Europa (BIERNE *et al.* 2003; KIJEWski *et al.* 2006). Diversos grados de introgresión pueden producirse en zonas híbridas, de una especie a otra, pero no en ambos sentidos, es decir, de forma asimétrica (RAWSON 1998). Este intercambio genético puede permitir al híbrido la explotación de hábitats marginales que no están en el rango de distribución de las especies paternas y, por tanto, da lugar a la expansión de individuos híbridos a otros nichos. Debido a su estrecha proximidad taxonómica y a la hibridación introgresiva que se puede establecer en el complejo *M. edulis*, hay una alta probabilidad de que esté ocurriendo este fenómeno en las costas Chilenas donde coexisten *M. chilensis* y *M. galloprovincialis* (GARDNER y WESTFALL 2012).

La calidad de identificación del marcador *COI XbaI*, resulta ser muy alta al considerar sólo la especie y discriminando sólo a *M. chilensis* de las otras especies. Al añadir la información de las localidades donde provenían los individuos analizados, la calidad de identificación baja, siendo inferior a la mitad, por lo que este marcador no es bueno determinando el origen de donde provienen los individuos.

Los individuos presunto híbridos extraídos de Chile fueron identificados como *M. chilensis* casi en su totalidad, confirmando la característica de este marcador mitocondrial. Sólo uno de estos nueve presuntos híbridos no fue identificado como *M.*

chilensis, esto puede deberse a que en este caso predomina la información genética de las otras especies presentes en el complejo *M. edulis*.

4.1.3. Marcador *mtDNA 16s rRNA*

Con este marcador existe una alta equivalencia con el marcador de referencia para detectar la especie *M. chilensis* y descartar a los individuos que no pertenecen a esta especie. En las especies *M. galloprovincialis* y *M. edulis* no hubo equivalencia. Al evaluar la equivalencia con el marcador de referencia en los grupos de estudio, el desempeño disminuye sin lograr comportarse en forma similar.

El marcador *mtDNA 16s rRNA* en este estudio discriminó *M. chilensis* (identificado como *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur), de una manera más confiable, pero no logra distinguir *M. edulis* de *M. galloprovincialis* adecuadamente. En un análisis filogenético de los fragmentos de *mtDNA 16s rRNA* se ha revelado que existen cuatro linajes distintos, en donde el linaje mitocondrial de *M. edulis* incluye a *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, que es diferente de lo que se observado con marcadores nucleares, lo que puede explicar la discrepancia entre estos resultados. Se ha establecido que es posible que no exista concordancia en la asignación taxonómica lograda entre el marcador nuclear Me 15-16 *Acil* y el marcador mitocondrial *mtDNA 16s rRNA* en todos los individuos, debido a la hibridación introgresiva natural en las especies de mitílidos ya mencionada (GARDNER y WESTFALL 2012; WESTFALL *et al.* 2010). Se puede concluir que *mtDNA 16s rRNA* no es buen marcador para distinguir *M. galloprovincialis* y *M. edulis* o es posible que *M. galloprovincialis* de Galicia estén introgresados con *M. edulis*. Los datos obtenidos con este marcador y COI *Xbal* son una buena base para justificar que el estatus taxonómico de *M. chilensis* es distinto.

La calidad de identificación del marcador *mtDNA 16s rRNA*, resultó ser buena al considerar sólo la especie, y cae drásticamente al integrar la información de localidades de donde provienen los individuos. Con ello se descarta su uso para identificar individuos asociada al origen. La calidad de identificación fue mejor en *M. chilensis*, como fue en el caso de COI *XbaI*.

Los individuos *M. galloprovincialis* del Hemisferio Sur poseen sitio de corte para las enzimas de restricción *SpeI* y *NheI*, y los del Hemisferio Norte sólo poseen sitio de corte para *SpeI*. Pero no se había descrito que la enzima *EcoRV* tuviera sitio de corte para estas especies. En este estudio dos individuos *M. galloprovincialis* poseen sitio de corte para la enzima de restricción *EcoRV* generando en el producto PCR un fragmento de 113 pb entre los sitios de corte *SpeI* y *EcoRV* (ver **Figura 4**). El hallazgo de este alelo nuevo no se había descrito anteriormente, es posible que haya aparecido el sitio de restricción para *EcoRV* por hibridación entre *M. galloprovincialis* y *M. edulis*. Dado esto es que los individuos portadores de este nuevo alelo fueron asignados a *M. edulis* con este marcador (ver **Tabla 10**).

De acuerdo a los análisis de asignación realizados en los presuntos híbridos *M. chilensis* x *M. trossulus* extraídos en Chile, este marcador *mtDNA 16s rRNA* no resulta ser bueno para evaluar el origen de los individuos, todos fueron identificados como *M. galloprovincialis*, ocho de nueve fueron identificados como provenientes del Hemisferio Sur y uno del Hemisferio Norte. Este marcador reconoce en dos individuos presuntos híbridos, la existencia del alelo característico de *M. trossulus*, coincidiendo con la información obtenida con Me 15-16 *AccI*.

Según datos bibliográficos, en el sector donde originalmente habita *M. trossulus*, que es Norte América y el mar Báltico, se ha generado introgresión entre *M. galloprovincialis*, *M. trossulus* y *M. edulis*, explicándose con ello la presencia de híbridos

con composición genética mixta que pueden reconocerse mediante marcadores mitocondriales (ZBAWICKA *et al.* 2010).

El hallazgo de individuos que según el marcador *mtDNA 16s rRNA* tienen los alelos característicos de *M. edulis x M. galloprovincialis x M. trossulus*, coincide con reportes anteriores en poblaciones cultivadas y nativas de Escocia (DIAS *et al.* 2009). Los híbridos de los mitílidos resultan ser fértiles y están capacitados para realizar retrocruzamiento entre ellos (DIAS *et al.* 2009; RAWSON *et al.* 1999). Los factores mencionados para explicar la presencia de estos híbridos, son la sincronía del desove de las especies parentales, compatibilidad de los gametos, además de la influencia humana a través del tráfico marítimo y el cultivo comercial, entre otros (DIAS *et al.* 2009).

4.1.4. Equivalencia entre marcadores

Con los resultados de este estudio se puede evidenciarse que existe concordancia entre los resultados de *COI XbaI* y *mtDNA 16s rRNA* al lograr distinguir a *M. chilensis* de las otras especies. Si bien no se ha utilizado este último marcador con anterioridad en individuos presentes en las costas chilenas, por los alelos encontrados son iguales a los descritos en individuos de Nueva Zelanda. En cambio, el marcador *COI XbaI*, de acuerdo a Fernández-Tajes (2011), permite diferenciar entre individuos *M. chilensis* y los mitílidos presentes en las costas de Nueva Zelanda. El marcador *mac-1* permite distinguir a *M. galloprovincialis* de Hemisferio Sur y Norte, gracias a sus alelos privados.

Existe equivalencia entre los marcadores *COI XbaI* y *Me 15-16 AclI*, aunque uno sea de naturaleza mitocondrial y el otro nuclear, no se justifica usarlos de manera conjunta porque se obtiene información redundante. No sucede así con *mtDNA 16s rRNA* y *Me 15-16 AclI*, donde no hay equivalencia entre ambos. La discordancia entre los

marcadores moleculares nucleares y mitocondriales en mitílidos ha sido descrita por Gardner y Westfall (2012) sugiriendo al menos dos posibilidades: En primer lugar, las pruebas con marcadores mitocondriales por sí mismas no son perfectamente diagnósticas para conocer la especie porque la divergencia entre los haplotipos del Hemisferio Sur y del Norte sería anterior a la divergencia de los haplotipos típicos de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* actuales (GERARD *et al.* 2008). Una segunda posibilidad es la mencionada hibridación introgresiva (GARDNER y WESTFALL 2012).

Se han determinado factores exógenos y endógenos que pueden afectar la equivalencia entre estos marcadores moleculares. Los diferentes marcadores moleculares describen un polimorfismo en diferentes loci distribuidos por todo el genoma. Si estos marcadores son neutrales, los marcadores se ven influenciados por los procesos evolutivos de la población biogeográfica e histórica (por ejemplo, el aislamiento, la deriva genética, la hibridación y la introgresión). Si no son funcionalmente neutrales, pueden además estar sujetos a la presión de selección (KIJEWski *et al.* 2011). El tamaño efectivo de la población y una mayor tasa de mutación puede aumentar la discrepancia entre marcadores mitocondriales y nucleares. Las diferencias en los mecanismos de herencia entre *mtDNA* (herencia uniparental doblemente y la recombinación en *Mytilus*) y el DNA nuclear se añade a los factores subyacentes a la incongruencia observada por el uso de estos marcadores moleculares (KIJEWski *et al.* 2011).

4.2. Determinación del panel de marcadores más informativo

Utilizar los marcadores moleculares en su conjunto para realizar la identificación de la especie de los individuos, permite aprovechar de manera sinérgica las capacidades que tienen de identificar especies, tal como lo sugirieron GARDNER y WESTFALL (2012),

que emplean de manera complementaria diferentes marcadores en una misma población para realizar el genotipado aumentando el poder diagnóstico. La selección de un panel de marcadores resulta vital para no perder información ni gastar recursos generando datos redundantes, creando un panel que minimice la cantidad de marcadores empleados y que maximice su potencia. Al momento de seleccionar un panel de marcadores debe considerarse los recursos disponibles, el error de genotipado y la habilidad de distinguir a los individuos que posea dicho panel. Algunos marcadores resultan ser más informativos que otros, y es necesario determinar cuáles serán los marcadores que se incluirán en el panel, usando como criterio su desempeño diagnóstico (HELYAR *et al.* 2011; SANDERLIN *et al.* 2012).

Según la información que se obtuvo de los datos de Genclass2, un panel de marcadores con el que se obtiene la mejor equivalencia y calidad de identificación junto con abaratar los costos y tiempo de análisis es eligiendo las combinaciones de *mac-1*, y Me 15-16 *Acil* para identificar especies y los grupos de estudio. Sin utilizar el marcador de referencia, el uso de los otros tres marcadores combinados resulta ser una buena alternativa obteniéndose un porcentaje mayor al 90% de individuos correctamente asignados. Con la información obtenida a partir de GeneClass2, se puede concluir que el uso de los marcadores nucleares evaluados permite obtener una información enriquecida para identificar las especies y que esta identificación sea de calidad. Es posible que el hecho de que *mac-1* sea un marcador de múltiples alelos, le permite ser más informativo, respaldándose además por el valor de PIC de este marcador que fue de 0,691, lo que se considera como altamente informativo (HE *et al.* 2012).

El programa BELS determinó que la combinación de *mac-1*, *mtDNA 16s rRNA* y Me 15-16 *Acil* forman el panel más eficiente para identificar grupos de estudio, ya que maximiza la información y minimiza los recursos empleados. Es posible prescindir de *COI XbaI* que aporta casi la misma información que Me 15-16 *Acil*. Para identificar sólo

la especie de los individuos este último marcador resulta ser eficiente por si sólo ya que el porcentaje de asignación fue de 99.341%. Si se descarta el marcador de referencia Me 15-16 *AcI* para identificar las especies, los marcadores *mtDNA 16s rRNA* y *mac-1* permiten obtener un porcentaje de asignación por sobre el 90%. El mejor panel de marcadores moleculares para realizar la identificación de especie en los individuos resultó ser el constituido por los marcadores nucleares *mac-1* y Me 15-16 *AcI*.

Los marcadores moleculares utilizados en este estudio, se aproximan a cumplir con un primer nivel de trazabilidad, que sería la identificación de especie, sin embargo no resultan ser una buena herramienta para cumplir con los otros niveles de trazabilidad de la cadena alimentaria como son el determinar el origen geográfico y el seguimiento a través de la cadena (OGDEN 2008).

4.3. Evaluar la capacidad de discriminar distintas especies de los marcadores moleculares en productos procesados

En casi la totalidad de las muestras de choritos en escabeche no pudo obtenerse DNA. Una explicación para esto es que estas muestras fueron tratadas con ácido acético, a esto se suma los efectos que puedan causar las altas temperaturas durante el procesamiento de los choritos. El DNA es muy sensible a los ácidos y agentes alcalinos, lo que facilita la degradación hidrolítica en el curso de los tratamientos térmicos. Medios con pH bajo se han descrito que favorecen una mayor degradación del DNA, los enlaces 3,5-fosfodiéster adyacente se hidrolizan, lo que conduce al acortamiento de las cadenas de DNA (ARMANI *et al.* 2012). Esto pudo haber provocado que no sea posible obtener suficiente DNA de calidad para realizar el procedimiento PCR posterior en muestras en escabeche (KATZAV *et al.* 2008; ROSSEN *et al.* 1992).

El marcador *mac-1* no es adecuado para la identificación de especie en muestras de productos procesados ya que en este estudio no hubo amplificación en las muestras. Es posible que esto se deba a que el tamaño de los alelos es muy grande (266 a 353 pb) para que el DNA permanezca integro frente al tratamiento térmico al que son sometidas las muestras, lo que imposibilite la amplificación de fragmentos en las regiones deseadas. Basándose en el tamaño de los amplicones el marcador *mtDNA 16s rRNA* (527 pb) tampoco resultaría adecuado para productos procesados.

Es posible utilizar los marcadores Me 15-16 *Acil* y *COI Xbal* en muestras procesadas para lograr la identificación de las distintas especies, como lo mencionó anteriormente Santa Clara *et al.* (2006) con respecto al uso de Me 15-16 *Acil* en muestras de mejillones enlatados. Los resultados obtenidos con el marcador Me 15-16 *Acil* fueron los esperados según lo etiquetado en los productos, y el lugar de donde provienen las muestras. Sin embargo, con el marcador mitocondrial *COI Xbal* en las muestras provenientes de Corea, se encontró siete muestras con un genotipo característico de *M. chilensis*. Es importante destacar que este marcador fue diseñado y probado por Fernández-Tajes (2011) en *M. galloprovincialis*, *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. californianus*, *M. chilensis* y *M. coruscus*, siendo este último proveniente de China, por lo que no ha sido probado este marcador en muestras de Corea con anterioridad. Es probable que las poblaciones que habitan en Corea sean semejantes a las presentes en las costas chilenas en esa región del genoma mitocondrial.

Es importante mencionar que la capacidad para identificar la especie en muestras de productos procesados que son comercializados y la confianza en el etiquetado del producto (HUXLEY-JONES *et al.* 2012) junto con su autenticación, puede afectar la elección del consumidor, y por lo mismo es importante llegar a conseguir un método para asignar a origen geográfico con mayor certeza las especies que pueden estar presentes en las costas chilenas, y asociarlo como valor agregado para su

comercialización en un futuro potenciando su distinción. Según los resultados obtenidos, utilizar el marcador Me 15-16 *AcI* es la opción más adecuada para identificar especies en las muestras procesadas.

5. CONCLUSIONES

Al evaluar los marcadores moleculares utilizados en la identificación y autenticación de especies de mitílidos, se pudo concluir que el panel más informativo de marcadores para este propósito son Me 15-16 *Acil* y *mac-1*, utilizados en conjunto. No disminuye considerablemente el porcentaje de asignación al utilizar solamente Me 15-16 *Acil*, siendo este marcador más recomendable para usar solo.

Al evaluar la equivalencia y calidad en la identificación de la especie del marcador nuclear del intrón del gen de la actina (*mac-1*) en mitílidos, éste marcador es equivalente a Me 15-16 *Acil* en la distinción de la especie *M. galloprovincialis*, pero no logra una diferenciación entre las especies *M. edulis* y *M. chilensis*, que sí hace el marcador de referencia (Me 15-16 *Acil*).

El marcador *COI XbaI* resulta ser equivalente al marcador de referencia (Me 15 -16 *Acil*) para distinguir a *M. chilensis* de las demás especies. Se sugiere usar este marcador de manera independiente y no complementaria al marcador de referencia, porque da información redundante. *COI XbaI* tiene la limitación de no identificar específicamente las restantes especies del complejo *M. edulis* (*M. edulis*, *M.galloprovincialis* y *M. trossulus*). Además este marcador debería probarse previamente en poblaciones como las de Corea para validar su poder identificador de *M. chilensis*.

Al evaluar la equivalencia y calidad de identificación de especie del marcador *mtDNA 16s rRNA* se concluye que es equivalente a Me 15-16 *Acil* para *M. chilensis*, pero no permite diferenciar entre *M. galloprovincialis* y *M. edulis*.

Es posible utilizar los marcadores moleculares RFLP Me 15 16 *Acil* y *COI Xbal* en productos procesados al natural, en ahumado en aceite y congelados. Se recomienda el uso de Me 15-16 *Acil* en productos procesados.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILERA-MUÑOZ, F., V. VALENZUELA-MUÑOZ y C. GALLARDO-ESCARATE, 2008 Authentication of Commercial Chilean Mollusks Using Ribosomal Internal Transcribed Spacer (Its) as Specie-Specific DNA Marker. *Gayana* **72**: 178-187.
- AMICHILE, 2010 Exportación de Moluscos Seleccionados (Exportación y Cultivo), pp.
- AQUA, 2009 AMICHILE y ProChile avanzan en promoción del mejillón chileno, pp.
- ARMANI, A., L. CASTIGLIEGO, L. TINACCI, D. GIANFALDONI y A. GUIDI, 2012 Multiplex conventional and real-time PCR for fish species identification of Bianchetto (juvenile form of *Sardina pilchardus*), Rossetto (*Aphia minuta*), y Icefish in fresh, marinated and cooked products. *Food Chemistry* **133**: 184-192.
- ARRIAGADA, G., 2005 Trazabilidad en la miticultura: Un desafío, una oportunidad, pp. 24 in *I Curso de Análisis de Riesgo y Trazabilidad para la Miticultura*. Laboratorio de Toxinas Marinas y Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- ASTORGA, M., 2008 Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura, pp. 277 -287 in *Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina*, edited by F. A. D. P. Y. ACUICULTURA. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile, Roma.
- BARBUTO, M., A. GALIMBERTI, E. FERRI, M. LABRA, R. MALANDRA *et al.*, 2010 DNA barcoding reveals fraudulent substitutions in shark seafood products: The Italian case of “palombo” (*Mustelus* spp.). *Food Research International* **43**: 376-381.
- BELKHIR, K., P. BORSA, I. L. CHIKH, N. RAUFASTE y F. BONHOMME, 1996 GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations., pp. in *CNRS UMR 5000*, edited by P. LABORATOIRE GÉNOME, INTERACTIONS, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- BIERNE, N., P. BORSA, C. DAGUIN, D. JOLLIVET, F. VIARD *et al.*, 2003 Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Molecular Ecology* **12**: 447-461.

- BONIN, A., E. BELLEMAIN, P. BRONKEN EIDENSEN, F. POMPANON, C. BROCHMANN *et al.*, 2004 How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* **13**: 3261-3273.
- BORSA, P., C. DAGUIN, S. R. CAETANO y F. BONHOMME, 1999 Nuclear-DNA evidence that northeastern Atlantic *Mytilus trossulus* mussels carry *M. edulis* genes. *Journal of Molluscan Studies* **65**: 504-507.
- BORSA, P., V. ROLLAND y C. DAGUIN-THIEBAUT, 2012 Genetics and taxonomy of Chilean smooth-shelled mussels, *Mytilus* spp. (Bivalvia: Mytilidae). *C R Biol* **335**: 51-61.
- BROMAGHIN, J. F., 2008 bels: backward elimination locus selection for studies of mixture composition or individual assignment. *Molecular Ecology Resources* **8**: 568-571.
- BURGUEÑO, M. J., J. L. GARCIA-BASTOS, *et al.* (1995). "[ROC curves in the evaluation of diagnostic tests]." *Medicina Clinica (Barcelona)* **104**(17): 661-670.
- CABEZAS, M., 2007 Rastreando la Trazabilidad en Salmonicultura, pp. 16 in *Salmociencia*. Intenal de SalmonChile.
- CAPORALE, V., A. GIOVANNINI, C. DI FRANCESCO y P. CALISTRI, 2001 Importance of the Traceability of Animals and Animal Products in Epidemiology, pp. 372 - 378 in *Scientific and Technical Review of the Office International of Epizooties*.
- CÁRCAMO, C., A. S. COMESANA, F. M. WINKLER y A. SANJUAN, 2005 Allozyme identification of mussels (Bivalvia : *Mytilus*) on the Pacific coast of South America. *Journal of Shellfish Research* **24**: 1101-1115.
- CODEX.ALIMENTARIUS, 2006 Principios para la Rastreabilidad/Rastreo de Productos como Herramienta en el Contexto de la Inspección y Certificación de Alimentos, pp. 3 in *CAC/GL 60-2006*.
- COGHLAN, B., y E. GOSLING, 2007 Genetic structure of hybrid mussel populations in the west of Ireland: two hypotheses revisited. *Marine Biology* **150**: 841-852.
- COLLINS, D. W., y T. H. JUKES, 1994 Rates of Transition and Transversion in Coding Sequences since the Human-Rodent Divergence. *Genomics* **20**: 386-396.
- CORFO, 2003 Mejillón Chileno, Ficha Choritos Sector Acuícola, pp.

- CHAPUIS, M. P., y A. ESTOUP, 2007 Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 621-631.
- DAGUIN, C., F. BONHOMME y P. BORSA, 2001 The zone of sympatry and hybridization of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*, as described by intron length polymorphism at locus *mac-1*. *Heredity (Edinb)* **86**: 342-354.
- DAGUIN, C., y P. BORSA, 1999 Genetic characterisation of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in North West Africa using nuclear DNA markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **235**: 55-65.
- DAGUIN, C., y P. BORSA, 2000 Genetic relationships of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck populations worldwide: evidence from nuclear-DNA markers. Geological Society, London, Special Publications **177**: 389-397.
- DALVIT, C., M. DE MARCHI y M. CASSANDRO, 2007 Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science* **77**: 437-449.
- DEEKS, J. J., y D. G. ALTMAN, 2004 Diagnostic tests 4: likelihood ratios. *BMJ* **329**: 168-169.
- DIAS, P. J., A. DORDOR, D. TULETT, S. PIERTNEY, I. M. DAVIES *et al.*, 2009 Survey of mussel (*Mytilus*) species at Scottish shellfish farms. *Aquaculture Research* **40**: 1715-1722.
- FAO, 2003 Garantía de la Inocuidad y Calidad de los Alimentos: Directrices para el Fortalecimiento de los Sistemas Nacionales de Control de los Alimentos, pp. 94.
- FAO, 2005 National Aquaculture Sector Overview. Visión general del sector acuícola nacional - Chile. National Aquaculture Sector Overview Fact Sheets, pp. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO
- FAO, 2011 *Estadísticas de Pesca y Acuicultura*. Departamento de Pesca y Acuicultura de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), Roma, Italia.
- FELMER, R., B. SAGREDO, R. CHAVEZ, S. IRAIRA, C. FOLCH *et al.*, 2008 Implementation of a Molecular System for Traceability of Beef Based on Microsatellite Markers. *Chilean Journal of Agricultural Research* **68**: 342-351.

- FERNANDEZ-TAJES, J., A. LONGA, J. GARCIA-GIL, Y. W. CHIU, Y. S. HUANG *et al.*, 2011 Alternative PCR-RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification. *European Food Research and Technology* **233**: 791-796.
- GARDNER, J. P. A., y K. M. WESTFALL, 2012 Geographic Distribution and Molecular Identification of a Metapopulation of Blue Mussels (Genus *Mytilus*) in Northeastern New Zealand. *Journal of Molluscan Studies* **78**: 66-73.
- GERARD, K., N. BIERNE, P. BORSA, A. CHENUIL y J. P. FERAL, 2008 Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. mussels from Northern and Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**: 84-91.
- GUERRERO, M. Á., 2006 Evaluación Técnica y Económica del Proceso de Cosecha de Choritos en Plataforma Flotante, pp. 78 in *Facultad de Ciencias de la Ingeniería, Escuela de Ingeniería Mecánica*. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- HAYES, B., A. K. SONESSON y B. GJERDE, 2005 Evaluation of three strategies using DNA markers for traceability in aquaculture species. *Aquaculture* **250**: 70-81.
- HE, L., Y.-N. XIE, W. LU, Y. WANG, L.-L. CHEN *et al.*, 2012 Genetic diversity in three redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*, von Martens) lines developed in culture in China. *Aquaculture Research* **43**: 75-83.
- HEATH, D. D., P. D. RAWSON y T. J. HILBISH, 1995 PCR-based nuclear markers identify alien blue mussel (*Mytilus* spp.) genotypes on the west coast of Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **52**: 2621-2627.
- HELYAR, S. J., J. HEMMER-HANSEN, D. BEKKEVOLD, M. I. TAYLOR, R. OGDEN *et al.*, 2011 Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. *Molecular Ecology Resources* **11**: 123-136.
- HILBISH, T. J., E. W. CARSON, J. R. PLANTE, L. A. WEAVER y M. R. GILG, 2002 Distribution of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and their hybrids in open-coast populations of mussels in southwestern England. *Marine Biology* **140**: 137-142.
- HILBISH, T. J., A. MULLINAX, S. I. DOLVEN, A. MEYER, R. K. KOEHN *et al.*, 2000 Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of transequatorial migration. *Marine Biology* **136**: 69-77.

- HUXLEY-JONES, E., J. L. A. SHAW, C. FLETCHER, J. PARNELL y P. C. WATTS, 2012 Use of DNA Barcoding to Reveal Species Composition of Convenience Seafood. *Conservation Biology* **26**: 367-371.
- INOUE, K., J. H. WAITE, M. MATSUOKA, S. ODO y S. HARAYAMA, 1995 Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and *M. trossulus*. *Biological Bulletin* **189**: 370-375.
- JACQUET, J. L., y D. PAULY, 2008 Trade secrets: Renaming and mislabeling of seafood. *Marine Policy* **32**: 309-318.
- KATZAV, M., P. ISOHANNI, M. LUND, M. HAKKINEN y U. LYHS, 2008 PCR assay for the detection of *Campylobacter* in marinated and non-marinated poultry products. *Food Microbiology* **25**: 908-914.
- KIJEWSKI, T., B. ŚMIETANKA, M. ZBAWICKA, E. GOSLING, H. HUMMEL *et al.*, 2011 Distribution of *Mytilus* taxa in European coastal areas as inferred from molecular markers. *Journal of Sea Research* **65**: 224-234.
- KIJEWSKI, T., J. W. M. WIJSMAN, H. HUMMEL y R. WENNE, 2009 Genetic composition of cultured and wild mussels *Mytilus* from The Netherlands and transfers from Ireland and Great Britain. *Aquaculture* **287**: 292-296.
- KIJEWSKI, T. K., M. ZBAWICKA, R. VAINOLA y R. WENNE, 2006 Introgression and mitochondrial DNA heteroplasmy in the Baltic populations of mussels *Mytilus trossulus* and *Mytilus edulis*. *Marine Biology* **149**: 1371-1385.
- KRAPIVKA, S., J. E. TORO, A. C. ALCAPAN, M. ASTORGA, P. PRESA *et al.*, 2007 Shell-shape variation along the latitudinal range of the Chilean blue mussel *Mytilus chilensis* (Hupe 1854). *Aquaculture Research* **38**: 1770-1777.
- LARRAIN, M., N. DIAZ, C. LAMAS, C. VARGAS, C. ARANEDA, 2012 Genetic composition of *Mytilus* species in mussel populations from southern Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research* **40**, n.4: 1077-1084. ISSN 0718-560X. <http://dx.doi.org/10.3856/vol40-issue4-fulltext-23>.
- LÓPEZ, M., P. MALLORQUÍN y M. VEGA, 2003 *Tecnologías Moleculares de Trazabilidad Alimentaria. Informe de Vigilancia Tecnológica*. Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Gnómica y Proteómica/ Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

- MALDINI, M., F. N. MARZANO, G. G. FORTES, R. PAPA y G. GANDOLFI, 2006 Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. *Aquaculture* **261**: 487-494.
- MCDONALD, J. H., R. SEED y R. K. KOEHN, 1991 Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus*; in the Northern and Southern Hemispheres. *Marine Biology* **111**: 323-333.
- OGDEN, R., 2008 Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries* **9**: 462-472.
- OHRESSER, M., P. BORSA y C. DELSERT, 1997 Intron-length polymorphism at the actin gene locus mac-1: A genetic marker for population studies in the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk and *M. edulis* L. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **6**: 123-130.
- OUAGAJJOU, Y., P. PRESA, M. ASTORGA y M. PEREZ, 2011 Microsatellites of *Mytilus Chilensis*: A Genomic Print of Its Taxonomic Status within *Mytilus* Sp. *Journal of Shellfish Research* **30**: 325-330.
- PAETKAU, D., W. CALVERT, I. STIRLING y C. STROBECK, 1995 Microsatellite Analysis of Population-Structure in Canadian Polar Bears. *Molecular Ecology* **4**: 347-354.
- PIRY, S., A. ALAPETITE, J. M. CORNUET, D. P. AETKAU, L. BAUDOUIN *et al.*, 2004 GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity* **95**: 536-539
- QUINTEIRO, J., C. G. SOTELO, H. REHBEIN, S. E. PRYDE, I. MEDINA *et al.*, 1998 Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**: 1662-1669.
- RAWSON, P. A. H., T., 1998 Asymmetric Introgression of Mitochondrial DNA Among European Populations of Blue Mussels (*Mytilus* spp.). *Evolution* **52**: 100-108.
- RAWSON, P. D., V. AGRAWAL y T. J. HILBISH, 1999 Hybridization between the blue mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* along the Pacific coast of North America: evidence for limited introgression. *Marine Biology* **134**: 201-211.

- RAWSON, P. D., y T. J. HILBISH, 1995 Evolutionary relationships among the male and female mitochondrial DNA lineages in the *Mytilus edulis* species complex. *Molecular Biology and Evolution* **12**: 893-901.
- RAWSON, P. D., K. L. JOYNER, K. MEETZE y T. J. HILBISH, 1996 Evidence for intragenic recombination within a novel genetic marker that distinguishes mussels in the *Mytilus edulis* species complex. *Heredity* **77**: 599-607.
- RAWSON, P. D., C. SLAUGHTER y P. O. YUND, 2003 Patterns of gamete incompatibility between the blue mussels *Mytilus edulis* and *M.trossulus*. *Marine Biology* **143**: 317-325.
- REGO, I., A. MARTINEZ, A. GONZALEZ-TIZON, J. VIEITES, F. LEIRA *et al.*, 2002 PCR technique for identification of mussel species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 1780-1784.
- RIGINOS, C., K. SUKHDEO y C. W. CUNNINGHAM, 2002 Evidence for selection at multiple allozyme loci across a mussel hybrid zone. *Molecular Biology and Evolution* **19**: 347-351.
- ROSSEN, L., P. NØRSKOV, K. HOLMSTRØM y O. F. RASMUSSEN, 1992 Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology* **17**: 37-45.
- SANDERLIN, J. S., N. LAZAR, M. J. CONROY and J. REEVES, 2012 Cost-efficient selection of a marker panel in genetic studies. *The Journal of Wildlife Management* **76**: 88-94.
- SANTACLARA, F. J., M. ESPINEIRA, G. CABADO, A. ALDASORO, N. GONZALEZ-LAVIN *et al.*, 2006 Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 8461-8470.
- SEGUEL, M., 2011 Evaluation of the taxonomic status of *Mytilus chilensis* using the mitochondrial gene *cytochrome C oxidase subunit I* (COI). , pp. 23 in *XXXI Congreso de Ciencias del Mar, B. Campos (ed.)*. Viña del Mar, Chile.
- SERNAPESCA, 2012 Anuario 2011 - Desembarque Total por Especie y Región, 2011., pp.
- SKURIKHINA, L. A., Y. F. KARTAVTSEV, A. Y. CHICHVARKHIN y M. V. PAN'KOVA, 2001 Study of Two Species of Mussels, *Mytilus trossulus* and *Mytilus galloprovincialis*

- (*Bivalvia, Mytilidae*), and Their Hybrids in Peter the Great Bay of the Sea of Japan with the Use of PCR Markers. Russian Journal of Genetics **37**: 1448-1451.
- TARIFEÑO, E., R. GALLEGUILLOS, J. P. A. GARDNER, I. LÉPEZ, D. ARRIAGADA *et al.*, 2005 Presencia de mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) (*Bivalvia*, Mollusca) en las costas de la Región del Biobío, Chile., pp. 5 in *XI Congreso latinoamericano de Ciencias del Mar, U. C. Valparaíso (ed.)*, Viña del Mar, Chile.
- TORO, J., D. J. INNES and R. J. THOMPSON, 2004 Genetic variation among life-history stages of mussels in a *Mytilus edulis*, *M. trossulus* hybrid zone. Marine Biology **145**: 713-725.
- TORO, J. E., 1998a Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: The potential use in studies involving planktonic surveys. Journal of Shellfish Research **17**: 1203-1205.
- TORO, J. E., 1998b PCR-based nuclear and mtDNA markers shell morphology as an approach to study the taxonomic status of the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (*Bivalvia*). Aquatic Living Resources **11**: 347-353.
- TORO, J. E., G. C. CASTRO, J. A. OJEDA y A. M. VERGARA, 2006 Allozymic variation and differentiation in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis*, along its natural distribution. Genetics and Molecular Biology **29**: 174-179.
- TORO, J. E., J. A. OJEDA, A. M. VERGARA, G. C. CASTRO y A. C. ALCAPAN, 2005 Molecular characterization of the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) demonstrates evidence for the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* in southern Chile. Journal of Shellfish Research **24**: 1117-1121.
- TORO, J. E., R. J. THOMPSON y D. J. INNES, 2002 Reproductive isolation and reproductive output in two sympatric mussel species (*Mytilus edulis*, *M. trossulus*) and their hybrids from Newfoundland. Marine Biology **141**: 897-909.
- UNION.EUROPEA, 2000 Reglamento CE N° 104/2000 por el que se establece la organización común de mercados en el sector de los productos de la pesca de la acuicultura., pp. 31 in *N° 104/2000*, edited by C. EUROPEA, Diario Oficial de las Comunidades Europeas.
- UNION.EUROPEA, 2001 Reglamento CE N° 2065/2001 por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n° 104/2000 del Consejo en lo relativo a la información del consumidor en el sector de los productos de la pesca

y de la acuicultura., pp. 7 in *Nº 2065/2001*, edited by C. EUROPEA, Diario Oficial de las Comunidades Europeas.

URIARTE, I., 2008 Estado Actual del Cultivo de Moluscos Bivalvos en Chile. , pp. 61 - 75 in *Estado Actual del Cultivo y Manejo de Moluscos Bivalvos y su Proyección Futura: Factores que Afectan su Sustentabilidad en América Latina*, edited by F. A. D. P. Y. ACUICULTURA. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile, Roma, Italia.

WESTFALL, K. M., y J. P. A. GARDNER, 2010 Genetic diversity of Southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: *Mytilidae*) and the identification of non-indigenous taxa. *Biological Journal of the Linnean Society* **101**: 898-909.

WESTFALL, K. M., P. H. WIMBERGER y J. P. A. GARDNER, 2010 An RFLP assay to determine if *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (*Mytilidae*; Bivalvia) is of Northern or Southern hemisphere origin. *Molecular Ecology Resources* **10**: 573-575.

WONHAM, M. J., 2004 Mini-review: Distribution of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia : *Mytilidae*) and hybrids in the Northeast Pacific. *Journal of Shellfish Research* **23**: 535-543.

WOOD, A. R., A. R. BEAUMONT, D. O. F. SKIBINSKI y G. TURNER, 2003 Analysis of a nuclear-DNA marker for species identification of adults and larvae in the *Mytilus edulis* complex. *Journal of Molluscan Studies* **69**: 61-66.

ZBAWICKA, M., A. BURZYNSKI, D. SKIBINSKI y R. WENNE, 2010 Scottish *Mytilus trossulus* mussels retain ancestral mitochondrial DNA: complete sequences of male and female mtDNA genomes. *Gene* **456**: 45-53.

ZBAWICKA, M., A. DRYWA, B. ŚMIETANKA y R. WENNE, 2012 Identification and validation of novel SNP markers in European populations of marine *Mytilus* mussels. *Marine Biology* **159**: 1347-1362.

ZOUROS, E., 2000 The exceptional mitochondrial DNA system of the mussel family *Mytilidae*. *Genes & Genetic Systems* **75**: 313-318.

7. ANEXOS

7.1. ANEXO 1: Método de extracción de DNA fenol cloroformo para *Mytilus*

Materiales

<i>Soluciones</i>	<i>Materiales</i>
1.0.2 EDTA pH 8.0; 0.5% sodium lauroylsarcosine (SIGMA L-5125) ó 50 mM	1. TuboEppendorff con tapa estériles
Tris HCl pH 8.0; 100 mM EDTA pH 8.0; 100 mM NaCl; 1% SDS	2. Puntas de micropipetas estériles
roteinasa K 20 mg / ml	3. Baño de agua / incubador a 55 o a 37°C
2. Solución saturada de NaCl (36g en 100 ml agua)	4. Set micropipetas
3. RNAsa (libre de DNAsa) 20 mg/ml	5. Gradillas para tubos PCR
4. Fenol saturado básico pH 8.0	6. Guantes
5. Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)	7. Toalla nova
6.Etanol 92%	8. Termociclador
7. Etanol 70%	9. Puntas de pipetas autoclavadas
8. Tampón TE (10mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0) (¼ TE; ¾ Agua PCR)	10. Lápiz marcador

Método

Día 1

1. Agregar a cada tubo Eppendorff 375 µl de la Solución 1 y 10 ul de Proteinasa K
- 2 .Agregar tejido a cada tubo (por ejemplo 70 mg músculo, 10 mg hígado), secar con un papel absorbente exceso de Etanol del tejido.
3. Agitar vigorosamente e incubar (baño de agua) durante la noche, con movimiento, a una temperatura de 37° C. O dejar por 2 a 4 horas a 55°C.

Día 2

1. Agregar 10 μ l de RNAsa a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos e incubar por 60 minutos a una temperatura de 37° C.
2. Agregar 130 μ l de NaCl saturado. Agitar vigorosamente.
3. Centrifugar 12.000 rpm por 10 minutos.
4. Trasladar sobrenadante a tubo limpio de 2 ml.
5. Agregar 400 μ l de Fenol a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos y luego agitarla por 20 minutos.
6. Agregar 400 μ l de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos y luego agitarla por 20 minutos.
7. Centrifugar los tubos (Ej. 10.000 rpm) durante 5 minutos
8. Cuidadosamente remover 370 μ l de la fase acuosa superior (usando una punta de micropipeta de boca ancha) a un tubo Eppendorff nuevo. Nota: No tocar el material de la interfase. Usar solo las fases acuosas libres de desechos residuales.
9. Agregar 900 μ l de Etanol 92% frío. Mezclar mediante vigorosa inversión de los tubos 6 veces. El DNA debiera precipitar (condensarse). Si no ocurre poner a -80°C por 15 min. Separar antes de 15 mins (de lo contrario pp también el EDTA)
10. Centrifugar 2 minutos a 5.000 rpm.
11. Extraer el Etanol volteando cuidadosamente el tubo.
12. Agregar 1000 μ l de Etanol 70% frío.
13. Agitar suavemente durante 30 minutos.
14. Cuidadosamente extraer el Etanol volteando el tubo.
15. Cuidadosamente extraer el Etanol restante (100 μ l) usando una micropipeta.
16. Permitir que el DNA se seque parcialmente a temperatura ambiente (5 minutos), NO permitir que se seque completamente.
17. Resuspender el pellet en el tampón TE (en 100 μ l). Permitir que el DNA se disuelva a temperatura ambiente por dos días. Luego congelar el DNA a -70° C.

7.2. ANEXO 2: Identificación del género

Materiales

1. H₂O PCR
2. Enzima BsaHI con su tampón NE 10X
3. Enzima TAQ con su tampón y Mg+2 (RBC)
4. Partidores Mus RFLP F y R
5. dNTP's
6. Tubos Eppendorff 1,6 y 0,6 ml DNAsa, RNAasa free (o autoclavados)
7. Puntas de micropipetas DNAsa, RNAasa free (o autoclavadas)
8. Baño de agua / incubador a 55 y 37°C
9. Set micropipetas
10. Gradillas para tubos PCR
11. Guantes
12. Toalla Nova
13. Termociclador
14. Puntas de pipetas autoclavadas
15. Lápiz marcador

Método

Amplificación

Previamente se realizó un gradiente de temperatura de annealing y se determinó 66°C (SANTA CLARA *et al.* 2006) recomendaba 63°C).

Partidores MusRFLP (F y R) amplifican un fragmento del gen que codifica para la subunidad pequeña (18s) del ribosoma.

La amplificación se realiza en un volumen final de 25 µl de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación:

PCR-RFLP <i>MusRFLP</i>			
	1	15	Volúmen
H₂O PCR	14.975	224.6	23

Buffer KCl	2.5	37.5	
Mg⁺²	0.25	3.8	
dNTP's	0.125	1.9	
Mus RFLP F	2.5	37.5	
Mus RFLP R	2.5	37.5	
Taq	0.15	2.3	
DNA	2	-	2

Programa Mus RFLP K		
	T° (°C)	tiempo (min)
1	95	5
2	95	30'
3	63	30'
4	72	30'
5	Ir al paso 2 35veces	
6	72	5
7	10	oo
8	End	

Comprobar amplificación en gel agarosa

1,8% + ladder 100 o 50 pb. 5 µL mta mínimo + 2µl tampón de carga. 80 volt x 60 min

Fragmento: 237 para los 4 géneros

Digestión

En tubo eppendorf de 0,6 ml mezclar H₂O PCR tampón NE 10x y BSA 10x.

En otro tubo de 0,6 ml se colocan 4.7 µl de la mezcla anterior más 15 µl de producto de PCR.

Agregar 0,34 µl de la enzima BsaHI a cada tubo.

Agitar suavemente para mezclar bien (con pipeta, no con vortex).

Digestión Con Bsa HI			
	1	15	1
H₂O PCR	1.6	24	
Buffer NE4 10X	2	30	
BSA 10X	2	30	
Enzima Bsa HI	0.4	6	
DNA	14	-	14

La incubación se realiza a 37°C con agitación durante toda la noche.

Visualizar digestión en gel agarosa 1,8% + ladder 100 o 50 pb 5 uL mta mínimo + 2 tampón de carga. Correr electroforesis a 80 volt x 60 min.

Después de digestión con enzima BsaHI: Diferenciación del género.

	Fragmento pb	Enz Bsa HI
<i>Mytilus</i> spp	237	169 y 68
<i>Choromitylus</i> spp	237	237
<i>Aulacomya ater</i>	237	237

Enz BsaHI tiene sitio de corte solo en *Mytilus* => fragmentos: 169 y 68 pb

7.3. ANEXO 3: Me 15-16 *AciI*

Materiales

1. H₂O PCR
2. Enzima *Aci I* con su tampón NE4 10X
3. Enzima TAQ con su tampón y Mg⁺² (RBC)
4. Partidores Mus RFLP F y R
5. dNTP's
6. Tubos Eppendorff 1,6 y 0,6 ml DNAsa, RNAasa free (o autoclavados)
7. Puntas de micropipetas DNAsa, RNAasa free (o autoclavadas)
8. Baño de agua/incubador a 55 y 37°C
9. Set micropipetas
10. Gradillas para tubos PCR
11. Guantes
12. Toalla Nova
13. Termociclador
14. Puntas de pipetas autoclavadas
15. Lápiz marcador

Método

Amplificación

Previamente se realizó un gradiente de temperatura de annealing y se determinó 66°C (SANTA CLARA *et al.* 2006) recomendaba 63°C.

Partidores Me 15-16 amplifican un fragmento del gen que codifica para la proteína adhesiva polifenólica.

La amplificación se realiza en un volumen final de 25 µl de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación:

PCR-RFLP Me 15 16				Programa Me 15 16		
	1	9	Volúmen		T° (°C)	tiempo (min)
H ₂ O PCR	17.975	161.8		1	95	5
Buffer KCl	2.5	22.5		2	95	30'
Mg ²⁺	0.25	2.3		3	56	30'
dNTP's	0.125	1.1		4	72	30'
Me 15	1	9.0		5	Ir al paso 2 35 veces	
Me 16	1	9.0		6	72	5
Taq	0.15	1.4	23	7	10	oo
DNA	2	-	2	8	End	

Comprobar amplificación en gel agarosa 1,8% + ladder 100 o 50 pb. 5 µL mta mínimo + 2µl tampón de carga. Correr la electroforesis a 80 volt por 60 min
Fragmento: 126 a 180 pb para las 4 especies

Digestión

En tubo eppendorf de 0,6 ml mezclar H₂O PCR y tampón NE 10x.

En otro tubo de 0,6 ml se colocan 5,6 µl de la mezcla anterior más 14 ul de producto de PCR.

Agregar 0,4 µl de la enzima *Aci I* a cada tubo.

Agitar suavemente para mezclar bien (con pipeta, NO CON VORTEX).

Digestión con <i>Aci I</i>			
	1	15	1
H ₂ O PCR	3.6	54	
Buffer NE4 10X	2	30	
Enzima <i>Aci I</i>	0.4	6	
DNA	14		14

La incubación se realiza a 37°C con agitación durante toda la noche.

Visualizar digestión en gel agarosa 1,8% + ladder 100 o 50 pb 5 uL mta mínimo + 2
tampón de carga Correr a 80 volt x 60 min

	Fragmento pb	Enz Aci I
<i>M chilensis</i>	126	126
<i>M galloprovincialis</i>	126	69 y 57
<i>M edulis</i>	180	
<i>M trossulus</i>	168	

Enz Aci I tiene sitio de corte solo en *Mytilus galloprovincialis*

=> Fragmentos: 69 y 57 pb

7.4. ANEXO 4: mac -1

Materiales

1. H₂O PCR
2. Enzima TAQ con su tampón y Mg⁺² (RBC)
3. dNTP's
4. Tubos Eppendorff 1,6 y 0,6 ml DNAsa, RNAasa free (o autoclavados)
5. Puntas de micropipetas DNAsa, RNAasa free (o autoclavadas)
6. Set micropipetas
7. Gradillas para tubos PCR
8. Guantes
9. Toalla Nova
10. Termociclador
11. Puntas de pipetas autoclavadas
12. Lápiz marcador

Método

Amplificación

Partidores mac -1 amplifican un fragmento del intrón 1 del gen de la actina.

La amplificación se realiza en un volumen final de 25 µl de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación:

Programa mac - 1		
	T° (°C)	tiempo (min)
1	94	3
2	94	1.5
3	46	30"
4	72	30"
5	Ir al paso 2 30 veces	
6	72	5
7	4	15
8	End	

PCR-RFLP mac -1				
	1	9	Volúmen	
H₂O PCR	20.6	185.0		
Buffer KCl	1.5	13.5		
Mg⁺²	0.00	0.0		
dNTP's	0.15	1.4		
Me 15	0.35	3.2		
Me 16	0.35	3.2		
Taq	0.1	0.9		23
DNA	2	-		2

Comprobar amplificación en gel agarosa 1,8% + ladder 100 o 50 pb. 5 µL mta mínimo + 2µl tampón de carga. 80 volt x 60 min

Gel de Poliacrilamida 6% en una electroforesis vertical a 250 volts durante 2 horas.

7.5. ANEXO 5: COI *Xba*I

Materiales

1. H₂O PCR
2. Enzima *Xba*I con su tampón NE4 10X
3. Enzima TAQ con su tampón y Mg⁺² (RBC)
4. dNTP's
5. Tubos Eppendorff 1,6 y 0,6 ml DNAsa, RNAasa free (o autoclavados)
6. Puntas de micropipetas DNAsa, RNAasa free (o autoclavadas)
7. Baño de agua/incubador a 55 y 37°C
8. Set micropipetas
9. Gradillas para tubos PCR
10. Guantes
11. Toalla Nova
12. Termociclador
13. Puntas de pipetas autoclavadas
14. Lápiz marcador.

Método

Amplificación

Partidores del gen de la enzima *citocromo oxidasa I* (COI) COIXba F y COIXba R.

La amplificación se realiza en un volumen final de 25 µl de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación:

PCR-RFLP COI			
	1	9	Volúmen
H ₂ O PCR	17.2	154.8	23
Buffer KCl	2.5	22.5	
Mg ⁺²	0.00	0.0	
dNTP's	0.50	4.5	
Me 15	1.5	13.5	
Me 16	1.5	13.5	

Programa COI		
	T° (°C)	tiempo (min)
1	95	5
2	94	30"
3	52	30"
4	72	1
5	Ir al paso 2 35 veces	
6	72	5

Taq	0.3	2.7		7	10	15
DNA	2	2	2	8	End	

Comprobar amplificación en gel agarosa 1,8% + ladder 100 o 50 pb. 5 µL mta mínimo + 2µl tampón de carga. Correr electroforesis a 80 volt por 60 min

Fragmento: 233 pb para las 4 especies

Digestión

En tubo eppendorf de 0,6 ml mezclar H₂O PCR y tampón NE4 10x.

En otro tubo de 0,6 ml se colocan 5 µl de la mezcla anterior más 15 ul de producto de PCR.

Agregar 1 µl de la enzima *Xba*I a cada tubo.

Agitar suavemente para mezclar bien (con pipeta, NO CON VORTEX).

Digestión con Xba I			
	1	9	1
H₂O PCR	12	108	15
Buffer NE4 10X	2	18	
Enzima Xba I	1	9	
DNA	5		5

La incubación se realiza a 37°C con agitación durante toda la noche.

Visualizar digestión en gel agarosa 1,8% + ladder 100 o 50 pb 5 uL mta mínimo + 2 tampón de carga. Correr electroforesis a 80 volt por 60 min.

	Fragmento pb	Enz Xba I
<i>M chilensis</i>	233	134 y 99
<i>M galloprovincialis</i>	233	233
<i>M edulis</i>		

| *M trossulus* | | |

Enzima *Xba*I tiene sitio de corte solo en *Mytilus chilensis*. Fragmentos: 134 y 99 pb.

7.6. ANEXO 6: *mtDNA* 16 *rRNA*

Materiales

1. H₂O PCR
2. Enzimas *EcoRV*, *NheI* y *SpeI* con su Buffer Tango y Buffer R
3. Enzima TAQ con su tampón y Mg⁺² (RBC)
4. dNTP's
5. Tubos Eppendorff 1,6 y 0,6 ml DNAsa, RNAasa free (o autoclavados)
6. Puntas de micropipetas DNAsa, RNAasa free (o autoclavadas)

7. Baño de agua/incubador a 55 y 37°C
8. Set micropipetas
9. Gradillas para tubos PCR
10. Guantes
11. Toalla Nova
12. Termociclador
13. Puntas de pipetas autoclavadas
14. Lápiz marcador

Método

Amplificación

Partidores 16s AR y 16s BR. La amplificación se realiza en un volumen final de 25 µl de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción y programa de amplificación:

Comprobar amplificación en gel agarosa 1,8% + ladder 100 o 50 pb. 5 µL mta mínimo + 2µl tampón de carga. Correr electroforesis a 80 volt por 60 min

Fragmento: 527 pb para las 4 especies

PCR RFLP 16s rRNA			
	1	9	Volúmen
H₂O PCR	17.9	161.1	
Buffer KCl	2.5	22.5	
Mg⁺²	0.00	0.0	
dNTP's	0.25	2.3	
16s AR	1	9.0	
16s AR	1	9.0	
Taq RBC	0.4	3.6	
DNA	2	-	2

Programa 16s		
	T° (°C)	Tiempo (min)
1	95	5
2	95	1
3	52	45"
4	72	30"
5	30 ciclos	
6	72	4
7	4	15
8	End	

Digestión

En tubo eppendorf de 0,6 ml mezclar H₂O PCR y tampón NEB #2 10x y BSA 100 mg.

En otro tubo de 0,6 ml se colocan 10 µl de la mezcla anterior más 10 µl de producto de PCR.

Agregar 0,5 µl de las enzimas *EcoRV*, 0.5 µl de *Nhe I* y 0.5 µl de *Spe I* a cada tubo.

Agitar suavemente para mezclar bien (con pipeta, NO CON VORTEX).

Digestión con <i>EcoRV</i> , <i>Nhe I</i> , <i>Spe I</i>				
	Paper	1	5	1
H ₂ O PCR		6.1	30.5	
Buffer NEB #2 10X	1	2	10	
<i>EcoRV</i>	10 U	0.5	2.5	
<i>Nhe I</i>	5 U	0.5	2.5	
<i>Spe I</i>	5 U	0.5	2.5	
BSA	100 mg	0.4	2	10
DNA		10		10

La incubación se realiza a 37°C con agitación durante toda la noche.

Visualizar digestión en gel agarosa 1,8% + ladder 100 o 50 pb 5 uL mta mínimo + 2 tampón de carga Correr a electroforesis a 80 volt por 60 min.

Especie	Fragmento pb	Triple Digestión
<i>M chilensis</i>	527	

<i>M. galloprovincialis HS</i>	527	342, 167 y 28
<i>M galloprovincialis HN</i>	527	342 y 195
<i>M edulis</i>	527	342, 85, 82 y 28
<i>M trossulus</i>	527	370, 85 y 82

7.7. ANEXO 7: Extracción de DNA en muestras de productos procesados

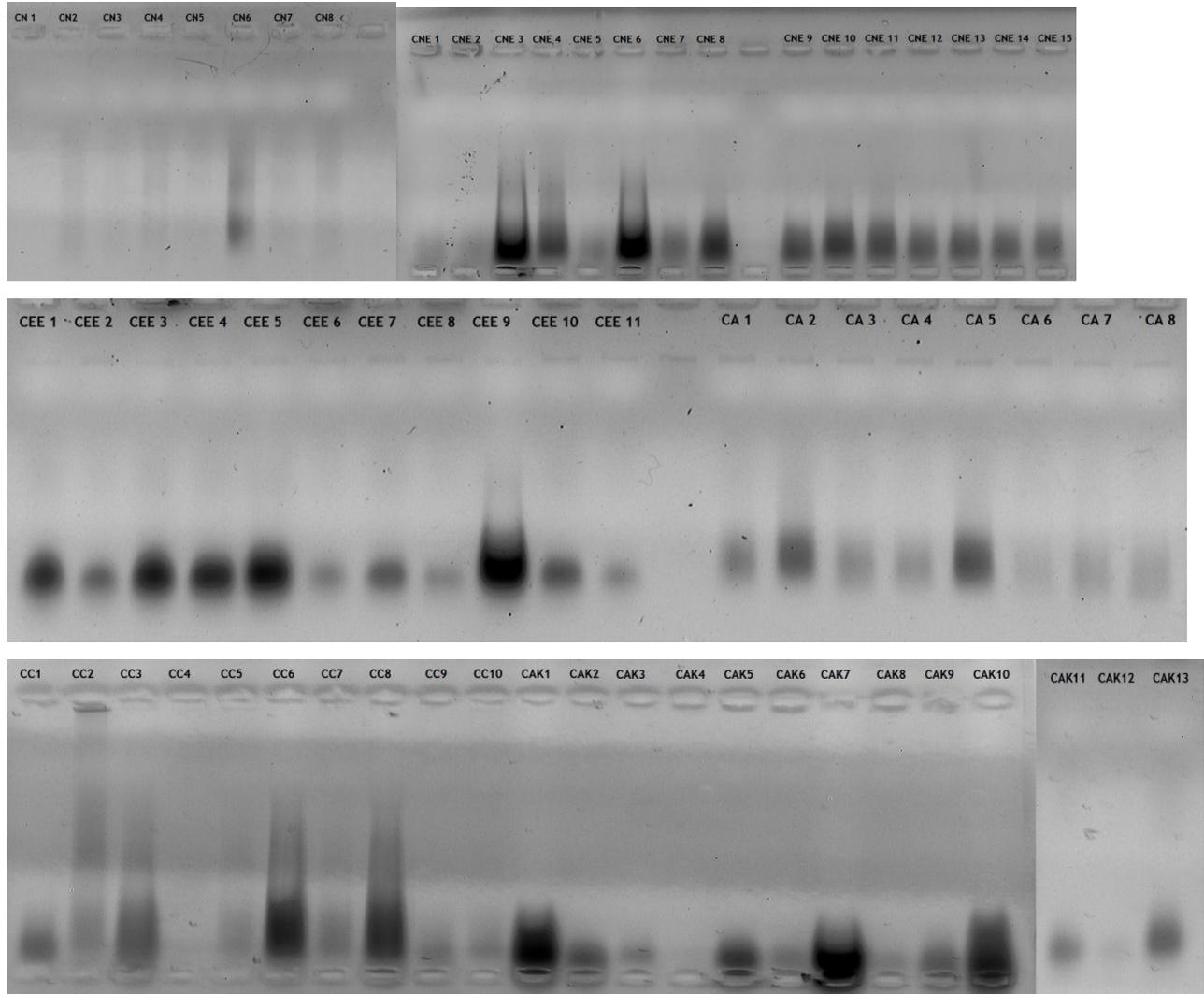


Figura 1. Gel para evidenciar integridad de DNA extraído en Gel de agarosa al 0.7%.

CN: Chorito al natural de Chile; **CNE:** Mejillón natural proveniente de España; **CEE:** Mejillón al escabeche proveniente de España; **CA:** Chorito ahumado en aceite de Chile; **CC:** Chorito congelado de Chile; **CAK:** Chorito ahumado en aceite de Corea.

7.8. ANEXO 8: Genotipos de individuos de los grupos de estudios.

Ind	Marcador																
	Alelos		Digestión Enzimática (Acl I)		Alelos		Digestión Enzimática (Nhe I, Spe I, Eco RV)				Alelos		Alelos		Digestión Enzimática (Xba I)		
	Me 15 - 16				16s rRNA						mac -1		COI				
A01	126	126	126		527	527	342	195	167	28	269	269	233	233	134	99	
A02	126	126	126		527	527		195	167	28	267	267	233	233	134	99	
A03	126	126	126		527	527		195	167	28	271	271	233	233	134	99	
A04	126	126	126		527	527		195	167	28	271	271	233	233	134	99	
A05	126	126	126		527	527	342	195	167	28	267	267	233	233	134	99	
A06	126	126	126		527	527	342	195	167	28	266	266	233	233	134	99	
A07	126	126	126		527	527	342		167	28	0	0	233	233	134	99	
A08	126	126	126		527	527	342	195	167	28	271	271	233	233	134	99	
A09	126	126	126		527	527	342		167	28	269	269	233	233	134	99	
A10	126	126	126		527	527	342		167	28	269	269	233	233	134	99	
A11	126	126	126		527	527	342		167	28	269	269	233	233	134	99	
A12	126	126	126		527	527	342		167	28	0	0	233	233	134	99	
A13	126	126	126		527	527	342		167	28	0	0	233	233	134	99	
A14	126	126	126		527	527	342		167	28	267	271	233	233	134	99	
A15	126	126	126		527	527	342		167	28	269	269	233	233	134	99	
A16	126	126	126		527	527	342		167	28	267	267	233	233	134	99	
A17	126	126	126		527	527	342		167	28	269	269	233	233	134	99	
A18	126	126	126		527	527	342		167	28	0	0	233	233	134	99	
A19	126	126	126		527	527	342		167	28	266	266	233	233	134	99	
A20	126	126	126		527	527	342		167	28	266	266	233	233	134	99	
A21	126	126	126		527	527	342		167	28	273	273	233	233	134	99	
A22	126	126	126		527	527	342		167	28	273	273	233	233	134	99	
A23	126	126	126		527	527	342		167	28	271	271	233	233	134	99	
A24	126	126	126		527	527	342		167	28	269	269	233	233	134	99	
A25	126	126	126		527	527	342		167	28	271	271	233	233	134	99	
A26	126	126	126		527	527	342		167	28	271	271	233	233	134	99	
A27	126	126	126		527	527	342		167	28	273	273	233	233	134	99	
A28	126	126	126		527	527	342		167	28	273	273	233	233	134	99	
A29	126	126	126		527	527	342		167	28	273	273	233	233	134	99	
A30	126	126	126		527	527	342		167	28	273	273	233	233	134	99	
A31	126	126	126		527	527	342		167	28	273	273	233	233	134	99	
A32	126	126	126		527	527	342		167	28	271	271	233	233	134	99	
A33	126	126	126		527	527	342		167	28	269	269	233	233	134	99	
A34	126	126	126		527	527	342		167	28	267	267	233	233	134	99	
A35	126	126	126		527	527	342		167	28	271	271	233	233	134	99	
A36	126	126	126		527	527	342		167	28	0	0	233	233	134	99	
A37	126	126	126		527	527	342		167	28	271	271	233	233	134	99	
A38	126	126	126		527	527	342		167	28	271	271	233	233	134	99	
A39	126	126	126		527	527	342		167	28	269	269	233	233	134	99	
A40	126	126	126		527	527	342		167	28	271	271	233	233	134	99	
A41	126	126	126		527	527	342		167	28	269	269	233	233	134	99	
A42	126	126	126		527	527	342		167	28	267	267	233	233	134	99	
A43	126	126	126		527	527	342		167	28	271	271	233	233	134	99	
A44	126	126	126		527	527	342		167	28	266	266	233	233	134	99	
A45	126	126	126		527	527	342		167	28	267	267	233	233	134	99	
A46	126	126	126		527	527	342		167	28	271	271	233	233	134	99	
A47	126	126	126		527	527	342		167	28	269	269	233	233	134	99	
A48	126	126	126		527	527	342		167	28	269	269	233	233	134	99	
A49	126	126	126		527	527	342		167	28	267	267	233	233	134	99	
A50	126	126	126		527	527	342		167	28	271	271	233	233	134	99	

Ind	Marcador																	
	Alelos		Digestión Enzimática (Acl I)		Alelos		Digestión Enzimática (Nhe I, Spe I, Eco RV)				Alelos		Alelos		Digestion Enzimática (Xba I)			
	Me 15 - 16				16s rRNA						mac -1		COI					
B01	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	353	353	233	233	233	233		
B02	126	126	69	57	527	527	342	195		28	298	298	233	233	233	233		
B03	126	126	69	57	527	527	342	195		28	298	298	233	233	233	233		
B04	126	126	69	57	527	527	342	195		28	298	298	233	233	233	233		
B05	126	126	69	57	527	527	342	195		28	353	298	233	233	233	233		
B06	126	126	69	57	527	527	342	113			300	353	233	233	233	233		
B07	126	126	69	57	527	527	342	195		28	267	269	233	233	233	233		
B08	126	126	69	57	527	527	342	195		28	298	298	233	233	233	233		
B09	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	320	320	233	233	233	233		
B10	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	353	233	233	233	233		
B11	126	126	69	57	527	527	342	113	82		300	300	233	233	233	233		
B12	126	126	69	57	527	527	342	167		28	300	300	233	233	134	99		
B13	126	126	69	57	527	527	342	195		28	300	300	233	233	233	233		
B14	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	300	233	233	233	233		
B15	126	126	69	57	527	527	342	195		28	300	300	233	233	233	233		
B16	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	300	233	233	233	233		
B17	126	126	69	57	527	527	342	195		28	300	353	233	233	233	233		
B18	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	353	300	233	233	233	233		
B19	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	353	320	233	233	233	233		
B20	126	126	69	57	527	527	342	195		28	320	300	233	233	233	233		
B21	126	126	69	57	527	527	342	195		28	353	300	233	233	233	233		
B22	126	126	69	57	527	527	342	195		28	353	320	233	233	233	233		
B23	126	126	69	57	527	527	342	167	82	28	353	300	233	233	233	233		
B24	126	126	69	57	527	527	342	195		28	300	300	233	233	233	233		
B25	126	126	69	57	527	527	342	167	82	28	300	353	233	233	233	233		
B26	126	126	69	57	527	527	342	195		28	300	300	233	233	233	233		
B27	126	126	69	57	527	527	342	195		28	300	300	233	233	233	233		
B28	126	126	69	57	527	527	342	195		28	353	300	233	233	233	233		
B29	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	298	298	233	233	233	233		
B30	126	126	69	57	527	527	342	195		28	320	300	233	233	233	233		
B31	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	353	267	233	233	233	233		
B32	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	298	271	233	233	233	233		
B33	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	300	233	233	233	233		
B34	126	126	69	57	527	527	342	195		28	298	298	233	233	233	233		
B35	126	126	69	57	527	527	342	195		28	353	353	233	233	233	233		
B36	126	126	69	57	527	527	342	195		28	353	298	233	233	233	233		
B37	126	126	69	57	527	527	342	195		28	353	300	233	233	233	233		
B38	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	300	233	233	233	233		
B39	126	126	69	57	527	527	342	195		28	353	298	233	233	233	233		
B40	126	126	69	57	527	527	342	125-100		82	298	298	233	233	233	233		
B41	126	126	69	57	527	527	342	195		28	298	320	233	233	233	233		
B42	126	126	69	57	527	527	342	167		28	298	298	233	233	134	99		
B43	126	126	69	57	527	527	342	195		28	353	269	233	233	233	233		
B44	126	126	69	57	527	527	342	195		28	353	271	233	233	233	233		
B45	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	353	298	233	233	233	233		
B46	126	126	69	57	527	527	342	195		28	298	300	233	233	233	233		
B47	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	298	298	233	233	233	233		
B48	126	126	69	57	527	527	342	195		28	298	298	233	233	233	233		
B49	126	126	69	57	527	527	342	195		28	298	298	233	233	233	233		
B50	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	269	233	233	233	233		

Ind	Marcador																
	Alelos		Digestión Enzimática (Aci I)		Alelos		Digestión Enzimática (Nhe I, Spe I, Eco RV)				Alelos		Alelos		Digestion Enzimatica (Xba I)		
	Me 15 - 16				16s rRNA						mac -1		COI				
C01	126	126	69	57	527	527	342	113	85	82	269	271	233	233	233	233	
C02	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	0	0	233	233	233	233	
C03	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	271	273	233	233	233	233	
C04	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
C05	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	298	300	233	233	233	233	
C06	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	298	233	233	233	233	
C07	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	271	271	233	233	233	233	
C08	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	320	300	233	233	233	233	
C09	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	271	273	233	233	233	233	
C10	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	271	273	233	233	233	233	
C11	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	267	271	233	233	233	233	
C12	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	353	233	233	233	233	
C13	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	273	273	233	233	233	233	
C14	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	298	273	233	233	233	233	
C15	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	273	273	233	233	233	233	
C16	126	126	69	57	527	527	342	195			320	269	233	233	233	233	
C17	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	271	271	233	233	233	233	
C18	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	298	300	233	233	233	233	
C19	126	126	69	57	527	527	342	195			271	271	233	233	233	233	
C20 (CE1)	126	180	69	57	527	527	342	85	82	28	300	300	233	233	233	233	
C21	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	320	298	233	233	233	233	
C22	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	320	298	233	233	233	233	
C23	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	320	298	233	233	233	233	
C24	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	269	267	233	233	233	233	
C25	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	300	233	233	233	233	
C26	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
C27	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
C28	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	353	320	233	233	233	233	
C29	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	271	271	233	233	233	233	
C30	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	266	233	233	233	233	
C31	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	320	320	233	233	233	233	
C32	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	320	320	233	233	233	233	
C33	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	298	233	233	233	233	
C34	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	271	271	233	233	233	233	
C35	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	300	233	233	233	233	
C36	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	320	271	233	233	233	233	
C37	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	269	233	233	233	233	
C38	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	266	233	233	233	233	
C39	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	320	300	233	233	233	233	
C40	126	126	69	57	527	527	342	195		28	320	298	233	233	233	233	
C41	126	126	69	57	527	527	342	195		28	273	273	233	233	233	233	
C42	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	320	298	233	233	233	233	
C43	126	126	69	57	527	527	342	85	82		273	273	233	233	233	233	
C44	126	126	69	57	527	527	342	85	82		273	273	233	233	233	233	
C45	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	273	273	233	233	233	233	
C46	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	271	271	233	233	233	233	
C47	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	300	273	233	233	233	233	
C48	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	320	271	233	233	233	233	
C49	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	273	273	233	233	233	233	
C50	126	126	69	57	527	527	342	85	82	28	271	271	233	233	233	233	

Ind	Marcador															
	Alelos		Digestión Enzimática (Aci I)			Alelos		Digestión Enzimática (Nhe I, Spe I, Eco RV)			Alelos		Alelos		Digestion Enzimatica (Xba I)	
	Me 15 - 16					16s rRNA					mac -1		COI			
E01	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E02	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E03	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E04	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E05	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E06	126	126	126			527	527	342	167	28	271	271	233	233	134	99
E07	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E08	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E09	126	126	126			527	527	342	167	28	271	271	233	233	134	99
E10	126	126	126			527	527	342	167	28	271	271	233	233	134	99
E11	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E12	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E13 (CG 1)	126	126	126	69	57	527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E14	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E15	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E16	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E17	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E18	126	126	126			527	527	342	167	28	271	271	233	233	134	99
E19	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E20	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E21	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E22	126	126	126			527	527	342	167	28	267	300	233	233	134	99
E23	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E24	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E25	126	126	126			527	527	342	167	28	266	266	233	233	134	99
E26	126	126	126			527	527	342	167	28	266	266	233	233	134	99
E27	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E28	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E29	126	126	126			527	527	342	167	28	267	269	233	233	134	99
E30	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E31	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E32	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E33	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E34	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E35	126	126	126			527	527	342	167	28	266	266	233	233	134	99
E36	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E37	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E38	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E39	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E40	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E41	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E42	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E43	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E44	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E45	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E46	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E47	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E48	126	126	126			527	527	342	167	28	269	269	233	233	134	99
E49	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99
E50	126	126	126			527	527	342	167	28	267	267	233	233	134	99

Ind	Marcador																
	Alelos		Digestión Enzimática (Aci I)		Alelos		Digestión Enzimática (Nhe I, Spe I, Eco RV)				Alelos		Alelos		Digestion Enzimatica (Xba I)		
	Me 15 - 16				16s rRNA						mac -1		COI				
R01	180	180	180		527	527	342	85	82	28	267	267	233	233	233	233	
R02	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	271	233	233	233	233	
R03	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
R04	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
R05	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
R06	180	180	180		527	527	342	85	82	28	271	269	233	233	233	233	
R07	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
R08	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
R09	180	180	180		527	527	342	85	82	28	273	273	233	233	233	233	
R10	180	180	180		527	527	342	85	82	28	271	273	233	233	233	233	
R11	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
R12	180	180	180		527	527	342	85	82	28	271	271	233	233	233	233	
R13	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
R14	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	271	233	233	233	233	
R15	180	180	180		527	527	342	85	82	28	273	273	233	233	233	233	
R16	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	267	233	233	233	233	
R17	180	180	180		527	527	342	85	82	28	273	271	233	233	233	233	
R18	180	180	180		527	527	342	85	82	28	271	273	233	233	233	233	
R19	180	180	180		527	527	342	85	82	28	271	269	233	233	233	233	
R20	180	180	180		527	527	342	85	82	28	271	273	233	233	233	233	
R21	180	180	180		527	527	342	85	82	28	271	269	233	233	233	233	
R22	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
R23	180	180	180		527	527	342	85	82	28	271	269	233	233	233	233	
R24	180	180	180		527	527	342	85	82	28	271	271	233	233	233	233	
R25	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	298	233	233	233	233	
R26	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	267	233	233	233	233	
R27	180	180	180		527	527	342	85	82	28	267	267	233	233	233	233	
R28	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
R29	180	180	180		527	527	342	85	82	28	267	269	233	233	233	233	
R30	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
R31	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	271	233	233	233	233	
R32	180	180	180		527	527	342	85	82	28	271	271	233	233	233	233	
R33	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	271	233	233	233	233	
R34	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	271	233	233	233	233	
R35	180	180	180		527	527	342	85	82	28	267	267	233	233	233	233	
R36	180	180	180		527	527	342	85	82	28	271	271	233	233	233	233	
R37	180	180	180		527	527	342	85	82	28	269	269	233	233	233	233	
R38	180	180	180		527	527	342	167		28	266	266	233	233	233	233	
R39	180	180	180		527	527	342	85	82	28	266	266	233	233	233	233	
R40	180	180	180		527	527	342	85	82	28	267	267	233	233	233	233	
R41	180	180	180		527	527	342	85	82			28	269	269	233	233	233
R42	180	180	180		527	527	342	85	82			28	267	267	233	233	233
R43	180	180	180		527	527	342	85	82			28	267	267	233	233	233
R44	180	180	180		527	527	342	85	82			28	269	266	233	233	233
R45	180	180	180		527	527	342	85	82			28	267	269	233	233	233
R46	180	180	180		527	527	342	85	82			28	267	269	233	233	233
R47	180	180	180		527	527	342	85	82			28	267	269	233	233	233
R48	180	180	180		527	527	342	85	82			28	267	269	233	233	233
R49	180	180	180		527	527	342	85	82			28	267	269	233	233	233
R50	180	180	180		527	527	342	85	82			28	267	269	233	233	233

Ind	Marcador																			
	Alelos		Digestión Enzimática (Aci I)			Alelos		Digestión Enzimática (Nhe I, Spe I, Eco RV)						Alelos		Alelos		Digestion Enzimatica (Xba I)		
	Me 15 - 16					16s rRNA								mac -1		COI				
CT1	126	168	126			527	527	370	342	167	85	82	28	267	267	233	233	134	99	
CT2	126	168	126			527	527	370	342	167	85	82	28	269	269	233	233	134	99	
CT3	126	168	126			527	527	342		167			28	269	269	233	233	134	99	
CT4	126	168	126			527	527	342		167			28	271	271	233	233	134	99	
CT5	168	126	168			527	527	342		167			28	271	271	233	233	134	99	
CT6	168	126	168			527	527	342		167			28	273	273	233	233	134	99	
CT7	126	168	126			527	527	342		85		82	28	269	269	233	233	134	99	233
CT8	168	126	168			527	527	342		167			28	267	267	233	233	134	99	
CG1 (E13)	126	126	126	69	57	527	527	342		167			28	269	269	233	233	134	99	
CE1 (C20)	126	180		69	57	527	527	342		85		82	28	300	300	233	233	233	233	