

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“Validación de marcadores moleculares
para el análisis genético de *Mytilus
chilensis*”

Memoria presentada a la Universidad de Chile para optar al Título
Profesional de Bioquímico

Coral de los Ángeles Jara Rodríguez

Director(es) de tesis: Dra. María Angélica Larraín B.

Laboratorio de Calidad de Alimentos, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Dr. Cristián Araneda T.

Laboratorio de Genética y Biotecnología en Acuicultura. Departamento de Producción Animal, Universidad de Chile.

Profesor patrocinante: Dra. Daniela Seelenfreund H.

Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

Santiago, Chile 2016

"La vida no es lo que uno vivió,
sino lo que recuerda,
y cómo la recuerda para contarla"

Gabriel García Márquez

Agradecimientos

Inicialmente agradezco al laboratorio que me recibió amablemente para realizar esta memoria, el laboratorio de Calidad de Alimentos del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química y al Departamento de Producción Animal de la Facultad de Ciencias Agronómicas, ambos de la Universidad de Chile.

Agradezco a la doctora María Angélica así como al doctor Cristian que me recibieron y ayudaron en este trabajo. Gracias especiales a Ximena, Jorge y Felipe por ser excelentes compañeros de laboratorio y siempre ayudarme, estar ahí y compartir experiencias conmigo. Gracias a la Dra. Daniela Seelenfreund, por ser mi patrocinante y ayudarme con su guía en este trabajo.

A continuación quiero agradecer a las hermosas personas que conocí durante la carrera. A Gabriela, Arantza, Mauricio, Perso y Maquita, quienes alegraban el día a día en la universidad, con ustedes compartí una inmensidad de momentos por lo que les tengo un infinito aprecio. Por todas las risas, los chistes fomes (si Perso, a ti te hablo), las largas conversaciones, los juegos de cartas, la noches de fiesta y las noches de estudio, así como las quejas compartidas por la falta de sueño, les doy infinitas gracias por compartir conmigo esto y mucho más, los quiero mucho a todos.

Gracias también a Pascal, Alonso, Apus y Sebastián, con quienes compartí mucho en los momentos de movilización de la facultad, gracias por todas esas marchas juntos, por salir con frío, calor, lluvia o incluso resfriados a luchar por lo que es justo para nosotros. Gracias por los momentos, conversaciones, gritos y risas compartidas, también les tengo un aprecio muy grande. Quisiera hacer una nota especial a Alonso y Pascal por las noches jugando play station y compitiendo en Crash team Racing.

Uno de los acontecimientos que más agradezco de mi vida universitaria es haber conocido a Emilio, una de las personas más importantes en mi vida. Hace 6 años que estamos juntos y desde que llegaste a mis días todo se volvió más interesante. Me alegras, me aconsejas, me ayudas y por sobre todo me haces feliz. Gracias infinitas para ti también, gracias por tus datos inútiles, tu humor negro y tus extrañas anécdotas, amo cada momento que paso contigo y no puedo expresarte el gran apoyo que has sido para mí, tanto en el ámbito personal como el académico, dándome animo cuando sentía que no podía más, muchas gracias Emilio.

Finalmente, quiero dar las gracias más importantes a ellos que son mis bases y cimientos, a mi familia. Gracias a mi madre y mi padre por entregarme siempre su amor, su consejo, su ayuda y guía, por siempre estar ahí para mí, por su apoyo y sus regalones aunque no entendieran por qué llegaba enojado alegando que el PCR no había amplificado. A mis hermanos, Mario y Fabián por siempre alegrarme y apoyarme en todo, gracias por todos los momentos, las alegrías, las pocas peleas, los eventos de la lucha libre y todas las “paralizadoras” y “garras contra lona” compartidas, los quiero mucho a ambos. Gracias a mi Tía Otta y mi abuelita que desde Talca son otro de mis pilares, siempre ahí para ayudarme, siempre atentas y siempre entregándome su cariño. Gracias a la Cuchita, mi gata quien siempre me acompañó en las noches de estudio acostándose en mis cuadernos y quitándome los lápices, siempre tan alegre y cariñosa que era imposible enojarme con ella y me ayuda a relajarme cuando menos lo espero.

Gracias totales e infinitas a mi familia, sobre todo a mis padres, este trabajo está dedicado a ustedes. Esto habría sido imposible sin su crianza y ayuda, gracias por enseñarme lo que es realmente importante en la vida, gracias por todos los momentos felices y por enseñarme que por muy difícil que sea un momento juntos lo podemos superar, no puedo expresar lo mucho que los quiero, lo mucho que significan para mí y cuanta gratitud les tengo. Gracias por la familia hermosa que tengo, este trabajo no es mío es de todos, los amo mucho.

FINANCIAMIENTO

Esta memoria fue financiada con el FONDECYT Regular 2013 (N° 1130302) titulado “Species composition, genetic diversity and population structure of *Mytilus* in southern Chile using species-specific, microsatellite and SNP DNA markers. Applications in traceability: species identification and geographic origin determination” a cargo de la doctora María Angélica Larraín Barth.



ÍNDICE

	Página
Índice.....	i
Índice de ilustraciones.....	iii
Índice de tablas.....	iv
Abreviaturas.....	v
Resumen	vi
Abstract.....	vii
CAPITULO I	
Introducción	1
1.1. Mejillones y miticultura	1
1.2. Control de calidad de alimentos y trazabilidad	3
1.3. Técnicas moleculares	5
1.3.1 PCR-RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>).....	6
1.3.2 HRM (<i>High Resolution Melting</i>).....	7
1.3.3 microsatélites (SSR).....	8
1.4 Calidad de marcadores.....	9
CAPITULO II	
Hipótesis y Objetivos	13
CAPITULO III	
Materiales y Métodos.....	14
3.1. Materiales	
3.1.1 Reactivos e insumos generales.....	14
3.1.2 Equipos.....	15
3.1.3 Programas.....	15
3.2 Metodología	
3.2.1 Muestras.....	16
3.2.2 Identificación de la especie de los individuos en cada familia.....	19
de mejillones (padres e hijos).	
3.2.2.1 Identificación de especies	19
3.2.3. Confirmación de las familias de <i>M. chilensis</i> con marcadores	21
informativos y estandarizados existentes.	
3.2.3.1 Análisis de las familias.....	21
3.2.3.2. Análisis estadístico	25
3.2.4. Evaluación de la segregación mendeliana de dos microsatélites..	26
desarrollados en el laboratorio	



INDICE DE ILUSTRACIONES

	Pagina
Figura 1.- Ciclo de vida de los mejillones.	3
Figura 2.- Esquema del proceso realizado para el cultivo de mejillones.	17
Figura 3.- Sitio de corte para la enzima Acil de New England Biolabs.	20
Figura 4.- Esquema de la incorporación de marca fluorescente a los fragmento de PCR	23
Figura 5.- Determinación de la especie para los individuos parentales de cada familia	28
Figura 6.- Patrón de curvas de “melting” de las distintas especies de mitílidos.	29
Figura 7.- Curvas de “ <i>melting</i> ” obtenidas a partir de ADN de los mejillones parentales.	31
Figura 8.- Análisis de la especie de individuos no concluyentes por HRM mediante PCR-RFLP.	34
Figura 9.- Perfil electroforético de alelos para los marcadores MT203 y MGE005 mediante PCR convencional.	39
Figura 10.- Perfil electroforético de ADN de muestras parentales para los SSR desarrollados en el laboratorio mediante PCR convencional.	47



INDICE DE TABLAS

	Pagina
Tabla 1.- Resumen de la recolección de individuos	18
Tabla 2.- Caracterización de los 4 marcadores utilizados	24
Tabla 3.- Resumen de las especies obtenidas mediante HRM para los descendientes de cada cruzamiento.	33
Tabla 4.- Resumen con el total de individuos de cada especie por familia identificados mediante HRM y PCR-RFLP.	35
Tabla 5.- Comparación de las proporciones esperadas y los resultados obtenidos.	37
Tabla 6.- Resumen de los valores de parentesco entregados para cada individuo por el análisis de paternidad .	41
Tabla 7.- Matriz de parentesco R_{xy} entre los individuos con valores positivos de paternidad.	45
Tabla 8.- Genotipo de los SSR desarrollados por el laboratorio.	49



ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Cm: Centímetros

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

dNTP: Desoxirribonucleótidos.

HRM: *High Resolution Melting*

L: Litros

mM: Milimolar

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

ng: nano gramos

PAP: Proteína Adhesiva Polifenólica

Pb: Pares de bases

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SNP: *Single-Nucleotide Polymorphism*

SSR: *Simple Sequence Repeats*

U: Unidades

μL: microlitros.



Resumen

Los mejillones son una familia de moluscos de gran interés económico y gastronómico en Chile y como producto alimentario deben ser inocuos “garantizando de que no causarán daño al consumidor”. Se requiere un sistema de trazabilidad para determinar en qué etapa de la cadena de suministro habría un potencial problema. Para productos marinos, la trazabilidad opera en tres niveles: identificación de la especie, determinación del origen geográfico y seguimiento a través de la cadena alimentaria. Estos niveles pueden resolverse mediante el uso de marcadores moleculares como son los microsatélites (Simple Sequence Repeats). El objetivo de esta memoria es comprobar que **los microsatélites *Mch-UCH18* y *Mch-UCH104* se heredan en forma mendeliana en familias genéticas de *Mytilus chilensis***, y así validar los microsatélites para su uso en estudios genéticos poblacionales y de paternidad de esta especie. Para determinar si el patrón de herencia es mendeliano se utilizaron 6 familias de mejillones, las cuales se caracterizaron inicialmente con tres marcadores que tenían segregación mendeliana descrita, dos SSR y un PCR-RFLP (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Se realizaron pruebas de exclusión de paternidad y se detectó así una falla en el cruzamiento, no pudiéndose validar los microsatélites generados en el laboratorio.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

Abstract

Validation of molecular markers for genetic analysis of *Mytilus chilensis*.

Mussels are mollusks of great economic and gastronomic interest in Chile, and as a food product they must be safe and "guarantee that they will not cause harm to the consumer". A traceability system is required to determine at what stage of the supply chain a potential problem occurs and in the case of seafood, traceability operates on three levels: species identification, determination of geographical origin and a follow-up of the product through the food chain. These levels can be addressed using molecular markers such as microsatellites (SSR). Therefore the aim of this work was to test the Mendelian inheritance of microsatellites Mch-UCH18 and Mch-UCH104 in *Mytilus chilensis* families, in order to validate these microsatellites to be used in population and paternity genetic studies of this species. Six families of mussels were initially tested with three markers with previously described Mendelian segregation (two SSR and one PCR-RFLP). Paternity exclusion tests detected a mistake in the crossings, hindering the validation of the microsatellites generated in the laboratory.



I. INTRODUCCIÓN

1.1 Mejillones y la miticultura

Los mejillones conocidos comúnmente en Chile como choritos, son una familia de moluscos bivalvos de gran interés económico y gastronómico, sobre todo en el territorio sur del país, donde su producción es una de las principales actividades económicas. El año 2013, se registraron más de 1.100 centros de producción de mitílidos (AmiChile, 2014). Los mejillones son miembros del género *Mytilus* que incluye las especies *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* (Inoue y Cols., 1995), esta última sin interés comercial. Estas tres especies se encuentran distribuidas en todo el mundo y forman zonas híbridas que se superponen (Wonham, 2004), y son abundantes en las zonas de intermareas bajas y medias en mares templados en todo el mundo, tanto en el hemisferio norte como en el sur (Millard, 1997). En Chile existe otra especie que corresponde a ***M. chilensis***, esta especie se encuentra en controversia ya que ha sido reconocida a nivel económico, pero taxonómicamente hablando no ha sido aceptada en su totalidad, aunque existen grupos como la WoRMS (*World Register of Marine Species*) que la reconocen taxonómicamente (Santaclara y Cols., 2006, Fernandez-Tajes y Cols., 2011).



En Chile esta especie es la principal, pero también existen individuos híbridos con las especies *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* (Larraín y Cols., 2012). Esta memoria está centrada en el estudio de las características que diferencian a *M. chilensis*, de las otras especies del género, como estudios del gen mitocondrial *citocromo oxidasa I (COI)* y del gen PAP (Santaclara y Cols., 2006; Fernández-Tajes y Cols., 2011; Seguel, 2011) y estudios mediante microsatélites (Ouagajjou y Cols., 2011).

El proceso productivo de los mejillones se inicia con la captación de semillas (Etapa VI), fase donde estos se encuentran fijados a un sustrato. Luego continua la etapa del engordado y crecimiento, donde los choritos alcanzan su talla comercial de al menos 5 cm, para posteriormente finalizar la cosecha y procesado.

El ciclo de vida de los mejillones se describe en la figura 1. Se inicia en una etapa planctónica, luego de la unión de gametos (Etapa I), que al dividirse y multiplicarse forman la larva inicial conocida como trocófora (Etapa II). Luego se genera la concha, etapa en que se denomina larva véliger (Etapa III) aca poseen una tamaño de 250-300 micrómetros. Al cabo de aproximadamente 30 días de alimentación y crecimiento, la larva se fija al sustrato (etapa IV) y ocurre la metamorfosis adquiriendo la apariencia de un chorito adulto en miniatura, llamado juvenil de cerca de 20mm. El individuo posteriormente se convertirá en



la “semilla” al alcanzar la talla de 1 a 2 cm (ver figura 1) (Clasing, 1998).

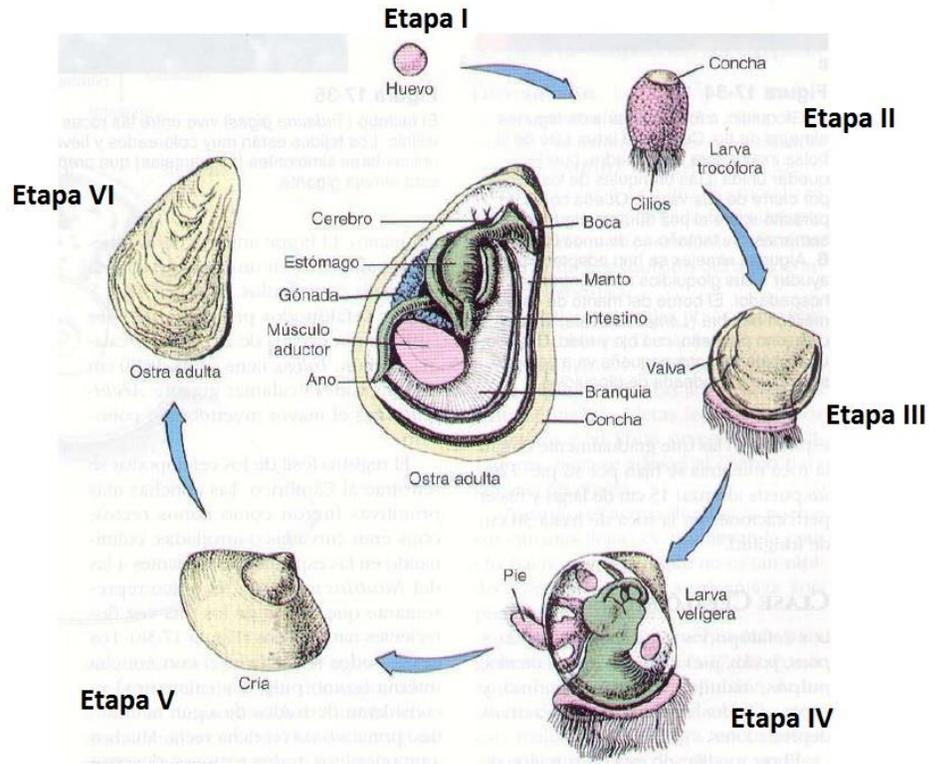


Figura 1.- Ciclo de vida de los mejillones. (Hickman y Larson, 2002).

1.2 Calidad de alimentos y trazabilidad

Los mejillones son un recurso de gran interés gastronómico que debe cumplir con todas las normas de inocuidad de los alimentos y proporcionar la “garantía de que no causarán daño al consumidor” (*Codex Alimentarius*, 2003). Para cumplir con esta normativa se requiere de **trazabilidad**, que es la capacidad de seguir un alimento a través de todas las etapas de su producción,



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

transformación y distribución, incluyendo la importación y venta al por menor. La trazabilidad debe ser capaz, al menos, de seguir los movimientos un paso atrás y un paso adelante del alimento en cualquier punto de la cadena de suministro. Esto permite realizar la retirada del producto rápida y eficazmente cuando se detecta algún problema y además permite investigar su causa (Dalvit y Cols., 2007; Ogden, 2008; Larraín y Cols., 2014).

La trazabilidad para alimentos de origen marino opera en tres niveles: identificación de la especie, determinación del origen geográfico, seguimiento y rastreo a través de la cadena de suministros (Ogden, 2008). Esta información puede obtenerse con métodos basados en el análisis de ADN. Para esto se deben seleccionar marcadores moleculares, que junto con métodos de agrupación y asignación de individuos a localidades, proporcionen un nivel aceptable de certeza para su posterior aplicación en trazabilidad de los productos de origen marino (Larraín y Cols., 2014). El uso de marcadores moleculares para estudiar la trazabilidad en alimentos es algo conocido (Dalvit y Cols., 2007), así como lo es para el estudio en productos marinos (Bossier, 1999).

En los mejillones, el primer nivel de trazabilidad se cumple actualmente a través de métodos de identificación genética de especies, ya que la



identificación basada en las características morfológicas no es confiable por su alta plasticidad fenotípica. La identificación de especie se emplea para investigar fraude comercial por sustitución de especies (Santaclara y Cols., 2006). El origen geográfico de los mejillones, el segundo nivel de la trazabilidad, no se puede establecer mediante la identificación de la especie, debido a la distribución mundial de *Mytilus* y la existencia de zonas híbridas (Gerard y Cols., 2008; Westfall y Gardner, 2013). Actualmente, se está trabajando en técnicas moleculares (marcadores SSR) que permitan asignar individuos a un origen geográfico determinado (Larraín y Cols., 2014).

1.3 Técnicas moleculares

Las técnicas de análisis genético y los métodos de genotipificación existen desde hace varias décadas. Sin embargo, su uso y aplicación se ha incrementado considerablemente en los últimos años. Estas técnicas se basan en utilizar marcadores moleculares como huellas que permiten encontrar diferencias, relaciones genealógicas o similitud entre distintos individuos, lo que es útil en la trazabilidad, calidad e inocuidad de los alimentos (Selkoe y Toonen, 2006).

Los marcadores moleculares son segmentos de ADN en una región determinada de un cromosoma, cuya herencia genética sigue los patrones



clásicos mendelianos. Un marcador puede ser un gen, o puede ser una sección del ADN sin función codificante. Los marcadores moleculares ofrecen la posibilidad de estudiar organismos y poblaciones, llegando a diferenciar individuos, grupos o poblaciones de interés (E. Kahl y Cols., 2000). Para el análisis de moluscos, el ADN puede ser de origen nuclear o mitocondrial. Entre los principales marcadores moleculares que se pueden mencionar: (i) RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), técnica que amplifica aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies, (ii) PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que se basa en la diferencia de los patrones de corte de enzimas de restricción sobre un amplicón en particular, y (iii) **microsatélites o SSR** (*Simple Sequence Repeats*) (Eguiarte y Cols., 2007).

1.3.1 PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Este tipo de marcador se desarrolló a finales de los años 70 y se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular generados por digestión con una enzima de restricción particular. Se utiliza para diferenciar o genotipificar individuos mediante el análisis de patrones de los fragmentos derivados de cortes en el ADN de amplicones. Estos cortes presentan patrones de distancia, longitud y disposición propios para cada individuo dependiendo de las características de la secuencia de ADN particular (Avisé, 1994).

El ejemplo más representativo del trabajo con PCR-RFLP en *Mytilus*



corresponde al trabajo de Inoue y Cols., (1995), que desarrolló una pareja de partidores (Me 15-16) que permite discriminar las tres especies del género, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, lo que hace útil este marcador para trazabilidad. Con Me 15-16 se amplifica un segmento del gen PAP (Proteína Adhesiva Polifenólica) que interviene en la formación del biso, formado por filamentos que permiten que el mejillón se adhiera al sustrato rocoso y se defienda de posibles depredadores (Cáceres y Figueras, 2007). La amplificación del locus Me 15-16 genera fragmentos de distinto tamaño para cada especie: 180 pares de bases (pb) en *M. edulis*, 168 pb en *M. trossulus* y 126 pb en *M. galloprovincialis* y *Mytilus chilensis*. Los autores Santaclara y Cols., (2006) y Fernández y Toro (2006), lograron diferenciar entre estas dos últimas especies al digerir el fragmento amplificado con la enzima de restricción *Acil*. La digestión con esta enzima genera dos fragmentos de 69 pb y 57 pb en el caso del amplicón de *M. galloprovincialis*, y no corta el amplicón de *M. chilensis*.

1.3.2 HRM (*High Resolution Melting*)

Esta técnica corresponde al análisis de las curvas de disociación (*melting*) de productos de PCR que son sometidos a alta temperatura y permite detectar un polimorfismo de un solo nucleótido en pequeños amplicones. Utiliza un agente intercalante fluorescente de ADN de doble hebra, el cual no interfiere en el proceso de amplificación y fluoresce únicamente al estar unido a la doble hebra. El fundamento de esta técnica reside en que al aumentar gradualmente la



temperatura del amplicón resultante, el ADN se desnatura liberando el fluoróforo provocando que la señal disminuya. Al graficar la fluorescencia vs temperatura, se obtiene una curva de disociación o “*melting*”. Esta curva permite detectar diferencias entre distintas secuencias, ya que la energía necesaria para romper un enlace A-T y C-G es diferente para cada pareja de nucleótidos. Adicionalmente, los amplicones de distinto tamaño poseen curvas con distinta forma y/o desplazamiento, lo que permite identificar polimorfismos de tamaño (Reed y Cols., 2007). En este trabajo se utilizó esta técnica para detectar el polimorfismo de una base (SNP) en un fragmento del gen que codifica para la proteína adhesiva polifenólica que permite diferenciar las especies *M. galloprovincialis* y *M. chilensis*, basándose en el mismo SNP utilizado por Santaclara y Cols. (2006). La curva de *melting* también permite distinguir *M. edulis* de las demás especies de *Mytilus* por su amplicón de mayor tamaño.

1.3.3 Microsatélites (SSR)

Los microsatélites consisten en secuencias repetitivas en tándem de uno a seis nucleótidos encontradas en alta frecuencia en el genoma en la mayoría de las taxas. Existen secuencias altamente conservadas que flanquean estas repeticiones, por lo que se utilizan estas zonas para el diseño de partidores. Los microsatélites tienen una alta tasa de mutación (entre 10^{-2} y 10^{-6} por *locus*). El número de repeticiones encontradas en cada individuo da origen a los alelos



polimorfismos. Esta alta tasa de mutación permite observar cambios en períodos acotados de tiempo (Selkoe y Toonen, 2006), razón por la cual los microsatélites son marcadores muy informativos y ampliamente utilizados en estudios poblacionales o de parentesco genético (Larraín y Cols., 2012; Selkoe y Toonen, 2006; Avise, 1994).

1.4 Calidad de marcadores

Para utilizar un marcador genético molecular de manera confiable en estudios diagnósticos es necesario tener un respaldo o **validación**. Este término suele incluir factores tales como calibración, estándares externos, precisión y exactitud, entre otros (Firestein, 2006). En este estudio en particular se precisa y limita el término validación para un marcador como la demostración de su utilidad para el estudio de poblaciones ya sea por su nivel de polimorfismo, su fiabilidad para predecir un fenotipo (*marker-assisted selection*) o su valor diagnóstico (Fernando y Cols., 2015; LaPointe y Cols., 2012). Para evaluar la utilidad en estudios genéticos de poblaciones y paternidad, es necesario demostrar que poseen un patrón de **herencia mendeliano** (Selkoe y Toonen, 2006; Dakin y Avise, 2004). Esto implica que si ambos padres son heterocigotos para un marcador, su descendencia tendrá una proporción de 1:2:1 para los genotipos homocigoto para un alelo, heterocigoto y homocigoto para el otro



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

alelo, respectivamente (Dakin y Avise, 2004). El patrón de herencia de los marcadores microsatélites es codominante, es decir permite distinguir homocigotos de heterocigotos, ya que ambos alelos son visibles en el fenotipo (Selkoe y Toonen, 2006). Este patrón se cumple en microsatélites nucleares, pues en el caso de SSR mitocondriales la herencia no es mendeliana. Esto se debe a que el ADN mitocondrial en la mayoría de las especies se hereda casi exclusivamente de la madre, por lo cual estos marcadores no podrán presentar codominancia. Sin embargo, en *Mytilus* machos se encuentra ADN mitocondrial de ambos progenitores en distinta proporción, lo que dificulta su estudio (Breton y Cols., 2006; Hoeh y Cols., 1991). Por esta razón en este trabajo en particular solo se analizaron microsatélites nucleares.

Uno de los principales usos de los microsatélites es el análisis genético de paternidad (maternidad y paternidad biológica). Una consideración clave en este tipo de análisis es la probabilidad de exclusión que corresponde al poder de un *locus* para excluir genéticamente individuos candidatos como padres. Esta es la razón de comprobar la herencia mendeliana en un marcador SSR, pue si no se cumple este principio, no se podrán considerar los datos para una exclusión o análisis genético de población (Dakin y Avise, 2004). Es importante señalar que los microsatélites utilizados en un panel para asignación de individuos a localidades deben estar validados para ser considerados confiables. Los



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

estudios demuestran que la gran mayoría de los microsatélites se comportan de forma mendeliana, sin embargo en el último tiempo ha aumentado el número de casos descritos de herencia no mendeliana. Estos se explican en su mayoría porque el *locus* se ubica en los cromosomas sexuales, se encuentra en ADN mitocondrial o hay evidencia de herencia trisómica o tetrasómica. Por lo tanto, **la única forma de comprobar herencia mendeliana para validar un microsatélite es el estudio de familias de individuos**, analizando el traspaso del microsatélite entre generaciones (Selkoe y Toonen, 2006).

En la especie *Mytilus* existen marcadores que han herencia de forma mendeliana. Entre ellos se encuentra el marcador PCR-RFLP **Me 15-16** descrito por el grupo de Inoue y Cols. (1995) y cuya herencia mendeliana fue corroborada por otros autores (Wood y Cols., 2003). En este trabajo se usó este mismo marcador para identificar y caracterizar la especie *M. chilensis*. Otros marcadores con herencia mendeliana comprobada corresponden a los microsatélites **MT203** (Gardeström y Cols., 2008) y **MGE005** (Yu y Li, 2007), generados para *M. trossulus* y *M. edulis* respectivamente, cuya herencia comprobó Pino-Querido (2014) y que también se utilizaron en este trabajo para comprobar las paternidades en familias de individuos.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

Para el estudio de los mitílidos de Chile es deseable tener microsatélites desarrollados en las especies de interés, por esto, en el laboratorio se han desarrollado microsatélites para el género *Mytilus* del sur de Chile. Sin embargo, es importante que éstos sean validados para utilizarlos de forma confiable (Araneda y Cols., 2015).

Para validar los microsatélites se debe comprobar si poseen un patrón de herencia mendeliana. Por este motivo, es necesario estudiar **el patrón de herencia en los microsatélites generados, en familias de mejillones producidas bajo condiciones controladas**, para así tener una base sólida para futuros estudios poblacionales, genéticos o forenses. Este trabajo busca entregar nuevos antecedentes que permitan certificar la utilidad de marcadores microsatélites para la especie *Mytilus chilensis* y servir de punto inicial para nuevos estudios que permitan que estos marcadores o un conjunto de ellos certifiquen la especie o asignen poblaciones con fines de trazabilidad alimenticia, así como ayuden a su estudio genético y su aceptación taxonómica.



II. Hipótesis

Los microsatélites *Mch-UCH18* y *Mch-UCH104* se heredan en forma mendeliana en familias de *Mytilus chilensis*.

Objetivos

Objetivo general:

Evaluar la herencia mendeliana de marcadores microsatélites desarrollados en el laboratorio para la especie de mejillones *Mytilus chilensis*.

Objetivos específicos:

- 1.- Identificar la especie de los individuos en cada familia de mejillones (padres e hijos).
- 2.- Confirmar las familias con marcadores informativos y estandarizados existentes.
- 3.- Evaluar la segregación mendeliana de dos microsatélites desarrollados en el laboratorio.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Reactivos e insumos generales:

BioLine® (Londres, Gran Bretaña): Estándar de tamaño (*ladder*)
Hyperladder IV, Hyperladder V

Invitrogen™ (Carlsbad, California, Estados Unidos): UltraPure™ Agarose,
dNTP Set (100 mM)

Biotium (Hayward, California, Estados Unidos): Sistema comercial Fast
EvaGreen® Master Mix

Thermo Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania, Estados Unidos): ADN
polimerasa Taq recombinante

Cayman Chemical Co® (Ann Arbor, Michigan, Estados Unidos): Agua
grado PCR

New England Biolabs (Hitchin, Hertfordshire, Gran Bretaña): Enzima de
restricción Acil

Winkler (Santiago, Chile): Sistema comercial BM-0860 de tinción con plata

Applied Biosystems® (Foster City, California, Estados Unidos): Estándar
de electroforesis LIZ GS-500

Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos): Bromuro de etidio



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

3.1.2 Equipos:

Eco Real-Time PCR System de Illumina®

Termociclador Bio-Rad T100®

Termociclador Techno TC-412

Equipo de electroforesis ABI-3130XL. Servicio prestado por la Universidad Católica de Chile (Santiago, Chile).

3.1.3 Programas:

Eco Software v5.0 (Illumina, San Diego, California, Estados Unidos)

Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems®).

CERVUS 3.0 (Field Genetics, Londres, Gran Bretaña)

IDENTIX (Université de Montpellier, Montpellier, Francia)



3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Muestras

Anterior a este trabajo un equipo de profesionales de Fundación Chiquihue (Puerto Montt generaron seis familias de *Mytilus* en ambiente controlado por, con un total de 230 individuos (ver Anexo 1 para el listado completo de individuos) siguiendo las recomendaciones de Pino-Querido y Cols. (2014). La salvedad fue que los individuos recién fijados fueron llevados al mar. Para formar las familias se tomaron las seis primeras hembras y los seis primeros machos en desovar, luego se fertilizó la primera hembra con el primer macho en un estanque, y así sucesivamente con las otras cinco parejas.

Se dejaron reposar los gametos recién fecundados para que decantaran y se eliminaron aquellos de menor calidad. Luego los embriones se dispusieron en estanques de 200 litros para que siguieran su desarrollo hasta larvas veliger. Estas fueron cultivadas por aproximadamente 25 días hasta que se hicieron competentes para asentamiento, fijación y metamorfosis, momento en el cual se incorporó un sustrato filamentoso en los estanques (colectores), para que se adhirieran a él. Luego de 10 días de cultivo en condiciones controladas, los colectores se trasladaron al medio natural dentro de mallas para evitar fuga y pérdida de ejemplares. Después de tres meses, para cada cruzamiento, se



recolectaron entre 30 y 50 individuos, excepto en la familia 5 de la cual no se recuperó ningún ejemplar (Tabla 1). Precio a este estudio se extrajo ADN según el método de fenol-cloroformo (Larraín y Cols. 2012) a las 230 muestras recolectadas y se llevaron a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, la pureza de la extracción se muestran en Anexo2.

Figura 2-. Esquema del proceso realizado para el cultivo de mejillones.

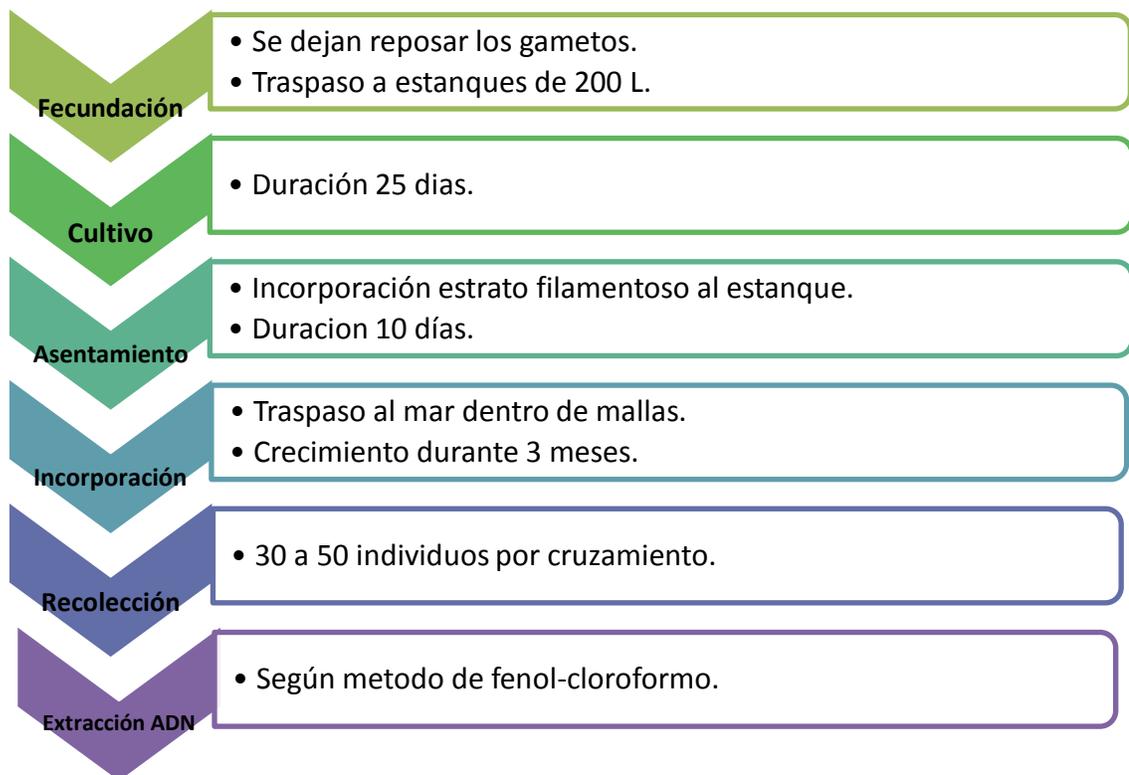




Tabla 1.- Resumen de la recolección de individuos.

N° Individuos recolectados		N° Individuos recolectados	
Cruzamiento 1 (♀1 X ♂1)	50	Cruzamiento 4 (♀4 X ♂4)	50
Cruzamiento 2 (♀2 X ♂2)	50	Cruzamiento 5 (♀5 X ♂5)	0
Cruzamiento 3 (♀3 X ♂3)	30	Cruzamiento 6 (♀6 X ♂6)	50



3.2.2.- Identificación de la especie de los individuos en cada familia de mejillones (padres e hijos).

3.2.2.1 Identificación de la especie

HRM: La identificación de la especie se efectuó mediante PCR-HRM (*High Resolution Melting*), utilizando para la amplificación el sistema comercial Fast EvaGreen® y los partidores PAPM-SNP forward y PAPM-SNP reverse (solicitud de patente en Chile N° 1833/2015) propios del laboratorio, que amplifican para un fragmento del gen PAP. La reacción se llevó en un volumen total de 8 µl, utilizando el amortiguador comercial a concentración final 1X, los partidores a 0,16 µM, el ADN a 5µg/µL y el agente ROX con concentración final 0,125X. El programa para el proceso consistió en un ciclo inicial de activación de la polimerasa durante 2 minutos a 96°C, seguidos de 45 ciclos de PCR de 15 segundos a 96°C y 1 minuto a 59°C, finalmente se realiza el ciclo de HRM por 15 segundos a 95°C, luego 15 segundos a 55°C para finalizar con 15 segundos a 95°C. Para este procedimiento se utilizó un sistema comercial Eco Real-Time PCR y se registró la curva de disociación mediante el programa Eco Software v5.0. Se incorporaron individuos de especie conocida como control, correspondientes a un ejemplar de *M. chilensis*, uno de *M. galloprovincialis* y un híbrido de ambos. Con el perfil genético de estos individuos se obtuvieron curvas patrón de *melting*.



PCR-RFLP: Los individuos a los que no se les pudo identificar la especie de manera concluyente con la metodología anterior, se analizaron mediante digestión con la enzima *AcI* (ver Figura 3) del amplicón obtenido con la pareja de partidores Me15 y Me16 (Inoue y Cols., 1995). Esta enzima corta el amplicón de *M. galloprovincialis* generando dos fragmentos y no corta el amplicón de *M. chilensis* (Santaclara, 2006). Las reacciones de amplificación se realizaron en un Termociclador Bio-rad T100®, con ADN polimerasa Taq recombinante a concentración 1,25U, con 2,5mM de magnesio, los partidores a concentración 0,4 µM, además de dNTPs a 50µM cada uno y el ADN templado a 40ng, finalmente con agua grado PCR se completar un volumen de 25 µl por reacción. Se incluyeron en todas las reacciones un control negativo sin ADN. La digestión enzimática se realiza utilizando 0,004U de la enzima *AcI* con una incubación toda lo noche. Los fragmentos digeridos se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (6-8%): bis-acrilamida (A: BA 19:1 o 29:1), usando un sistema comercial de tinción con plata.



Figura 3-. Sitio de corte para la enzima *AcI* de New England Biolabs.



3.2.3- Análisis de las familias de *M. chilensis* con marcadores informativos y estandarizados existentes.

3.2.3.1 Análisis de las familias

Marcador Me 15-16

Para comprobar que los individuos retirados desde los colectores correspondan efectivamente a los colocados inicialmente en ellos, es necesario realizar un test paternidad y parentesco con marcadores que tengan herencia mendeliana comprobada. Por esto como primer paso se utilizó la información entregada por el análisis de identificación de especie usando el marcador Me 15-16, cuya herencia está comprobada mediante la metodología descrita en 3.2.2.1.

Marcadores de microsatélites

En los individuos cuya especie correspondió a los posibles padres se testeó la paternidad con los microsatélites que ya tienen herencia mendeliana probada (*MT203* y *MGE005*) (Pino-Querido, 2014). Para esto, se realizó la amplificación de los SSR incorporando partidores específicos (Ver Tabla 2) con una marca fluorescente y posterior genotipificación de los amplicones obtenidos mediante electroforesis capilar (Schuelke, 2000). Las mezclas y programas utilizados se detallan en la Tabla 3. Esta técnica es similar a un PCR convencional, salvo que se incluye en la PCR un tercer partidador "M13"



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

(TGT AAA ACG ACG GCC AGT) (Schuelke, 2000) marcado con los fluoróforos NED (amarillo), VIC (verde), PET (rojo) o 6-FAM (azul). Este partidor se une como cola en el extremo 5' del partidor sentido (Figura 4) (Schuelke, 2000). Para realizar las amplificaciones se utilizaron 0,07U/ μ l de Taq polimerasa, con 3mM de magnesio, además de 0,2mM de dNTP, los partidores antisentido y el partidor universal fluorescente se utilizaron a concentración final 0,16 μ M, mientras que el sentido se utilizó a 0,04 μ M, el templado se utilizó a concentración 2,67ng/ μ l en un volumen final de 15 μ l. El programa utilizado fue el mismo en ambos marcadores, cambiando únicamente la temperatura de “melting” para cada set de partidor, siendo esta 61°C para los partidores de MT203 y 63°C para MGE005. El programa inicia con la activación de la polimerasa durante 4 minutos a 95°C, luego 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a la temperatura de melting y 30 segundos a 72°C, luego se realizan 8 ciclos donde se une el partidor universal, estos se realizan a 94°C por 30 segundos, luego 53°C por 45 segundos y 72°C por 45 segundos, finalmente se mantiene por 12 minutos a 72°C. Para visualizar la amplificación y comprobar la calidad de ésta, previa a la lectura fluorescente se utilizaron geles de agarosa al 1,8%. Para estimar el tamaño de los fragmentos de amplificación se utilizó un estándar de tamaño (ladder) Hyperladder IV e Hyperladder V (Bioline®). Además se incorporó un control negativo en la amplificación para descartar contaminaciones. En la Tabla 2 se



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

resumen las características de los 4 marcadores SSR utilizados en esta memoria. Para determinar los genotipos, los fragmentos amplificados se analizaron mediante electroforesis capilar en un equipo ABI-3130XL con el estándar LIZ GS-500 en la Universidad Católica de Chile. Los alelos se visualizaron utilizando el programa Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems®).

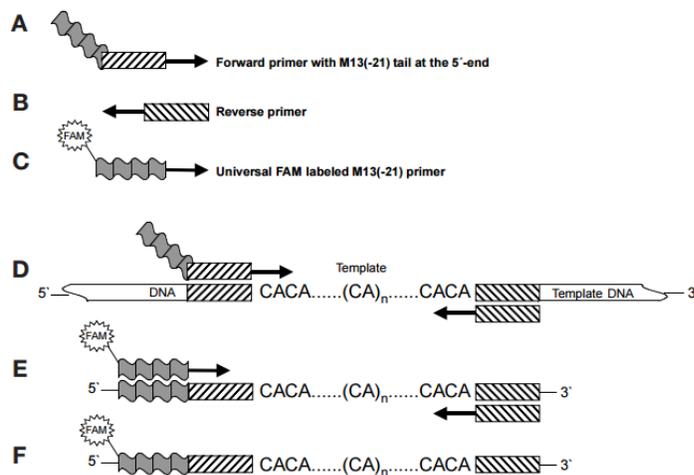


Figura 4.- Esquema de la incorporación de marca fluorescente a los amplicones de la PCR. (Schuelke, 2000). Las cajas achuradas indican los partidores específicos para el microsatélite, las cajas ondulantes representan el partidor universal con la cola M13 que tiene unida la marca fluorescente FAM. En los primeros ciclos el partidor específico incorpora la cola M13 a los amplicones, en los ciclos siguientes estos amplicones se unen al partidor universal mediante la cola M13, generando amplicones con la marca fluorescente.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

Tabla 2.- Caracterización de los 4 marcadores utilizados.

Microsatélite	Número Genebank	Referencia	Motivo	Rango de tamaño (pb)	Partidor sentido	Partidor antisentido
Mch-UCH18	KJ018305	DOI: 10.1111/age.12398	TGA	184-212	CATGCAGAAATCAGGCCATT G	CAGTACCACTTAATTCCCTTCTCC
Mch-UCH104	KT73108 7	DOI: 10.1111/age.12398	AT	244-246	GCAGTTCAAATGGCAGACAA	TTGCTTGTCTTGTGCATAACC
MGE005	AJ623869	DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01865.x	TGA	220-244	CGTTGCCATCGTTTATTTT	GTTGTAAGTCGTGTTGGTTCA
MT203	BV72548 2	DOI 10.1007/s10592-007-9432-x	CA	161-197	GTTTTCCGAATGGCGAGATA	ACAACCAGTTCAATAGCGACA



3.2.3.2 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de paternidad utilizando los marcadores Me 15-16, *MT203* y *MGE005* con herencia comprobada (Wood y Cols. 2003) (Pino-Querido, 2014). Con estos marcadores se calculó la probabilidad de exclusión de paternidad para cada *locus* (PE), lo que permite excluir un padre no relacionado, a partir del genotipo de ambos padres y el descendiente (Jamieson y Taylor, 1997). Se utilizó el programa CERVUS 3.0 para obtener estos valores. Paralelamente se realizó un análisis de parentesco R_{xy} , usando el estimador simétrico de Queller y Goodnight (1989) en el programa IDENTIX. Para calcular la significancia de los resultados obtenidos se realizó un test de 1000 permutaciones. El valor esperado para este parámetro en una relación progenitor-progenie y hermanos completos es 0,5 en ambos casos, mientras que el valor para medios-hermanos corresponde a 0,25, y para individuos no relacionados el valor esperado es 0 (Araneda y Cols. 2004).



3.2.4 Evaluación de la segregación mendeliana de dos microsatélites desarrollados en el laboratorio

Los microsatélites a estudiar en *Mytilus* del sur de Chile se desarrollaron previamente por piro-secuenciación en Omics Solutions (<http://omics-solutions.cl>) (Araneda y Cols., 2015). Inicialmente se estudió los progenitores, para determinar cuáles de los SSR desarrollados eran polimórficos, y por lo tanto informativos. Esto se hizo por PCR convencional y visualización en geles de acrilamida en las mismas condiciones descritas en la sección 3.2.2.1, siendo las temperaturas de *melting* de estos set de partidores de 59°C para el marcador Mch-UCH 18 y 62°C para Mch-UCH104. Luego, para obtener los genotipos, tanto de los padres como de los posibles hijos, se utilizó la misma técnica de genotipificación de amplicones fluorescentes y análisis por electroforesis capilar descrita en 3.2.3.1.

Se evaluó el genotipo de ambos padres y sus posibles hijos, clasificándolos por sus genotipos y su frecuencia absoluta. Este análisis se hizo únicamente en los individuos que entregaron valores positivos en la prueba de paternidad, explicada en la sección 3.2.3.2.



IV RESULTADOS

4.1.- Identificación de la especie de los individuos en cada familia de mejillones (padres e hijos).

En primer lugar es necesario determinar si las familias son útiles para el estudio en la especie de interés, vale decir corresponden a la especie *M. chilensis*. Para esto se identificó la especie de los padres y posteriormente de los hijos. Con el fin de analizar la especie de los parentales se realizó un análisis PCR-RFLP, utilizando los partidores Me 15-16 y digestión de los amplicones obtenidos con la enzima *AclI*, la cual presenta un sitio de corte en la especie *M. galloprovincialis*, pero no en *M. chilensis*. Los fragmentos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida mostrado en la Figura 5, se observó que todos los individuos masculinos (carriles 1-6) presentaron una banda única 126 pb lo que indica que corresponden a la especie *M. chilensis*. En las muestras femeninas (carriles 8-13) se observó la misma banda a 126 pb, para los ejemplares analizados en los carriles 8, 10, 11 y 12, indicando que corresponden también a la especie *M. chilensis*. Sin embargo, en dos casos correspondientes a la hembra de la familia 2 (carril 9) y la de la familia 6 (carril 13), se presentan 2 bandas adicionales de 69 y 57 pb, indicando que estos individuos son híbridos entre *M. galloprovincialis* y *M. chilensis*.



En consecuencia, todos los parentales fueron de la especie *M. chilensis*, a excepción de las dos hembras de los cruzamientos 2 y 6, que resultaron ser híbridos *M. chilensis* X *M. galloprovincialis*. Esto confirma la necesidad de estudiar los ejemplares parentales de cada una de las familias y para los microsatélites ensayados para el estudio de estas especies. La banda de 175pb corresponde a una “sombra característica” para muestras digeridas con la enzima *Acil*, visible incluso en los controles negativos, que es producida por el amortiguador de digestión para la enzima (Manual *Acil* R0551, 2015).

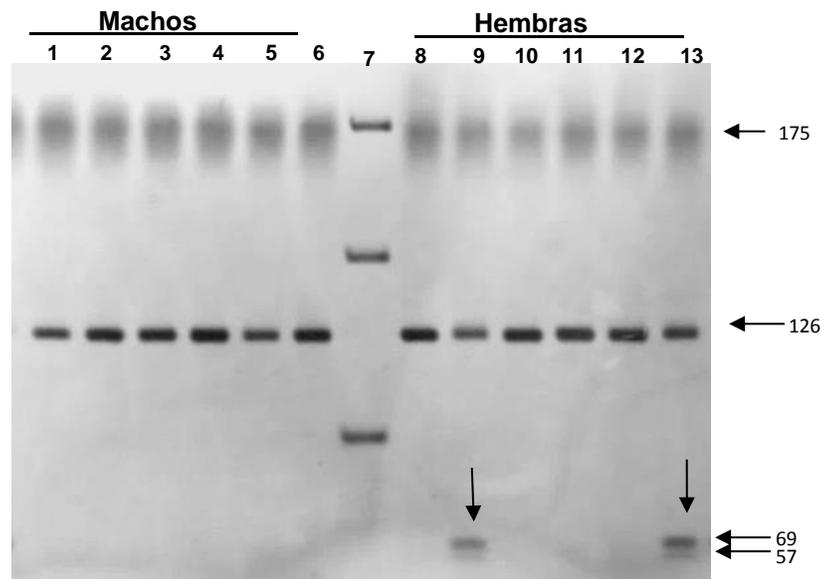


Figura 5.- Determinación de especie para los individuos parentales de cada familia. PCR-RFLP con partidores Me15-16 digerido con *Acil*. Carril 1 – carril 6: Machos, carril 7: estándar de peso molecular Hyperladder V, Carril 8 – carril 13: hembras. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% teñido con plata. Las flechas negras indican la presencia de una doble banda y por lo tanto identifican a individuos híbridos entre *M. galloprovincialis* y *M. chilensis*.



Para determinar la especie de los 230 descendientes se realizó un análisis HRM, esta técnica se prefirió debido al ahorro de tiempo que implica además de ser más económica. Para esta técnica es necesario obtener curvas patrón a partir de ADN de individuos de especie conocida, para luego clasificar las curvas obtenidas a partir de ADN de los posibles descendientes, según su similitud a los patrones control. Las curvas patrón pueden observarse en la Figura 6, donde la curva de color azul representa el control de especie *M. chilensis*, en marrón el control de *M. galloprovincialis* y en verde el híbrido entre ambas especies.

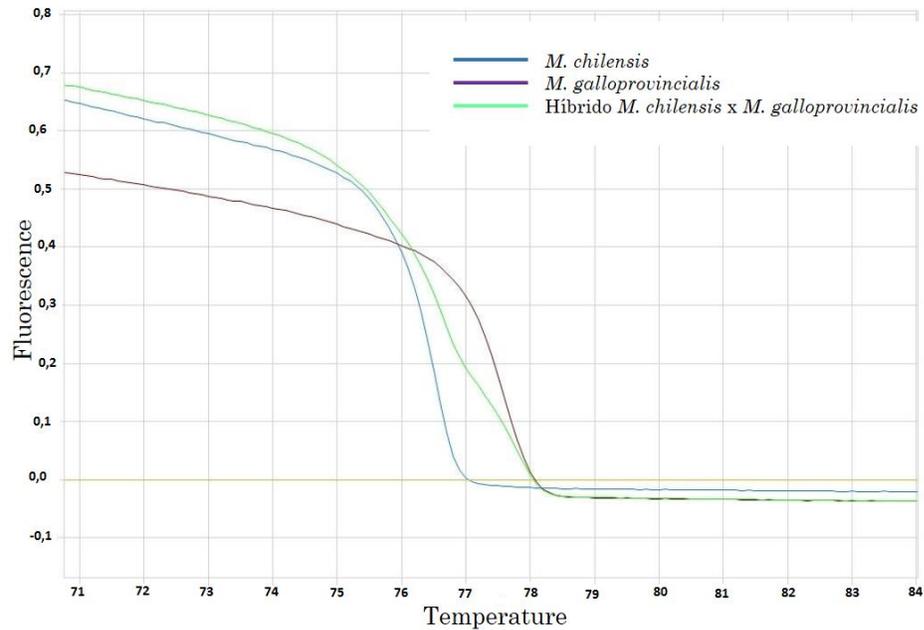


Figura 6. Patrón de curvas de “melting” de las distintas especies de mitílicos. HRM con partidores PAM-SNP. En color azul la curva característica para *M. chilensis*, en marrón *M. galloprovincialis*, en verde el híbrido. HRM visualizado con el programa Eco Software V5.0.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

Se verificó esta técnica ratificando los resultados obtenidos para los parentales mediante PCR-RFLP, utilizando HRM. En la figura 7 se observa que la hembra 2 y la hembra 6, indicadas con flechas, presentan un patrón correspondiente al híbrido entre *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*. El resto de los individuos parentales presentan un patrón característico de *M. chilensis*. En base a estos resultados se procedió a realizar el análisis de los posibles hijos de los 6 cruzamientos mediante HRM.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

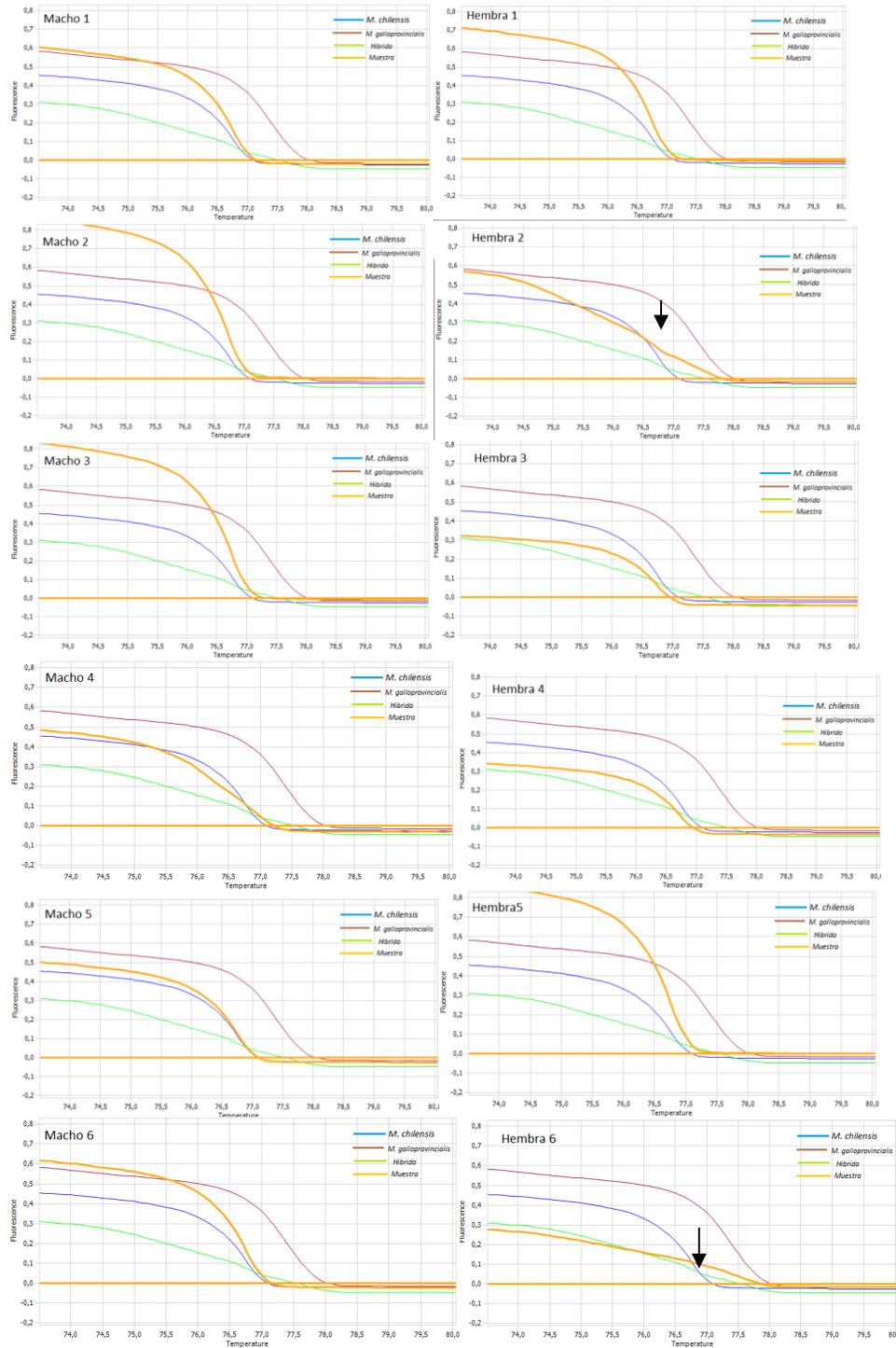


Figura 7.- Curvas de “melting” obtenida a partir de ADN de los mejillones parentales. HRM con partidores PAM-SNP. En azul la curva característica para *M. chilensis*, en marrón *M. galloprovincialis*, en verde el híbrido y en color naranja la muestra. Visualización con el programa Eco Software V5.0.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

Se identificó la especie de los descendientes considerando tanto la forma de la curva como su desplazamiento para cada individuo. Los resultados indicaron que del total de 230 individuos analizados un 3,5% correspondieron a *M. chilensis*, un 13% correspondieron a *M. galloprovincialis*, un 81,3% correspondieron a híbridos de ambas especies y en un 2,2% no se determinó la especie con exactitud. En la tabla 3 se muestra un resumen de los resultados de identificación de los posibles descendientes de cada cruzamiento. En la familia 1 se observó que los 50 putativos descendientes presentan un patrón de curva similar al control híbrido. En la familia 2 se obtuvo como resultado 30 putativos descendientes *M. galloprovincialis*, 3 *M. chilensis*, 15 descendientes híbridos y 2 individuos dudosos. Para la familia 3 los 30 putativos descendientes mostraron un patrón de curva similar al control híbrido. Los 50 descendientes putativos de la familia 4 presentaron un patrón de curvas similares al control híbrido. De la familia 5 no se recolectaron descendientes. En la familia 6, de los 50 individuos recolectados, 5 putativos descendientes fueron *M. chilensis*, 42 descendientes fueron híbridos, y 3 individuos fueron dudosos. El detalle de las curvas obtenidas para cada cruzamiento se muestra en el anexo 3.



Tabla 3.- Resumen de las especies obtenidas mediante HRM para los descendientes de cada cruzamiento.

Cruzamientos	Hembra X Macho	Mch	Mgal	Hib	Dudoso	Total
Cruzamiento 1	Mch X Mch	0	0	50	0	50
Cruzamiento 2	Hib X Mch	3	30	15	2	50
Cruzamiento 3	Mch X Mch	0	0	30	0	30
Cruzamiento 4	Mch X Mch	0	0	50	0	50
Cruzamiento 6	Hib X Mch	5	0	42	3	50
Total		8	30	187	5	230

Mch: *Mytilus chilensis* Mgal: *Mytilus galloprovincialis* Hib: Híbrido *Mytilus chilensis* X *Mytilus galloprovincialis*

Para resolver el 2,2% de los descendientes cuya especie no se identificó con certeza, debido a que no presentaban una forma definida o se encontraban en una posición intermedia entre las curvas patrón, se realizó un análisis PCR-RFLP según la metodología del grupo de Santaclara (2006). El resultado para las muestras dudosas se muestra en la Figura 8, donde observamos que 4 de los individuos dudosos muestran bandas de 126 pb, 69 pb y 57 pb lo que indica que son híbridos entre *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*, mientras que un individuo presenta una sola banda de 69 pb, por lo que se concluye éste es un individuo *M. galloprovincialis* puro. Se incorporó al análisis dos descendientes al azar para confirmar que la especie obtenida por ambos métodos fuera la misma, esto como comprobación adicional a la que se realizó con los individuos parentales, esta confirmación resultó positiva. En la tabla 4 se muestra el resumen de las especies obtenidas mediante HRM y PCR-RFLP. El detalle de la identificación de cada individuo a nivel de especie se encuentra en el Anexo 4.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

En resumen, los resultados obtenidos indican que 3,9% de los individuos corresponden a *M. chilensis*, un 82,6% son híbridos y un 13,5% *M. galloprovincialis*, sin embargo, el resultado esperado correspondía a 88,6% de esta especie y solo un 11,4% de individuos híbridos. Esto indica que los individuos analizados mayoritariamente no corresponden a descendientes de los cruzamientos. Resulta sorprendente la alta proporción de individuos híbridos y *M. galloprovincialis* obtenidos, considerando que está documentado que en las costas chilenas la especie predominante corresponde a *M. chilensis* (Larraín y Cols., 2012) y además que las condiciones marítimas de Chile no son óptimas para el crecimiento de individuos *M. galloprovincialis* (Mesas y Tarifeño, 2015).

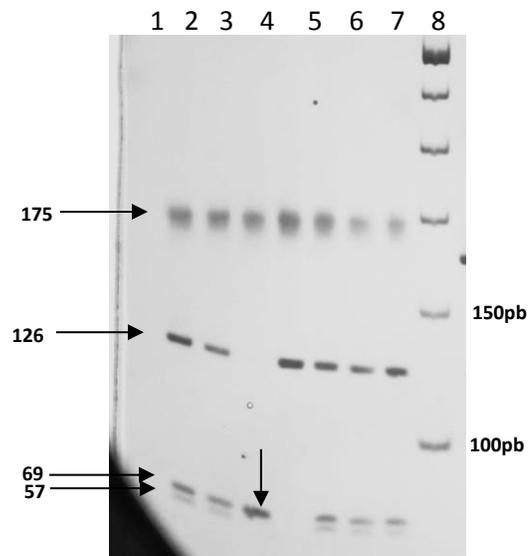


Figura 8.- Análisis de la especie de individuos no concluyentes por HRM mediante PCR-RFLP. Partidores Me15-16, digestión con la enzima AclI. Carril 1: individuo al azar de la familia 1 (X1-33), carril 2 – carril 3: no concluyentes familia 2 (X2-4 y X2-24), carril 4 – carril 6: no concluyentes familia 6 (X6-12, X6-16 y X6-32), carril 7: individuo al azar, familia 3 (X3-1), carril 8: Estándar de peso molecular Hyperladder V. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% teñido con plata Kit BM-0860 Winkler. La flecha negra muestra una digestión completa y por lo tanto este individuo se clasifica como *M. galloprovincialis*.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

Tabla 4.- Resumen con el total de individuos de cada especie por familia identificados mediante HRM y PCR-RFLP.

Cruzamientos	Hembra X Macho	<i>Mch</i>	<i>Mgal</i>	Hib	Total
Cruzamiento 1	Mch X Mch	0	0	50	50
Cruzamiento 2	Hib X Mch	3	31	16	50
Cruzamiento 3	Mch X Mch	0	0	30	30
Cruzamiento 4	Mch X Mch	0	0	50	50
Cruzamiento 6	Hib X Mch	6	0	44	50
Total		9	31	190	230

Mch: *Mytilus chilensis* *Mgal*: *Mytilus galloprovincialis* *Hib*: híbrido *Mytilus chilensis* X *Mytilus galloprovincialis*



4.2.- Confirmación de las familias con marcadores informativos y estandarizados.

Para determinar si las familias de mejillones se recolectaron correctamente y por lo tanto nos permitirá estudiar el patrón de herencia de los microsatélites, primero se identificó la especie de los posibles descendientes y se comparó con los progenitores, con el fin de descartar de los individuos cuya especie no se correspondiera de acuerdo a los resultados descritos en la sección 4.1. Luego, para realizar un análisis de exclusión de paternidad que permitiera comprobar las familias, se evaluó cuáles de los marcadores con herencia mendeliana comprobada eran informativos (son polimórficos). Finalmente se realizó el análisis de paternidad junto con un análisis de parentesco R_{xy} utilizando los marcadores *MT203*, *MGE005* y *Me15-16*.

Marcador Me 15-16

Con el fin de descartar individuos cuya especie no se correspondiera con la de los padres, se generó la Tabla 5. En esta tabla se comparó la proporción esperada con la proporción obtenida para los descendientes de cada cruzamiento. Se observa que ningún cruzamiento cumplió con la proporción esperada en relación a la especie de los progenitores. Aún más, en los cruzamientos 1, 3 y 4 el resultado descarta totalmente la relación progenitor-progenie, debido a que ninguno de los padres posee alelos de *M.*



galloprovincialis, los cuales sí se encontraron en los supuestos descendientes. En consecuencia, los siguientes análisis sólo se realizaron en las familias 6 y la familia 2, donde existen individuos *M. chilensis* e híbridos de padres que presentan estos alelos. Los individuos de especie *M. galloprovincialis* encontrados en la familia 2 se descartaron quedando solo 19 posibles descendientes de los 50 individuos recolectados. Se analizó además la familia 6 completa que posee 50 individuos. En total, se analizaron 69 sujetos como posibles descendientes de los 230 individuos recolectados inicialmente.

Tabla 5. Comparación de las proporciones esperadas y los resultados obtenidos.

	Padre	Madre	Proporción esperada	Proporción observada
Familia 1	Mch	Mch	100% Mch	100% híbrido
Familia 2	Mch	Híbrido	3 : 1 (Mch : híbrido)	16 : 31 :2 (Híbrido :Mgal : Mch)
Familia 3	Mch	Mch	100% Mch	100% híbrido
Familia 4	Mch	Mch	100% Mch	100% híbrido
Familia 5	Mch	Mch	100% Mch	Sin hijos
Familia 6	Mch	Híbrido	3 : 1 (Mch : híbrido)	22: 3 (Híbrido : Mch)

Mch: *Mytilus chilensis* Mgal: *Mytilus galloprovincialis* Híbrido: *Mytilus chilensis*X *Mytilus galloprovincialis*



Marcadores de microsatélites

Para realizar un análisis de paternidad que nos permita declarar a los reales descendientes es necesario determinar qué marcadores con herencia mendeliana comprobada son informativos para las familias analizando los alelos. Para esto se amplificaron los marcadores SSR MT203 y MGE005 mediante PCR convencional. El resultado presentado en la Figura 9 muestra que el marcador *MT203* es altamente polimórfico, pues presentó distintas bandas entre los progenitores, por lo tanto los individuos para este marcador son todos heterocigotos. En consecuencia, el marcador MT203 posee las características ideales para realizar un test de paternidad. Para el marcador *MG005* ambos individuos muestran una sola banda de 153pb, por lo que los parentales son homocigotos y monomórficos para este marcador. El marcador MGE005 también se utilizó debido a que es altamente polimórfico (Yu y Li, 2007), por lo que la presencia de un alelo distinto al de los progenitores en los posibles descendientes permitirá descartar la paternidad.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

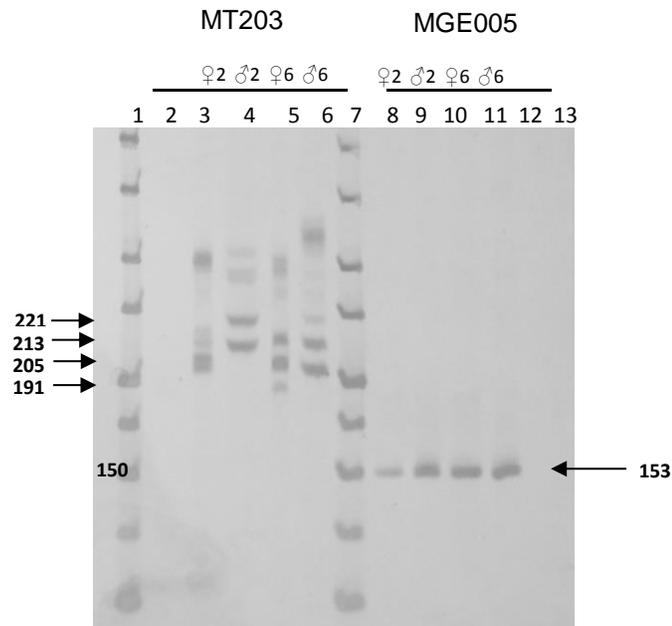


Figura 9.- Perfil electroforético de alelos para los marcadores MT203 y MGE005 mediante PCR convencional. Carril 1 y carril 7: Estándar de peso molecular Hyperladder V, carril 2 y carril 13: control negativo, carril 3 – carril 6: MT203, carril 8 – carril 12: MGE005. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% teñido con plata.

Finalmente, para determinar si los individuos recolectados realmente corresponden a descendientes, se realizó un test de paternidad utilizando los marcadores *MT203*, *MGE005* y *Me15-16*, y se analizaron los resultados mediante el programa Cervus 3.0 (Field Genetics) (Tabla 6). Los resultados obtenidos indicaron que no se encontraron descendientes en la familia 2, dado que los valores de emparejamiento progenitor-progenie fueron negativos o cero. Esto significa que los alelos encontrados en los posibles hijos no coinciden con los de los progenitores. En el cruzamiento 6, de los 50 posibles



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

descendientes 38 ejemplares entregaron valores negativos de paternidad, mientras que 12 individuos presentaron valores positivos solo con respecto a la hembra. La paternidad con el macho resultó negativa. En consecuencia, el cruzamiento 2 no presentó ningún descendiente. En el cruzamiento 6, aunque 12 individuos entregaran valores positivos con respecto a la hembra, no es posible que los individuos sean descendientes, debido a que posterior al desove de los progenitores, estos fueron sacrificados (sección 3.2.1).

Por lo tanto, se puede afirmar que las muestras recolectadas no corresponden a los descendientes de los cruzamientos y que el emparejamiento positivo se debe a una coincidencia en los alelos de los marcadores estudiados.



Tabla 6.- Resumen de los valores de parentesco entregados para cada individuo por el análisis de paternidad.

Individuo	Padre candidato	Score	Madre candidata	Score
X2- 3	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 4	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 8	Macho2	-7,83E+14	Hembra2	-7,83E+14
X2- 10	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 11	Macho2	-7,83E+14	Hembra2	-7,83E+14
X2- 12	Macho2	-7,83E+14	Hembra2	-7,83E+14
X2- 13	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 14	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 17	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 19	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 22	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 26	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 30	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 34	Macho2	-3,23E+14	Hembra2	-3,23E+14
X2- 40	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 45	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 48	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 49	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X2- 50	Macho2	-3,92E+14	Hembra2	-3,92E+14
X6- 1	Macho6	-4,59048E+14	Hembra6	1,09E+14
X6- 2	Macho6	-6,73E+13	Hembra6	0
X6- 3	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 4	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 5	Macho6	-4,59048E+14	Hembra6	1,09E+14
X6- 6	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 7	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 8	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 9	Macho6	-4,59048E+14	Hembra6	3,99E+13
X6- 10	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 11	Macho6	-3,34601E+14	Hembra6	1,09E+14
X6- 12	Macho6	-4,59048E+14	Hembra6	1,09E+14
X6- 13	Macho6	-4,59048E+14	Hembra6	1,09E+14
X6- 14	Macho6	-4,59048E+14	Hembra6	1,09E+14
X6- 15	Macho6	-4,59048E+14	Hembra6	3,99E+13
X6- 16	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

X6- 17	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 18	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 19	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 20	Macho6	0	Hembra6	0
X6- 21	Macho6	-4,59048E+14	Hembra6	3,99E+13
X6- 22	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 23	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 24	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 25	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 26	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 27	Macho6	-2,98E+14	Hembra6	-7,83E+14
X6- 28	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 29	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 30	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 31	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 32	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 33	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 34	Macho6	-4,59048E+14	Hembra6	3,99E+13
X6- 35	Macho6	-4,59048E+14	Hembra6	3,99E+13
X6- 36	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 37	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 38	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 39	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 40	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 41	Macho6	-3,34601E+14	Hembra6	3,99E+13
X6- 42	Macho6	-6,73E+13	Hembra6	0
X6- 43	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 44	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 45	Macho6	-4,59E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 46	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 47	Macho6	-6,73E+13	Hembra6	0
X6- 48	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 49	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14
X6- 50	Macho6	-3,35E+14	Hembra6	-3,92E+14

Individuos con valores positivos.



En forma paralela al análisis de paternidad se realizó un test de parentesco R_{xy} , con el fin de determinar el grado de parentesco entre cada uno de los individuos. Este parámetro indica la probabilidad de que dos individuos tengan un ancestro común. Los valores típicos para la relación progenitor-progenie y hermanos completos son de 0,5, para medios-hermanos 0,25 y 0 para individuos no relacionados (Araneda y Cols., 2004). Para esto se utilizó el programa Identix (Université de Montpellier) y los genotipos de los tres marcadores con herencia mendeliana comprobada, que son *MT203*, *MGE005* y *Me15-16*.

El cruzamiento 2 entregó un valor promedio de parentesco de 0,0022 ($P=0,022$) con una varianza igual a 0,2123, indicando una ausencia de parentesco. El cruzamiento 6 entregó un valor promedio de parentesco de 0,027 ($P=0,076$) con una varianza de 0,1696, indicando que también se trata de individuos no relacionados. En consecuencia, ninguno de los valores obtenidos corresponde al parentesco esperado para familias progenitor-progenie. Sin embargo, la alta varianza obtenida indica que dentro de cada familia analizada existen tanto individuos relacionados como no relacionados (Araneda y Cols., 2004).



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

Se volvió a realizar el test incorporando únicamente a los individuos que dieron valores positivos en el test de paternidad, con la finalidad de analizar si existía relación entre ellos. Como resultado se obtuvo que un 55% de los individuos presentaron índice de parentesco cercano al esperado para hermanos completos ($R_{XY} = 0,5$), mientras que un 25% de casos presentaron valores más cercano a medio hermano ($R_{XY} = 0,25$) y solo un 20% no emparentado ($R_{XY} = 0$). Estos resultados se presentan en la Tabla 7. Los valores negativos de parentesco se interpretaron como no distintos de cero. La mayor parte de los valores que indican ausencia de parentesco corresponde al valor entregado para cruzamientos con el macho 6. En consecuencia, aunque los individuos analizados no corresponden a la progenie de los cruzamientos realizados, en su mayoría presentan algún grado de parentesco entre sí, al menos para los marcadores analizados. Los valores cercanos a 0 entre los posibles descendientes y el macho confirman los resultados del análisis de paternidad, por lo que los individuos no derivan del cruzamiento.

Hay que destacar la existencia de valores mayores a 0,5 e incluso valores de 1 en algunos individuos. Estos valores se explican por el bajo número de marcadores utilizados, pues al analizar sólo tres marcadores, es muy probable que los alelos para estos marcadores coincidan al azar con los de otros individuos no emparentados, entregando valores más altos ($R_{XY} \leq 0,5$).



Tabla 7.- Matriz de parentesco R_{xy} entre los individuos con valores positivos de paternidad.

	Macho 6	X6-1	X6-5	X6-9	X6-11	X6-12	X6-13	X6-14	X6-15	X6-21	X6-34	X6-35	X6-41		
Hembra 6	0,23	0,46	0,46	0,23	0,46	0,34	0,46	0,46	0,27	0,23	0,23	0,32	0,29		
Macho6		-0,24	-0,24	-0,35	0,01	0,19	-0,24	-0,24	-0,29	-0,35	-0,35	-0,22	0,05		
X6-1			1	0,63	0,74	0,79	1	1	0,3	0,63	0,63	0,35	0,32		
X6-5					0,63	0,74	0,79	1	1	0,3	0,63	0,63	0,35	0,32	
X6-9						0,27	0,44	0,63	0,63	0,44	1	1	-0,01	-0,08	
X6-11							0,57	0,74	0,74	0,3	0,27	0,27	0,35	0,66	
X6-12								0,79	0,79	0,19	0,44	0,44	0,24	0,21	
X6-13									1	0,3	0,63	0,63	0,35	0,32	
X6-14										0,3	0,63	0,63	0,35	0,32	
X6-15											0,44	0,44	0,52	-0,01	
X6-21												1	-0,01	-0,08	
X6-34													1	-0,01	-0,08
X6-35															0,54
X6-41															





4.3.- Evaluación de la segregación mendeliana de dos microsatélites desarrollados en el laboratorio.

Con el fin de comprobar la segregación mendeliana, se analizó cuáles marcadores SSR son informativos para evaluar herencia mendeliana mediante un análisis de los alelos. Mediante PCR con partidores fluorescentes se determinaron los tamaños de alelos mediante electroforesis capilar. Los datos obtenidos se analizaron mediante programas estadísticos para estimar en cada cruzamiento si existen desviaciones de las proporciones mendelianas esperadas de acuerdo al genotipo obtenido de los padres.

Se genotificaron 6 marcadores SSR desarrollados en el laboratorio, para determinar cuál de estos poseían alelos distintos entre los padres, y por lo tanto, son informativos para realizar un análisis de herencia mendeliana. Previo a este trabajo se realizaron análisis en poblaciones representativas mostrando ser polimórficos. Se analizaron los marcadores *Mch-UCH15*, *Mch-UCH18*, *Mch-UCH20*, *Mch-UCH93*, *Mch-UCH103* y *Mch-UCH104* (ver Figura 10).

De estos seis marcadores analizados, sólo los marcadores *Mch-UCH18* y *Mch-UCH104* presentaron alelos principales distintos, por lo que se estudió el patrón de herencia de estos marcadores.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

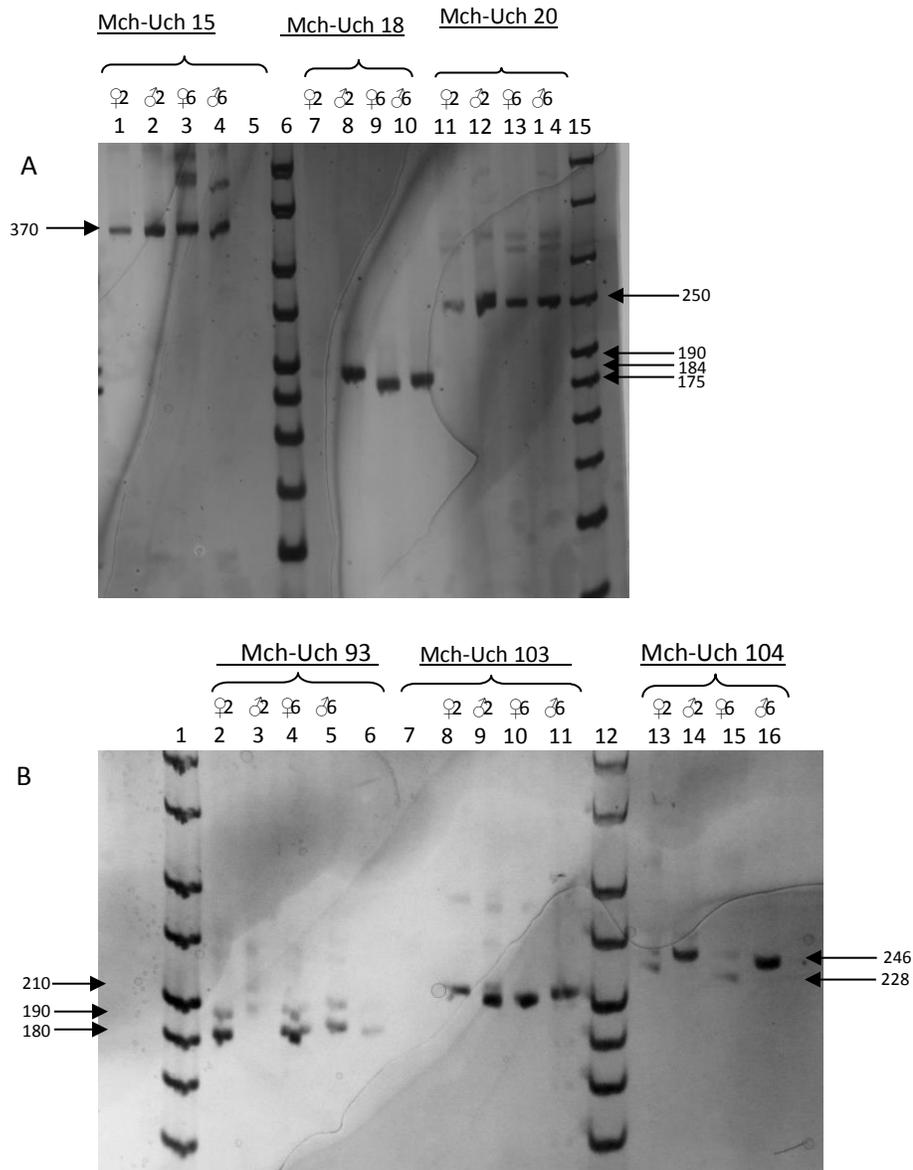


Figura 10.- Perfil electroforético de ADN de muestras parentales para los SSR desarrollados en el laboratorio mediante PCR convencional. A) Análisis de alelos de los marcadores Mch-Uch 15, Mch-Uch 18 y Mch-Uch 20 B) Mch-Uch 93, Mch-Uch 103 y Mch-Uch 104.

A) Carril 1-4: Mch-Uch 15, carril 5: Control negativo, carril 6 y carril 15: Estándar de peso molecular Hyperladder V, carril 7 - carril 10: Mch-Uch 18, carril 11 - carril 14 Mch-Uch 20. **B)** Carril 1 y carril 12: Estándar de peso molecular Hyperladder V, Carril 2 - 5: Mch-Uch 93, carril 6 -7: Control negativo, carril 8- carril 11: Mch-Uch 103, carril 13 - carril 16 Mch-Uch 104. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% teñido con plata.



Con el fin de analizar la herencia mendeliana de un marcador SSR es necesario conocer el genotipo de los progenitores y descendientes. Los resultados entregados por la sección 4.2 indican que los individuos recolectados no corresponden a los cruzamientos. Por lo tanto desconocemos a sus progenitores y resulta imposible realizar una prueba de ajuste de bondad para determinar si existe un patrón de herencia mendeliana de los SSR.

A continuación, en la tabla 8 se muestran los alelos obtenidos para los SSR del laboratorio analizados para los individuos con índice de parentesco elevado (La tabla completa de los 69 individuos analizados se encuentra en el anexo 5). Aunque no es posible realizar un ajuste, se destaca que los alelos obtenidos para los marcadores son iguales en la mayoría de los individuos que presentaron un índice de parentesco R_{xy} elevado, esto no descarta una posible relación de parentesco, por lo que es un buen indicio para los SSR.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

Tabla 8.- Genotipo encontrado para los SSR desarrollados por el laboratorio en individuos con parentesco R_{XY} elevado.

	<i>Mch-UCH104</i>	<i>Mch-UCH18</i>
Hembra 6	228 / 246	175 / 181
Macho 6	244 / 246	178 / 184
X6-1	246 / 246	148 / 151
X6-5	244 / 246	148 / 151
X6-9	244 / 246	-
X6-11	246 / 246	142 / 151
X6-12	244 / 246	148 / 151
X6-13	244 / 246	148 / 151
X6-14	244 / 246	148 / 151
X6-15	246 / 246	151 / 190
X6-21	244 / 246	148 / 151
X6-34	246 / 246	181 / 190
X6-35	232 / 244	151 / 151
X6-41	232 / 244	142 / 151



V DISCUSIÓN

La validación de la utilidad de un marcador molecular es una etapa fundamental antes de su utilización con fines diagnósticos. Este trabajo presenta el proceso utilizado para realizar la comprobación de la segregación mendeliana de marcadores de microsatélites.

El primer paso fue la verificación de la especie de los individuos estudiados, ya que de no ser *M. chilensis* entonces no servirían para el estudio. Para esto se analizó a los parentales con PCR-RFLP y mediante HRM. Los putativos descendientes se analizaron solo mediante HRM. Se utilizó esta técnica por sobre el PCR-RFLP ya que implica un ahorro de tiempo experimental además de ser un método mucho más económico. Luego se comparó la especie de los hipotéticos hijos con los padres. La proporción esperada no se cumplió en ningún caso.

Estos resultados demuestran que hubo un problema en la producción de las familias. Se investigó el procedimiento realizado por la fundación Chiquihue para el cultivo de las familias, ya que la etapa de desove y fecundación fue supervisada por personal del laboratorio. Las siguientes etapas se realizaron en la instalación de la fundación Chiquihue en Puerto Montt, donde se llevaron a los juveniles fijados al mar en mallas para evitar fugas. En el traspaso al mar es de vital importancia que la fecha de este proceso no coincida con la época de desove de los mejillones silvestres. Al parecer éste fue el problema en la producción de las familias, pues no se consideró el factor del desove silvestre y



creemos que esto provocó una mezcla de individuos. Posteriormente, al momento de colectar las muestras no se extrajo a los descendientes de los cruzamientos.

Otros autores como Wood y Cols., (2003) y Fernández-tajes y Cols., (2006) generaron familias para estudiar segregación mendeliana usando metodologías similares a las utilizadas en este estudio tanto en la fecundación como en la fijación de juveniles. En la etapa de crecimiento, estos autores mantuvieron a los individuos en viveros o contenedores aislados para evitar contaminación. Este paso difiere con el procedimiento realizado en Fundación Chiquihue, donde los juveniles fijados fueron traspasados al mar.

La principal ventaja de traspasar a los individuos al mar corresponde al tiempo de crecimiento, dado que los mejillones cultivados en tanques aislados tienen una tasa de crecimiento más lenta (Beaumont y Cols., 2007), por lo que cultivar los individuos en el mar disminuye los tiempos de producción de familias. Sin embargo, como se observó en el presente trabajo, el cultivo en mar abierto abre la posibilidad de contaminación, por lo que habría que tener mayores precauciones (fechas de desove, etc.) en caso de implementar el protocolo de producción de familias en ambiente natural.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

La colecta de individuos ajenos al cruzamiento provocó una reformulación del trabajo propuesto, ya que era inviable esperar la generación de nuevas familias, debido a que el ciclo reproductivo demora al menos seis meses. Por esta razón, se reformularon los objetivos y estrategias de trabajo desde una confirmación de los cruzamientos a la identificación de los individuos que fueran descendientes reales. Se este modo, se decidió seguir analizando a los posibles descendientes, puesto que existía la posibilidad de que algunos de los individuos recolectados fueran descendientes de los cruzamientos realizados y se pudiera estudiar la herencia en ellos.

Al identificar la especie de los posibles descendientes resultó sorprendente el gran número de individuos de la especie *M. galloprovincialis*, puesto que está documentado que en el sur de Chile la especie más abundante de mejillones corresponde a *M. chilensis* (Larraín y Cols., 2012). Además las condiciones del medio marítimo chileno no son óptimas para el crecimiento de individuos *M. galloprovincialis* (Mesas y Tarifeño, 2015). Esto causa preocupación, debido a que la especie *M. galloprovincialis* está catalogada entre las “100 especies exóticas invasoras más dañinas del mundo” según la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN). El aumento de su frecuencia en las costas es una fuerte evidencia de su invasividad y podría implicar una erosión en la diversidad de especies de mitílidos de la zona. Una posible explicación para el hallazgo del gran número de ejemplares de esta



especie, es la localidad donde fueron traspasados los juveniles el mar, correspondiente a “Huelmo”, una locación cercana al puerto de Puerto Montt. Este lugar recibe un gran número de embarcaciones transoceánicas que muchas veces traen individuos adheridos a los cascos y descargan sus aguas de lastre en el puerto. Existen casos documentados de este fenómeno que provoca aumentos temporales de individuos foráneos, como es el caso de la Bahía Coliumo y en el golfo de Arauco (Mesas y Tarifeño, 2015).

Luego de descartar a todos los individuos que por su especie no se correspondían a los padres, vale decir se descartaron los casos en que los padres eran de la especie *M. chilensis* y los supuestos hijos eran híbridos o *M. galloprovincialis* (anexo3). Se siguió adelante con el análisis de los individuos que eran *M. chilensis* o híbridos provenientes de cruzamientos en los que existía la posibilidad de tener tal tipo de descendientes. Al aplicar este filtro, de las 230 muestras iniciales quedaron solo 69 posibles descendientes, siendo estos 50 individuos de la familia 6 y 19 individuos de la familia 2.

El siguiente objetivo correspondía a confirmar las familias, sin embargo, debido a la existencia de individuos foráneos era necesario primero determinar qué individuos eran descendientes reales, usando la información de los dos SSR con herencia mendeliana comprobada y el marcador Me 15-16. El test de paternidad indicó que en el cruzamiento 2 no se recolectaron descendientes reales, mientras que en cruzamiento 6, de los 50 posibles hijos, 12 dieron



valores positivos de parentesco aunque solo con la hembra 6 (ver anexo 4). Estos resultados se respaldaron con los obtenidos mediante el test de parentesco (R_{XY}).

Como se detalló en la sección 3.2.1, las hembras se sacrificaron luego del desove, por lo que no era posible que volvieran a desovar y generaran otra progenie. Por esto podemos concluir que no se recolectó ningún individuo del cruzamiento. Los valores de paternidad positivos con la hembra se explican debido a que la progenitora de los descendientes posee un genotipo igual o muy similar con la hembra 6 en estos *loci* estudiados, pues con sólo tres marcadores es posible que ocurra esta coincidencia. Otros autores sugieren utilizar al menos cinco marcadores SSR para un análisis de paternidad confiable y sin ambigüedad (Jerry y Cols., 2004). Sin embargo, concluimos que para este tipo de cruzamientos en particular, debido al sacrificio posterior al desove, es suficiente el uso de tres marcadores, dado que al descartar a un progenitor se puede afirmar que los individuos no descienden de la pareja.

El análisis de paternidad se comparó con el test de parentesco (R_{XY}) y se observó que los resultados son coherentes entre sí. El valor promedio entregado para el cruzamiento 2 fue de -0,02, lo que indica que no existe relación entre los individuos. El cruzamiento 6 entregó un valor de parentesco promedio de 0,025. Sin embargo, presentan alta varianza, que da cuenta de una población donde existen individuos emparentados y no emparentados.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

Finalmente, se compararon los alelos de los dos marcadores del laboratorio (*Mch-UCH18* y *Mch-UCH104*) en los individuos que dieron valores altos de parentesco. Al desconocer a los verdaderos progenitores de los individuos, los resultados obtenidos no son significativos para validar los marcadores. Sin embargo, consideramos como un buen indicio para nuestros SSR que los alelos sean iguales entre individuos con valores de parentesco elevados (0,25 - 0,5), pues no descartan una posible relación de parentesco. Destacamos lo altamente polimórficos que son nuestros SSR, pues en los 69 individuos analizados el marcador *Mch-UCH104* presentó 11 alelos distintos, mientras que el *Mch-UCH18* 9 alelos (Anexo 4). Estos datos pueden ser usados como antecedente o referencia para futuros estudios del laboratorio.

Pese al error en la generación de las familias que impidió la recolección de descendientes, y por tanto imposibilitó que se generaran resultados definitivos, creemos que la estrategia experimental establecida y usada en este trabajo permite detectar problemas y rastrear su posible origen. Por este motivo recomendamos utilizar los mismos pasos en nuevos estudios en herencia mendeliana de mejillones. Se destaca particularmente la técnica HRM como método de determinación de especie en mejillones, puesto que permite un ahorro considerable de tiempo y materiales, en comparación con la técnica clásica de PCR-RFLP. Al utilizar la metodología HRM, sólo un 2,2% no dio un resultado concluyente de las 242 muestras analizadas. Estos resultados indican



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

que es una técnica confiable y altamente recomendable para estudios con gran número de individuos.

Es necesario ampliar las herramientas moleculares para el estudio de moluscos en general. Para el phylum Mollusca solo hay 580.192 secuencias nucleotídicas totales o parciales de ADN depositadas en NCBI, lo cual contrasta con las más 700.000 entradas para el género *salmo* (Lovatellí y Cols., 2008). El estudio de marcadores moleculares actualmente está enfocado en las especies que poseen importancia económica como son las ostras (*Crassostrea gigas* y *C. virginica*) o los mejillones de la especie *Mytilus* o *Perna* (*P. canalicula*) (Lovatellí y Cols., 2008). Al igual que este trabajo la mayoría de las herramientas desarrolladas apuntan principalmente a la asignación de paternidad, parentesco o procedencia, o identificación de la especie (Lovatellí y Cols., 2008; Ludwig y Cols., 2011; MacAvoy y Cols., 2008). Existen otras especies de mitílidos no reconocidos taxonómicamente, pero de importancia económica como es el caso de los mejillones de concha verde (*P. canaliculus*), para los cuales se están desarrollando microsatélites y antecedentes genéticos en general (Coelho y Cols., 2012; MacAvoy y Cols., 2008; Ong, 2007).

Es de importancia validar herramientas moleculares para el mejillón chileno para su aceptación taxonómica, su estudio y entendimiento genético, así como generar nuevas herramientas que permitan un rápido y eficiente proceso de trazabilidad.



VI CONCLUSIONES

- Se determinó que los individuos recolectados corresponden a individuos foráneos al cruzamiento.
- La proporción de individuos de especie *M. galloprovincialis* o híbridos del mismo recolectados no coincide con la proporción documentada para la zona, lo que podría implicar la aparición de una especie invasora.
- No se encontró ningún descendiente de los cruzamientos realizados entre los individuos recolectados. Sin embargo, los ejemplares mostraron en su mayoría un grado de parentesco entre sí.
- Se determinó que para este tipo de cruzamiento de mejillones, donde los parentales son sacrificados posterior al desove, tres marcadores son suficientes para realizar un análisis de paternidad confiable.
- Los alelos de los marcadores *Mch-UCH18* y *Mch-UCH104* son iguales en la mayoría de los individuos con índices parentesco elevado, lo cual no descarta la herencia mendeliana de los microsatélites.
- Finalmente, para evitar contaminaciones externas en los cruzamientos es recomendable que la etapa de crecimiento y engorda de los juveniles sea en estanques aislados con ambiente controlado.
- Los resultados obtenidos en su conjunto no nos permiten concluir si los microsatélites *Mch-UCH18* y *Mch-UCH104* se heredan en forma mendeliana en familias de *Mytilus chilensis*.



VII REFERENCIAS

- AMICHILE. (2010). Exportación de Moluscos Seleccionados (Exportación y Cultivo).
- Araneda C., Correa C., Lam N., Uribe E., Camiruaga M. & Iturra P. (2004). Asignación de paternidad-maternidad y parentesco en un plantel de avestruces (*Struthio camelus*), utilizando seis *loci* microsatélites polimórficos. Avances en Producción Animal 29.
- Araneda C., Noriega, X., Jilberto, F., Ruíz, J., Jara, C., Lafarga, F., & Larraín, M. A. (2015). Development of genome-wide microsatellite resources in a commercially important mussel species (*Mytilus chilensis*). Animal Genetics. (Aceptado para publicación).
- Awise J. C. (1994). Molecular Markers, Natural History, and Evolution, Chapman & Hall, New York.
- Beaumont, A., Gjedrem, T., & Moran, P. (2007). Blue mussel *Mytilus edulis*, Mediterranean mussel *M. galloprovincialis*. Genimpact Final Scientific Report, 62-69.
- Bossier, P. (1999). Authentication of seafood products by DNA patterns. Journal of Food Science, 64(2), 189-193.
- Breton, S., Burger, G., Stewart, D. T., & Blier, P. U. (2006). Comparative analysis of gender-associated complete mitochondrial genomes in marine mussels (*Mytilus* spp.). Genetics, 172(2), 1107-1119.
- Cáceres, J., & Figueras, A. (2007). Fijación de los juveniles del mejillón: fijación del mejillón. Biología y cultivo del mejillón, 71-93.
- Clasing, E., Oñate, A., & Arraigada, H. (1998). Cultivo de Choritos en Chile. Docentes Instituto de Biología Marina. “Dr. Jürgen Winter”. Ocean Sciences Centre-Mun. Programa CIDA/MUN/UACH/96. Valdivia–Chile.



- Codex.alimentarius. (2003). Código internacional de prácticas recomendado - Principios generales de higiene de los alimentos - CAC/RCP 1-1969, revision 4, vol. 18.
- Coelho, N. C., Zardi, G. I., Pearson, G. A., Serrão, E. A., & Nicastro, K. R. (2012). Characterization of ten highly polymorphic microsatellite *loci* for the intertidal mussel *Perna perna*, and cross species amplification within the genus. *BMC Research Notes*, 5(1), 558.
- Dakin, E. E., & Avise, J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity (Edinb)*, 93(5), 504-509.
- Dalvit, C., De Marchi, M., & Cassandro, M. (2007). Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Science*, 77(4), 437-449.
- Fernández, J., & Toro, M. (2006). A new method to estimate relatedness from molecular markers. *Molecular Ecology*, 15(6), 1657-1667.
- Fernández-Tajes, J., Longa, A., García-Gil, J., Chiu, Y. W., Huang, Y. S., Méndez, J., & Lee, R. S. (2011). Alternative PCR–RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification. *European Food Research and Technology*, 233(5), 791-796.
- Fernando, H., Kajenthini, T., Rebeira, S., Bamunuarachchige, T., & Wickramasinghe, H. (2015). Validation of molecular markers for the analysis of genetic diversity of amylase content and gel consistency among representative rice varieties in Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research*, 26(2), 317-328.
- Firestein, G. S. (2006). A biomarker by any other name. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, 2(12), 635-635.



- Gerard, K., Bierne, N., Borsa, P., Chenuil, A., & Feral, J. P. (2008). Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. mussels from Northern and Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations. *Molecular Phylogenetic Evolution*, 49(1), 84-91
- Hickman, C. P. R., & Larson, L. S. (2002). *Principios integrales de zoología* (No. 591 H628p).
- Hoeh, W. R., Blakley, K. H., & Brown, W. M. (1991). Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of *Mytilus* mitochondrial DNA. *Science*, 251(5000), 1488-1490.
- Inoue, K., Waite, J. H., Matsuoka, M., Odo, S., & Harayama, S. (1995). Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and *M. trossulus*. *The Biological Bulletin*, 189(3), 370-375.
- Jamieson, A., & Taylor, C. (1997). Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. *Animal Genetics*, 28(6), 397-400.
- Jerry, D. R., Preston, N. P., Crocos, P. J., Keys, S., Meadows, J. R., & Li, Y. (2004). Parentage determination of Kuruma shrimp *Penaeus* (*Marsupenaeus*) *japonicus* using microsatellite markers (Bate). *Aquaculture*, 235(1), 237-247.
- LaPointe, L. C., Pedersen, S. K., Dunne, R., Brown, G. S., Pimlott, L., Gaur, S. & Young, G. P. (2012). Discovery and validation of molecular biomarkers for colorectal adenomas and cancer with application to blood testing. *PLoS One*, 7(1), e29059.
- Larraín, M. A., Díaz, N. F., Lamas, C., Vargas, C., & Araneda, C. (2012). Genetic composition of *Mytilus* species in mussel populations from southern Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40, 1077-1084.



- Larraín, M. A., Díaz, N. F., Lamas, C., Uribe, C., & Araneda, C. (2014). Traceability of mussel (*Mytilus chilensis*) in southern Chile using microsatellite molecular markers and assignment algorithms. Exploratory survey. Food Research International, 62(0), 104-110.
- Lovatelli, A., Farias, A., & Uriarte, I. (2008). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura. factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO, 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile.
- Ludwig, S., Patella, R., Stoiev, S., Castilho-Westphal, G., Giroto, M. V. F., & Ostrensky, A. (2011). A molecular method to detect and identify the native species of southwestern Atlantic *Crassostrea* (Mollusca: Ostreidae). (Curitiba), 28, 420-426.
- Luis E. Eguiarte, Souza V. y Aguirre X. (2007). Ecología molecular. Capítulo 18. Primera edición. Insituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- MacAvoy, E. S., Wood, A. R., & Gardner, J. P. (2008). Development and evaluation of microsatellite markers for identification of individual Greenshell™ mussels (*Perna canaliculus*) in a selective breeding programme. Aquaculture, 274(1), 41-48.
- Manual de Acil R0551, New England Biolabs.(Ultima revision en 15 de Septiembre de 2015). <https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/C3DB1A1C04A24EDCB0BCA2D50C2067A7/Datacards%20or%20Manuals/R0551Ddatasheet-Lot0291208.pdf>
- Mesas, A., & Tarifeño, E. (2015). Temperaturas letales superiores para el mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), en la costa de Chile central. Latin American Journal of Aquatic Research, 43(3), 473-483.
- Millard, V. (1997). Classification of Mollusca: a classification of world wide Mollusca: V. Millard.



- Moctezuma, G. V., & Kahl, E. (2000). Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Ediciones Mundi-Prensa México, ISBN 968-7462-22-1. 60 p
- Ogden, R. (2008). Fisheries forensics: the use of DNA tools for improving compliance, traceability and enforcement in the fishing industry. *Fish and Fisheries*, 9(4), 462-472.
- Ong, L.C.C. (2007). Identification and Application of DNA Microsatellite Markers for the Genetic Characterisation of the Green-Lipped Mussel, *Perna viridis*. University Putra Malaysia.
- Ouagajjou, Y., Presa, P., Astorga, M., & Pérez, M. (2011). Microsatellites of *Mytilus chilensis*: A Genomic Print of Its Taxonomic Status within *Mytilus* sp. *Journal of Shellfish Research*, 30(2), 325-330.
- Pino-Querido, A., Álvarez-Castro, J. M., Vera, M., Pardo, B. G., Fuentes, J., & Martínez, P. (2015). A molecular tool for parentage analysis in the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Aquaculture Research*, 46(7), 1721-1735.
- Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8, 597-608.
- Santaclara, F. J., Espineira, M., Cabado, A. G., Aldasoro, A., Gonzalez-Lavin, N., & Vieites, J. M. (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(22), 8461-8470.
- Seguel, M. 2011. Evaluation of the taxonomic status of *Mytilus chilensis* using the mitochondrial gene cytochrome C oxidase subunit I (COI). XXXI Congreso de Ciencias del Mar, Viña del Mar, 220 pp.



- Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9(5), 615-629.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18(2), 233-234.
- Westfall, K., & Gardner, J. A. (2013). Interlineage *Mytilus galloprovincialis* Lmk. 1819 hybridization yields inconsistent genetic outcomes in the Southern hemisphere. *Biological Invasions*, 15(7), 1493-1506.
- 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(2), 535-544.
- Wood, A., Beaumont, A., Skibinski, D., & Turner, G. (2003). Analysis of a nuclear-DNA marker for species identification of adults and larvae in the *Mytilus edulis* complex. *Journal of Molluscan Studies*, 69(1), 61-66.
- Yu, H., & Li, Q. (2007). Development of EST-SSRs in the Mediterranean blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 1308-1310.



VII Anexos

Anexo I

Tabla 1.- Lista de las muestras utilizadas. Detalle de los individuos recuperados para cada cruzamiento. Se omite el cruzamiento 5 debido a que no se recuperaron ejemplares.

Cruzamiento 1	Cruzamiento 2	Cruzamiento 3	Cruzamiento 4	Cruzamiento 6
X1-1	X2-1	X3-1	X4-1	X6-1
X1-2	X2-2	X3-2	X4-2	X6-2
X1-3	X2-3	X3-3	X4-3	X6-3
X1-4	X2-4	X3-4	X4-4	X6-4
X1-5	X2-5	X3-5	X4-5	X6-5
X1-6	X2-6	X3-6	X4-6	X6-6
X1-7	X2-7	X3-7	X4-7	X6-7
X1-8	X2-8	X3-8	X4-8	X6-8
X1-9	X2-9	X3-9	X4-9	X6-9
X1-10	X2-10	X3-10	X4-10	X6-10
X1-11	X2-11	X3-11	X4-11	X6-11
X1-12	X2-12	X3-12	X4-12	X6-12
X1-13	X2-13	X3-13	X4-13	X6-13
X1-14	X2-14	X3-14	X4-14	X6-14
X1-15	X2-15	X3-15	X4-15	X6-15
X1-16	X2-16	X3-16	X4-16	X6-16
X1-17	X2-17	X3-17	X4-17	X6-17
X1-18	X2-18	X3-18	X4-18	X6-18
X1-19	X2-19	X3-19	X4-19	X6-19
X1-20	X2-20	X3-20	X4-20	X6-20
X1-21	X2-21	X3-21	X4-21	X6-21
X1-22	X2-22	X3-22	X4-22	X6-22
X1-23	X2-23	X3-23	X4-23	X6-23
X1-24	X2-24	X3-24	X4-24	X6-24
X1-25	X2-25	X3-25	X4-25	X6-25
X1-26	X2-26	X3-26	X4-26	X6-26
X1-27	X2-27	X3-27	X4-27	X6-27
X1-28	X2-28	X3-28	X4-28	X6-28
X1-29	X2-29	X3-29	X4-29	X6-29
X1-30	X2-30	X3-30	X4-30	X6-30
X1-31	X2-31		X4-31	X6-31
X1-32	X2-32		X4-32	X6-32
X1-33	X2-33		X4-33	X6-33
X1-34	X2-34		X4-34	X6-34
X1-35	X2-35		X4-35	X6-35
X1-36	X2-36		X4-36	X6-36
X1-37	X2-37		X4-37	X6-37
X1-38	X2-38		X4-38	X6-38
X1-39	X2-39		X4-39	X6-39
X1-40	X2-40		X4-40	X6-40
X1-41	X2-41		X4-41	X6-41
X1-42	X2-42		X4-42	X6-42
X1-43	X2-43		X4-43	X6-43
X1-44	X2-44		X4-44	X6-44
X1-45	X2-45		X4-45	X6-45
X1-46	X2-46		X4-46	X6-46
X1-47	X2-47		X4-47	X6-47
X1-48	X2-48		X4-48	X6-48
X1-49	X2-49		X4-49	X6-49
X1-50	X2-50		X4-50	X6-50



Anexo II

Tabla 2.- Pureza obtenida en la extracción de las muestras de los 6 cruzamientos.

Muestra	260/280								
X1-1	1,92	X2-1	1,9	X3-1	2,01	X4-1	1,93	X6-1	2,01
X1-2	1,92	X2-2	1,88	X3-2	2,02	X4-2	1,94	X6-2	1,99
X1-3	1,91	X2-3	1,91	X3-3	2,01	X4-3	1,98	X6-3	1,99
X1-4	1,97	X2-4	1,94	X3-4	2	X4-4	1,95	X6-4	1,97
X1-5	2,01	X2-5	1,94	X3-5	1,98	X4-5	1,97	X6-5	1,98
X1-6	1,95	X2-6	1,87	X3-6	1,98	X4-6	1,98	X6-6	1,97
X1-7	1,95	X2-7	1,87	X3-7	2,01	X4-7	1,89	X6-7	2
X1-8	1,95	X2-8	1,9	X3-8	1,98	X4-8	1,98	X6-8	1,98
X1-9	1,93	X2-9	1,86	X3-9	2,03	X4-9	1,93	X6-9	1,95
X1-10	1,99	X2-10	1,89	X3-10	2,02	X4-10	1,96	X6-10	1,96
X1-11	1,93	X2-11	1,89	X3-11	2,01	X4-11	1,98	X6-11	1,98
X1-12	1,95	X2-12	1,9	X3-12	2,02	X4-12	1,92	X6-12	1,97
X1-13	2,02	X2-13	1,87	X3-13	2,01	X4-13	1,95	X6-13	2,01
X1-14	1,91	X2-14	1,91	X3-14	2,03	X4-14	1,95	X6-14	1,96
X1-15	1,98	X2-15	1,89	X3-15	2,01	X4-15	2,03	X6-15	1,97
X1-16	1,92	X2-16	1,86	X3-16	2,05	X4-16	1,92	X6-16	2
X1-17	1,91	X2-17	1,86	X3-17	2	X4-17	1,94	X6-17	1,99
X1-18	1,95	X2-18	1,89	X3-18	2	X4-18	1,92	X6-18	1,96
X1-19	1,91	X2-19	1,86	X3-19	1,94	X4-19	1,89	X6-19	1,95
X1-20	1,9	X2-20	1,9	X3-20	2,01	X4-20	1,9	X6-20	1,97
X1-21	1,93	X2-21	1,87	X3-21	2,01	X4-20	1,9	X6-21	1,99
X1-22	1,9	X2-22	1,87	X3-22	2,02	X4-22	1,88	X6-22	1,97
X1-23	1,91	X2-23	1,89	X3-23	2,01	X4-23	1,88	X6-23	1,96
X1-24	1,88	X2-24	1,86	X3-24	1,97	X4-24	1,95	X6-24	1,96
X1-25	1,91	X2-25	1,87	X3-25	1,98	X4-25	1,91	X6-25	1,98
X1-26	1,96	X2-26	1,95	X3-26	2	X4-26	1,89	X6-26	1,98
X1-27	1,92	X2-27	1,9	X3-27	2,03	X4-27	1,89	X6-27	1,99
X1-28	1,88	X2-28	1,88	X3-28	2,03	X4-28	1,91	X6-28	1,95
X1-29	1,92	X2-29	1,84	X3-29	2	X4-29	1,89	X6-29	2,02
X1-30	1,94	X2-30	1,87	X3-30	2	X4-30	1,92	X6-30	1,98
X1-31	1,93	X2-31	1,89			X4-31	1,93	X6-31	1,99
X1-32	1,9	X2-32	1,88			X4-32	1,92	X6-32	2,03
X1-33	1,9	X2-33	1,8			X4-33	1,89	X6-33	2,05
X1-34	1,92	X2-34	1,85			X4-34	1,93	X6-34	2,02
X1-35	1,98	X2-35	1,88			X4-35	1,95	X6-35	1,97
X1-36	1,97	X2-36	1,93			X4-36	1,97	X6-36	1,97
X1-37	1,96	X2-37	1,89			X4-37	1,91	X6-37	1,95
X1-38	1,95	X2-38	1,93			X4-38	1,89	X6-38	1,95
X1-39	1,92	X2-39	1,88			X4-39	1,91	X6-39	1,9
X1-40	1,91	X2-40	1,9			X4-40	1,9	X6-40	1,94
X1-41	1,99	X2-41	1,91			X4-41	1,92	X6-41	1,95
X1-42	1,98	X2-42	1,9			X4-42	1,89	X6-42	1,93
X1-43	1,96	X2-43	1,88			X4-43	1,91	X6-43	1,96
X1-44	1,91	X2-44	1,89			X4-44	1,91	X6-44	1,92
X1-45	1,94	X2-45	1,89			X4-45	1,89	X6-45	1,95
X1-46	1,92	X2-46	1,89			X4-46	1,86	X6-46	1,93
X1-47	1,88	X2-47	1,88			X4-47	1,93	X6-47	1,98
X1-48	1,89	X2-48	1,86			X4-47	1,9	X6-48	1,96
X1-49	1,89	X2-49	1,87			X4-49	1,94	X6-49	1,93
X1-50	1,89	X2-50	1,87			X4-50	1,9	X6-50	1,95



Anexo III

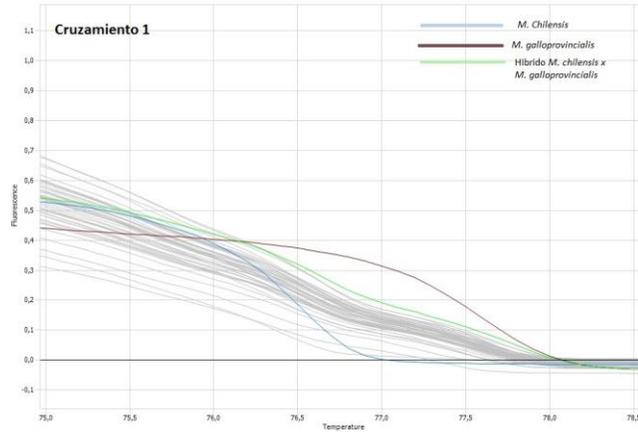


Figura A.- Curvas de *melting* obtenidas para la familia 1. En color azul se muestra el control *M. chilensis*, en marrón el control *M. galloprovincialis*, en verde el híbrido entre ambas especies y en color gris las curvas de las muestras. Como se observa, todos los individuos presentaron una curva similar al control híbrido.

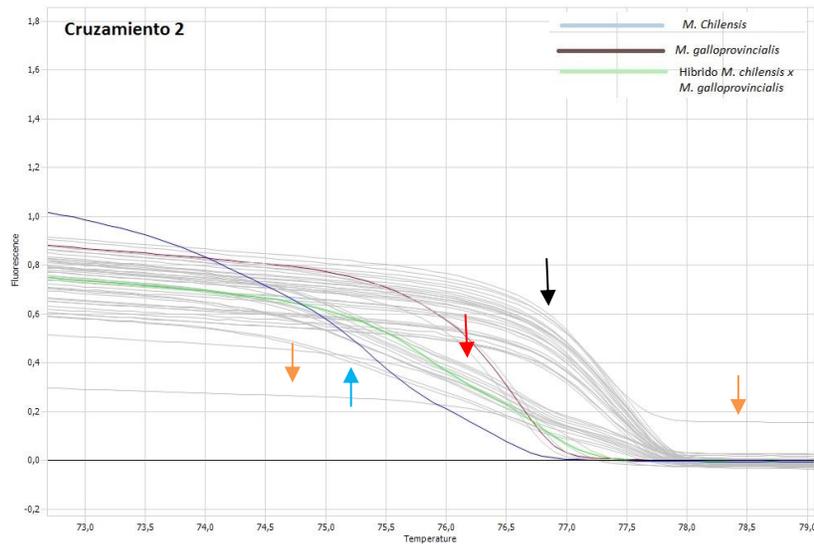


Figura B.- Curvas de *melting* obtenidas para la familia 2. En color azul se muestra el control *M. chilensis*, en marrón el control *M. galloprovincialis*, en verde el híbrido entre ambas especies y en color gris las curvas de las muestras. Se indica con la flecha negra que la mayoría de los individuos presentan una curva similar a la marrón correspondiente a *M. galloprovincialis*, con flecha roja se indica otro grupo de individuos con curva similar al control verde (híbrido), la flecha azul muestra los individuos similares al control *M. chilensis* y las flechas naranjas indican a los individuos no concluyentes.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

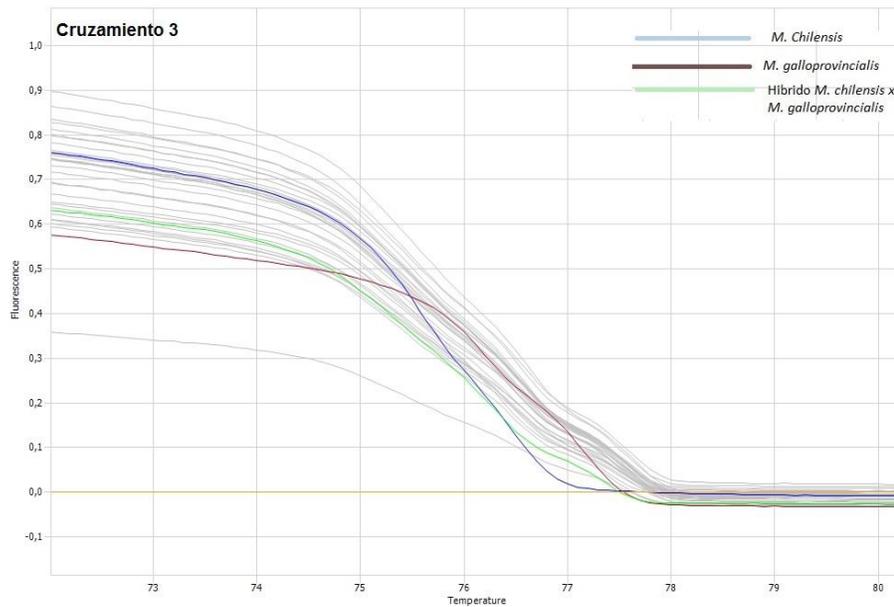


Figura C.- Curvas de *melting* obtenidas para la familia 3. En color azul se muestra el control *M. chilensis*, en marrón el control *M. galloprovincialis*, en verde el híbrido entre ambas especies y en color gris las curvas de las muestras. Todos los descendientes presentaron una curva similar al control híbrido.

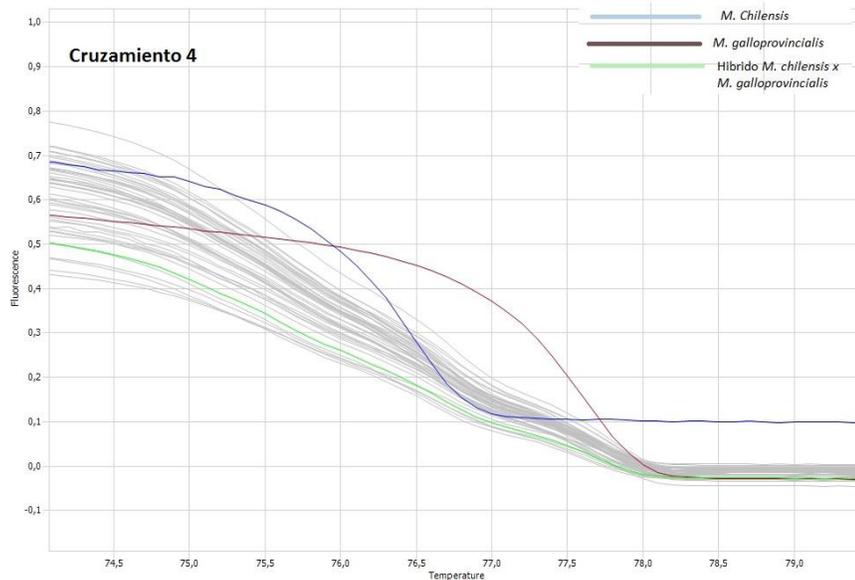


Figura D.- Curvas de *melting* obtenidas para la familia 4. En color azul se muestra el control *M. chilensis*, en marrón el control *M. galloprovincialis*, en verde el híbrido entre ambas especies y en color gris las curvas de las muestras. Todos los descendientes presentaron una curva similar al control híbrido.



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

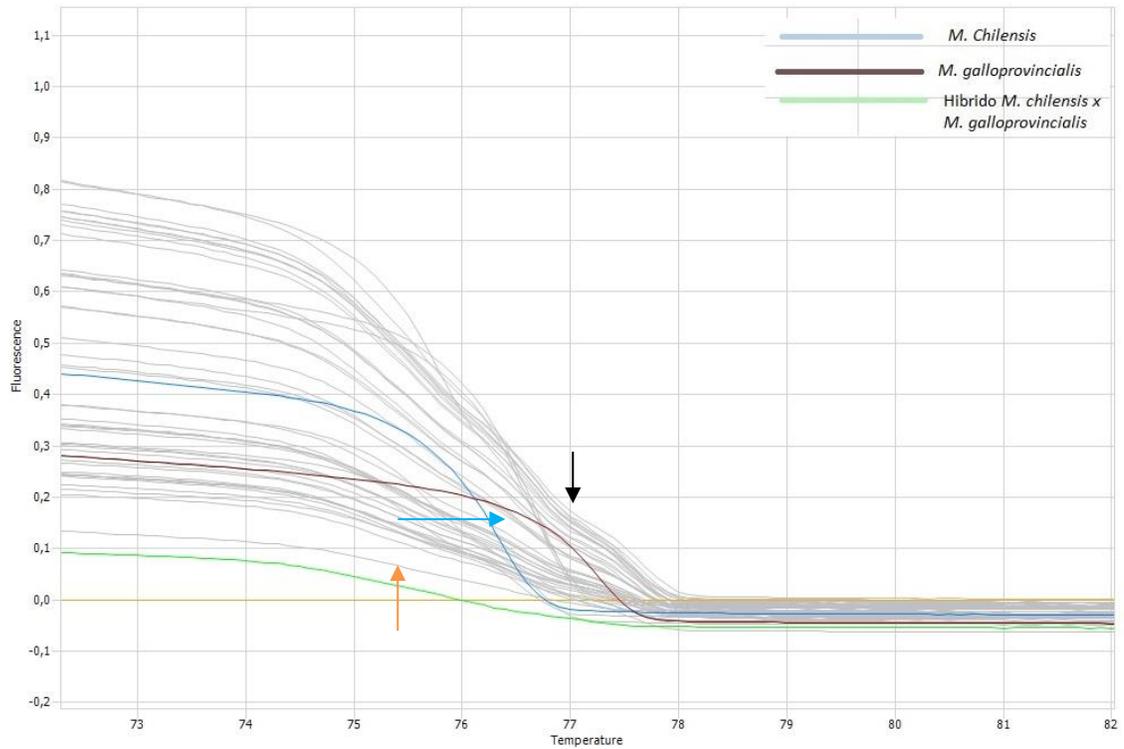


Figura E.- Curvas de *melting* obtenidas para la familia 6. En color azul se muestra el control *M. chilensis*, en marrón el control *M. galloprovincialis*, en verde el híbrido entre ambas especies y en color gris las curvas de las muestras. La flecha negra indica que la mayoría de los individuos presentan una curva similar al control verde (híbrido), la flecha azul muestra los individuos similares al control *M. chilensis* y en naranja a los individuos no concluyentes.



Anexo 4

Tabla 3.- Identificación de especie obtenida para los individuos de cada cruzamiento.

Cruzamiento 1		Cruzamiento 2		Cruzamiento 3		Cruzamiento 4		Cruzamiento 6	
Muestras	Especie								
X1-1	Hib	X2-1	Gal	X3-1	Hib	X4-1	Hib	X6-1	Hib
X1-2	Hib	X2-2	Gal	X3-2	Hib	X4-2	Hib	X6-2	Hib
X1-3	Hib	X2-3	Hib	X3-3	Hib	X4-3	Hib	X6-3	Hib
X1-4	Hib	X2-4	Hib	X3-4	Hib	X4-4	Hib	X6-4	Hib
X1-5	Hib	X2-5	Gal	X3-5	Hib	X4-5	Hib	X6-5	Hib
X1-6	Hib	X2-6	Gal	X3-6	Hib	X4-6	Hib	X6-6	Mch
X1-7	Hib	X2-7	Gal	X3-7	Hib	X4-7	Hib	X6-7	Mch
X1-8	Hib	X2-8	Hib	X3-8	Hib	X4-8	Hib	X6-8	Hib
X1-9	Hib	X2-9	Gal	X3-9	Hib	X4-9	Hib	X6-9	Hib
X1-10	Hib	X2-10	Hib	X3-10	Hib	X4-10	Hib	X6-10	Hib
X1-11	Hib	X2-11	Hib	X3-11	Hib	X4-11	Hib	X6-11	Hib
X1-12	Hib	X2-12	Mch	X3-12	Hib	X4-12	Hib	X6-12	Mch
X1-13	Hib	X2-13	Hib	X3-13	Hib	X4-13	Hib	X6-13	Hib
X1-14	Hib	X2-14	Hib	X3-14	Hib	X4-14	Hib	X6-14	Hib
X1-15	Hib	X2-15	Gal	X3-15	Hib	X4-15	Hib	X6-15	Hib
X1-16	Hib	X2-16	Gal	X3-16	Hib	X4-16	Hib	X6-16	Hib
X1-17	Hib	X2-17	Hib	X3-17	Hib	X4-17	Hib	X6-17	Hib
X1-18	Hib	X2-18	Gal	X3-18	Hib	X4-18	Hib	X6-18	Hib
X1-19	Hib	X2-19	Hib	X3-19	Hib	X4-19	Hib	X6-19	Hib
X1-20	Hib	X2-20	Gal	X3-20	Hib	X4-20	Hib	X6-20	Hib
X1-21	Hib	X2-21	Gal	X3-21	Hib	X4-21	Hib	X6-21	Hib
X1-22	Hib	X2-22	Hib	X3-22	Hib	X4-22	Hib	X6-22	Hib
X1-23	Hib	X2-23	Gal	X3-23	Hib	X4-23	Hib	X6-23	Hib
X1-24	Hib	X2-24	Gal	X3-24	Hib	X4-24	Hib	X6-24	Hib
X1-25	Hib	X2-25	Gal	X3-25	Hib	X4-25	Hib	X6-25	Hib
X1-26	Hib	X2-26	Hib	X3-26	Hib	X4-26	Hib	X6-26	Mch
X1-27	Hib	X2-27	Gal	X3-27	Hib	X4-27	Hib	X6-27	Hib
X1-28	Hib	X2-28	Gal	X3-28	Hib	X4-28	Hib	X6-28	Hib
X1-29	Hib	X2-29	Gal	X3-29	Hib	X4-29	Hib	X6-29	Hib
X1-30	Hib	X2-30	Hib	X3-30	Hib	X4-30	Hib	X6-30	Hib
X1-31	Hib	X2-31	Gal			X4-31	Hib	X6-31	Hib
X1-32	Hib	X2-32	Gal			X4-32	Hib	X6-32	Hib
X1-33	Hib	X2-33	Gal			X4-33	Hib	X6-33	Hib
X1-34	Hib	X2-34	Mch			X4-34	Hib	X6-34	Hib
X1-35	Hib	X2-35	Gal			X4-35	Hib	X6-35	Hib
X1-36	Hib	X2-36	Gal			X4-36	Hib	X6-36	Hib
X1-37	Hib	X2-37	Gal			X4-37	Hib	X6-37	Hib
X1-38	Hib	X2-38	Gal			X4-38	Hib	X6-38	Hib
X1-39	Hib	X2-39	Gal			X4-39	Hib	X6-39	Hib
X1-40	Hib	X2-40	Hib			X4-40	Hib	X6-40	Hib
X1-41	Hib	X2-41	Gal			X4-41	Hib	X6-41	Hib
X1-42	Hib	X2-42	Gal			X4-42	Hib	X6-42	Mch
X1-43	Hib	X2-43	Gal			X4-43	Hib	X6-43	Mch
X1-44	Hib	X2-44	Gal			X4-44	Hib	X6-44	Hib
X1-45	Hib	X2-45	Mch			X4-45	Hib	X6-45	Hib
X1-46	Hib	X2-46	Gal			X4-46	Hib	X6-46	Hib
X1-47	Hib	X2-47	Gal			X4-47	Hib	X6-47	Hib
X1-48	Hib	X2-48	Hib			X4-48	Hib	X6-48	Hib
X1-49	Hib	X2-49	Hib			X4-49	Hib	X6-49	Hib
X1-50	Hib	X2-50	Hib			X4-50	Hib	X6-50	Hib

Mch	<i>M. chilensis</i>
Gal	<i>M. galloprovincialis</i>
Hib	Híbrido



Anexo 5

Tabla 4.- Alelos encontrados para cada ejemplar analizado con 5 marcadores.

	MGE005	MGE005	MT203	MT203	Mch-UCH104	Mch-UCH104	Mch-UCH18	Mch-UCH18	Me1516	Me1516
X2-3	147	153	193	203	248	248	142	151	58	126
X2-4	147	153	201	203	246	246	151	151	58	126
X2-8	147	156	199	203	244	246	142	151	58	126
X2-10	147	153	191	191	240	244	142	151	58	126
X2-11	129	150	193	197	198	198	124	148	58	126
X2-12	144	156	191	207	230	232	142	151	58	126
X2-13	150	153	201	203	246	246	148	151	58	126
X2-14	150	153	201	203	244	244	148	151	58	126
X2-17	147	153	201	203	244	246	142	151	58	126
X2-19	150	153	201	203	244	246	106	106	58	126
X2-22	150	153	201	203	244	246	148	151	58	126
X2-26	147	153	191	203	246	246	151	151	58	126
X2-30	150	153	197	199	228	246	148	151	58	126
X2-34	153	153	201	203	202	246	151	193	58	126
X2-40	147	153	197	199	198	198	142	151	58	126
X2-45	147	153	233	235	234	234	151	151	58	126
X2-48	150	153	201	203	246	246	148	151	58	126
X2-49	150	153	201	203	202	202	148	151	58	126
X2-50	150	153	201	203	0	0	148	151	58	126
X6-1	150	153	191	191	246	246	148	151	58	126
X6-2	150	153	0	0	246	246	148	151	58	126
X6-3	147	153	211	213	246	246	142	151	58	126
X6-4	147	153	201	203	246	246	151	151	58	126
X6-5	150	153	191	191	244	246	148	151	58	126
X6-6	153	156	211	213	0	0	151	193	126	126
X6-7	153	156	193	213	244	246	151	154	126	126
X6-8	150	153	211	213	212	212	148	151	58	126
X6-9	150	153	191	203	244	246	0	0	58	126
X6-10	147	153	201	203	202	202	151	184	58	126
X6-11	147	153	191	191	246	246	142	151	58	126
X6-12	150	153	191	191	244	246	148	151	126	126
X6-13	150	153	191	191	244	246	148	151	58	126
X6-14	150	153	191	191	244	246	148	151	58	126
X6-15	144	153	191	203	246	246	151	190	58	126
X6-16	147	153	193	213	244	246	151	151	58	126
X6-17	147	153	201	203	244	254	142	151	58	126
X6-18	150	153	193	203	244	254	151	151	58	126
X6-19	147	153	201	203	232	246	190	193	58	126
X6-20	0	0	0	0					58	126
X6-21	150	153	191	203	244	246	148	151	58	126
X6-22	147	153	193	213	244	246	151	193	58	126
X6-23	150	153	201	203	244	246	148	151	58	126
X6-24	150	153	209	213	234	246	148	151	58	126
X6-25	147	153	197	215	232	246	142	151	58	126
X6-26	150	153	199	203	244	246	190	190	126	126
X6-27	147	147	201	203	244	246	142	151	58	126
X6-28	150	153	201	203	244	246	148	151	58	126
X6-29	147	153	201	203	244	246	151	151	58	126



“Validación de marcadores moleculares para el análisis genético de *Mytilus chilensis*”

	MGE005	MGE005	MT203	MT203	Mch-UCH104	Mch-UCH104	Mch-UCH18	Mch-UCH18	Me1516	Me1516
X6-30	144	153	201	203	232	246	151	151	58	126
X6-31	144	153	201	203	232	246	151	202	58	126
X6-32	141	153	203	213	246	246	139	154	58	126
X6-33	147	153	213	215	232	246	151	193	58	126
X6-34	150	153	191	203	246	246	181	190	58	126
X6-35	144	153	191	193	232	244	151	151	58	126
X6-36	144	153	201	203	234	246	151	151	58	126
X6-37	150	153	201	203	244	246	148	151	58	126
X6-38	144	153	201	203	246	246	151	151	58	126
X6-39	144	153	201	203	246	246	151	151	58	126
X6-40	150	153	201	203	202	202	148	151	58	126
X6-41	147	153	191	193	232	244	142	151	58	126
X6-42	150	153	0	0	244	246	148	151	126	126
X6-43	141	153	197	213	244	244	139	151	126	126
X6-44	147	153	201	103	244	246	151	151	58	126
X6-45	150	153	201	203	246	246	151	190	58	126
X6-46	147	153	203	203	234	246	151	193	58	126
X6-47	150	153	0	0	246	246	148	151	58	126
X6-48	147	153	193	203	202	202	142	151	58	126
X6-49	147	153	193	203	244	246	142	151	58	126
X6-50	147	153	197	215	214	232	142	151	58	126