

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS  
ESCUELA DE PREGRADO**

**Memoria de Título**

**ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Mytilus chilensis* EN  
DISTINTOS CENTROS DE CAPTACIÓN DE SEMILLAS Y BANCOS NATURALES,  
Y EN UNA POBLACION DE *Mytilus galloprovincialis* UTILIZANDO MARCADORES  
MICROSATÉLITES**

**ESTIMATES OF GENETIC DIVERSITY IN DIFFERENT *Mytilus chilensis* SEED  
COLLECTION CENTERS AND NATURAL BANKS, AND A POPULATION OF  
*Mytilus galloprovincialis* USING MICROSATELLITE MARKERS**

**CARMEN JULIA LAMAS APABLAZA**

**Santiago, Chile  
2015**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS  
ESCUELA DE PREGRADO**

**Título**

**ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Mytilus chilensis* EN  
DISTINTOS CENTROS DE CAPTACIÓN DE SEMILLAS Y BANCOS NATURALES,  
Y EN UNA POBLACION DE *Mytilus galloprovincialis* UTILIZANDO MARCADORES  
MICROSATÉLITES**

Memoria para optar al título profesional de:  
Ingeniero agrónomo

Mención: Producción animal

**CARMEN JULIA LAMAS APABLAZA**

	Calificaciones
Profesor Guía Cristian Araneda T. Licenciado en Ciencias Biológicas, Mg. Sc. Dr.	6.5
Profesores Evaluadores Nelson Díaz P. Profesor de Estado en Biología y Ciencias, Dr.	6.0
Marcos Mora G. Ingeniero Agrónomo, Dr.	7.0

**Santiago, Chile  
2015**

## INDICE

<b>INDICE</b> .....	i
<b>RESUMEN</b> .....	iv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	6
Hipótesis de trabajo .....	6
Objetivos General y Específicos .....	6
Objetivo General.....	6
Objetivos Específicos .....	6
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	8
Lugar del estudio .....	8
Materiales .....	8
Metodología.....	9
Extracción de ADN.....	9
Evaluación de la calidad de ADN.....	9
Identificación de género y especie.....	9
Marcadores microsatélites .....	13
Tamaño de los fragmentos amplificados y genotipado .....	15
Análisis Estadístico .....	16
Desequilibrio de ligamiento.....	16
Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas.....	16
Estimación de la diversidad genética y parentesco.....	16
Parentesco genético.....	18
Estructura poblacional .....	18
Diferenciación genética .....	18

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	20
Extracción y evaluación de calidad de ADN.....	20
Identificación del género y especie .....	20
Tamaño de los fragmentos amplificados y genotipado .....	22
Desequilibrio de ligamiento .....	24
Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas .....	24
Estimación de la diversidad genética y parentesco .....	25
Estructura poblacional.....	30
Diferenciación genética.....	31
<b>CONCLUSIONES</b> .....	34
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	35
<b>ANEXOS</b> .....	46
Anexo I. Protocolo para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados.....	46
Preparación del molde para gel de poliacrilamida.....	46
Preparación de la solución de poliacrilamida .....	46
Montaje del gel en la cámara .....	47
Anexo II. Tinción del gel.....	47
<b>APÉNDICES</b> .....	48
Apéndice 1. Protocolo de Extracción de ADN modificado de Taggart <i>et al.</i> (1992)..	48
Materiales y reactivos. ....	48
Apéndice 2. Genotipos de <i>Mytilus chilensis</i> . ....	50
Apéndice 3. Genotipos de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	58
Apéndice 4. Desequilibrio de ligamiento entre pares de loci para todas las poblaciones y corrección secuencial de Bonferroni. Número de test (K): 10, $\alpha$ : 0.05, $\alpha/K$ : 0.005..	60
Apéndice 5. Desequilibrio de ligamiento entre pares de loci dentro de cada población y corrección secuencial de Bonferroni. Número de test (K): 60, $\alpha$ : 0.05, $\alpha/K$ : 0.00083.	61

Apéndice 6. Frecuencias alélicas para cinco loci microsatélite en cinco localidades de *Mytilus chilensis* y una localidad de *Mytilus galloprovincialis*. ..... 63

**“ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN *Mytilus chilensis* EN  
DISTINTOS CENTROS DE CAPTACIÓN DE SEMILLAS Y BANCOS NATURALES,  
Y EN UNA POBLACION DE *Mytilus galloprovincialis* UTILIZANDO MARCADORES  
MICROSATÉLITES”**

**RESUMEN**

El mejillón chileno o “chorito” *Mytilus chilensis* (Hupe, 1854) es una especie de importancia comercial que se distribuye desde Arauco ( $37^{\circ} 14' 44.8''$  S;  $73^{\circ} 18' 59.99''$  W) a Punta Arenas ( $53^{\circ} 09' 16.12''$  S;  $70^{\circ} 54' 59.31''$  W). A pesar de que es uno de los recursos más prometedores en acuicultura, la información sobre su diversidad genética y estructura de los stocks disponibles es limitada. La diversidad genética en este estudio fue estimada usando cinco loci microsatélites en cuatro localidades de la región de Los Lagos y una localidad en la región de Magallanes y la Antártica Chilena, junto con una muestra comercial de referencia de *Mytilus galloprovincialis* obtenida en Galicia, España. Previamente fue identificado género y especie de las muestras analizadas, mediante los marcadores *MusRFLP* y *Me 15-16 RFLP* respectivamente. Se obtuvo en la identificación de especie, junto a individuos *Mytilus chilensis*, posibles individuos híbridos de *Mytilus chilensis* x *Mytilus trossulus* y *Mytilus chilensis* x *Mytilus galloprovincialis*, lo que podría demostrar la presencia de más de un taxón en las costas del país. En relación con la estructura poblacional el Análisis factorial de correspondencia (AFC) muestra la localidad Galicia (GA) separada del resto de las localidades, corroborando que estas muestras pertenecen a una población que tiene un acervo genético distinto a las localidades Chilenas. El valor de  $F_{ST}$  global fue de 0,075 (7,5% de variación inter poblacional) indicando la baja diferenciación genética que hay en la zona bajo estudio en el Sur de Chile, pero significativamente distinta de cero sugiriendo que existe una estructura genética detectable.

**“ESTIMATES OF GENETIC DIVERSITY IN DIFFERENT *Mytilus chilensis* SEED COLLECTION CENTERS AND NATURAL BANKS, AND A POPULATION OF *Mytilus galloprovincialis* USING MICROSATELLITE MARKERS”**

**SUMMARY**

The Chilean blue mussel or “chorito” *Mytilus chilensis* (Hupe, 1854) is a commercial importance specie that is distributed from Arauco (37° 14' 44.8" S; 73° 18' 59.99" W) to Punta Arenas (53° 09' 16.12" S; 70° 54' 59.31" W). Although it is one of the most promising resources for aquaculture the information about their genetic diversity and population structure of stocks is limited. Genetic diversity in this study was estimated using five microsatellite loci in four locations in the region of Los Lagos and one locality in the region of Magallanes y Antártica chilena along with a commercial reference sample of *Mytilus galloprovincialis* obtained from Galicia, Spain. It was previously identified genus and species of the samples analyzed by the MusRFLP and ME 15 – ME 16 RFLP markers, respectively. In the identification of species along with individuals *Mytilus chilensis*, we detected possible hybrid individuals of *Mytilus chilensis* x *Mytilus trossulus* and *Mytilus chilensis* x *Mytilus galloprovincialis*, which is a strong evidence of the presence of more than one taxon on the Chilean coast. For population structure the Correspondency Factorial Analysis (CFA) shows the location Galicia (GA) separately from other Chilean locations, confirming that these samples belong to a population with a very different gene pool from Chilean locations. The overall  $F_{ST}$  value was 0.075 (7.5% of inter population variation) indicating low genetic differentiation is in the area under study in southern Chile, but significantly different from zero suggesting a detectable genetic structure.

## INTRODUCCIÓN

*Mytilus chilensis*, el mejillón chileno, cuyo nombre común es “chorito”, “daye” o “quilmahue”, es el molusco que ha experimentado la más fuerte explotación e incremento en su cultivo en el país, llegando Chile a ser el cuarto productor mundial de mejillones después de China, Tailandia y España. La demanda global por *Mytilus chilensis* es creciente, la producción de algunos países líderes se acerca a su máxima capacidad y Chile aún tiene espacio para crecer. Se estima que esta industria podría alcanzar el segundo puesto en producción a nivel mundial (Toledo, 2008). Según González (2005) el crecimiento promedio hasta el año 2010 sería de un 30%, lo que se traduciría en exportaciones por más de US\$ 100 millones. Exportaciones que el año 2010 llegaron efectivamente a los US\$106.819 millones con 47.734 toneladas exportadas y con una variación positiva del 13,2% (SUBPESCA, 2010). El último informe sectorial de SUBPESCA de diciembre de 2014 registra un nivel total cosechado de moluscos de 231.400 toneladas, esto es un 7,4% menor para la misma fecha de 2013. De esta cifra, 224.600 toneladas corresponden a las cosechas de “chorito chileno”, cifra 7,5% menor a la registrada en noviembre de 2013. El 100% de las cosechas fueron realizadas en la región de los Lagos. Las exportaciones valoradas en dólares de “chorito chileno” a octubre 2013-2014 se incrementaron en un 3,5%. De modo que *Mytilus chilensis*, según los niveles de producción actuales y proyectados se está perfilando como un recurso de gran impacto económico, es por esto que se requieren urgentemente, mayores estudios en impacto ambiental, comportamiento y deriva larvaria, así como la selección de familias con características apropiadas incorporando la mejora genética para surtir la demanda de los mercados nacional e internacional (Uriarte, 2008).

Debido a su intensa explotación, esta especie presenta veda temporal, siendo su talla mínima de captura de 5 cm de longitud, según D.S. N° 47 del 14 de Marzo de 1984 (SUBPESCA, 2012). Esta medida tiene como consecuencia el aumento del valor comercial, constituyendo un estímulo para aumentar la producción de choritos, mediante su cultivo. Otra razón que incentiva el cultivo de esta especie es su rápido crecimiento en sistemas suspendidos, alcanzando los 5 cm de longitud entre los 15 a 18 meses de edad, comparados con los 4 a 5 años que necesita para alcanzar dicho tamaño en bancos naturales (Clasing *et al.*, 1998). Aunque la recolección de juveniles en las poblaciones naturales es y seguirá siendo importante, los stocks naturales se están recolectando en, o cerca de los niveles máximos sostenibles, por lo que cualquier incremento productivo importante tendría que venir de la acuicultura. De hecho, la meta de muchas actividades de cultivo de bivalvos es restaurar las poblaciones naturales a los niveles anteriores a la sobreexplotación (Helm, 2006).

El género *Mytilus* es considerado un complejo formado por varias especies, que son capaces de formar zonas de hibridación (Inoue *et al.*, 1997, Hilbish *et al.*, 2002, Bierne *et al.*, 2003, Toro *et al.*, 2004a). En el Hemisferio Norte se definieron tres taxa, *Mytilus edulis*,

*Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus trossulus* (Hilbish *et al.*, 2000, Gerard *et al.*, 2008, Westfall y Gardner, 2010), pero en el Hemisferio Sur su clasificación taxonómica aún no es clara (Gerard *et al.*, 2008, Westfall y Gardner, 2010). El género *Mytilus* corresponde a moluscos marinos sésiles (conocidos como mejillones), morfológicamente tienen dos valvas alargadas, con el extremo anterior más aguzado, al interior de ambas valvas, se encuentra el cuerpo que es blando y está cubierto por el manto que corresponde a un tejido secretado por las conchas y envuelve los órganos internos (Pacheco y Olave, 2000). En *M. chilensis* el borde dorsal es anguloso y el borde ventral es casi recto, externamente las valvas tienen estrías concéntricas de crecimiento y están recubiertas de un periostraco, liso, pardo negruzco a violáceo (Osorio, 2002; Plaza *et al.*, 2005). Interiormente la charnela tiene 3 a 4 dientecillos sublinguales. Su interior es blanco con el borde nacarado azul plateado (Osorio, 2002). Actualmente hay consenso de que la distribución geográfica de *Mytilus chilensis* en el país es desde Arauco (37° 14' 44.8" S; 73° 18' 59.99" W) a Punta Arenas (53° 09' 16.12" S; 70° 54' 59.31" W). El "chorito" se encuentra formando densos bancos; desde el punto de vista batimétrico se sitúa habitando zonas rocosas intermareales hasta los 25 metros de profundidad (Osorio, 2002). Presenta gran resistencia a cambios de temperatura, oxígeno y salinidad, las poblaciones naturales del Sur de Chile en el intermareal pueden verse expuestas a temperaturas atmosféricas sobre 30°C en verano y bajo 0°C en invierno (Clasing *et al.*, 1998). Se alimentan filtrando plancton y detritus (Clasing *et al.*, 1998; Osorio, 2002). Sus depredadores son el "loco", "caracol rubio", "estrellas de mar", "jaibas", "centollas", "pato quetru" (*Tachyeres pteneres* y *T. patachonicus*) y el hombre, además de algunos roedores silvestres (*Abrothrix olivaceus* y *Oligoryzomys longicaudatus*) y múridos (*Rattus rattus* y *R. norvegicus*) (Martinez *et al.*, 1986).

El chorito es una especie de sexos separados, en que el macho tiene gónadas color amarillento y la hembra color anaranjado, con fecundación externa (Clasing *et al.*, 1998; Osorio, 2002; Zagal y Hermosilla, 2008). Los mejillones son diploides de  $2n = 28$  cromosomas (Ahmed y Sparks, 1970; Marquez, 2006; Figueras, 2007). Poseen dos genomas mitocondriales, uno encontrado en todos los individuos y transmitidos por las hembras (tipo F) y otro encontrado sólo en machos (tipo M) y transmitido a la descendencia masculina, este es un mecanismo de herencia doble uniparental (Zouros *et al.*, 1994; Saavedra *et al.*, 1996; Saavedra *et al.*, 1997; Zouros, 2000; Ladoukakis y Zouros, 2001). En las áreas en las que dos especies de *Mytilus* co-habitan se intercrucan produciendo una zona híbrida, estos individuos híbridos pueden ser morfológica, fisiológica o conductualmente intermedios entre los taxa parentales (Inoue *et al.*, 1997, Toro, 1998, Hilbish *et al.*, 2002, Bierne *et al.*, 2003, Toro *et al.*, 2004a, Santaclara *et al.*, 2006, Kijewski *et al.*, 2009). En cuanto al ciclo de vida (Figura 1), si las condiciones del medio son favorables para el desarrollo del chorito, los adultos maduran sexualmente en primavera - verano (Clasing *et al.*, 1998, Osorio, 2002), ocurriendo luego la liberación de gametos al medio acuático, cuya fecundación origina gran número de larvas que pasan por una serie de procesos en los que se suceden diferentes formas larvales de vida planctónica, y finalmente se fijarán a un sustrato duro (Clasing *et al.*, 1998). El periodo entre la fecundación y la fijación de la larva

varía de 3 a 6 semanas. La captación de semillas se realiza principalmente en otoño (Osorio, 2002).

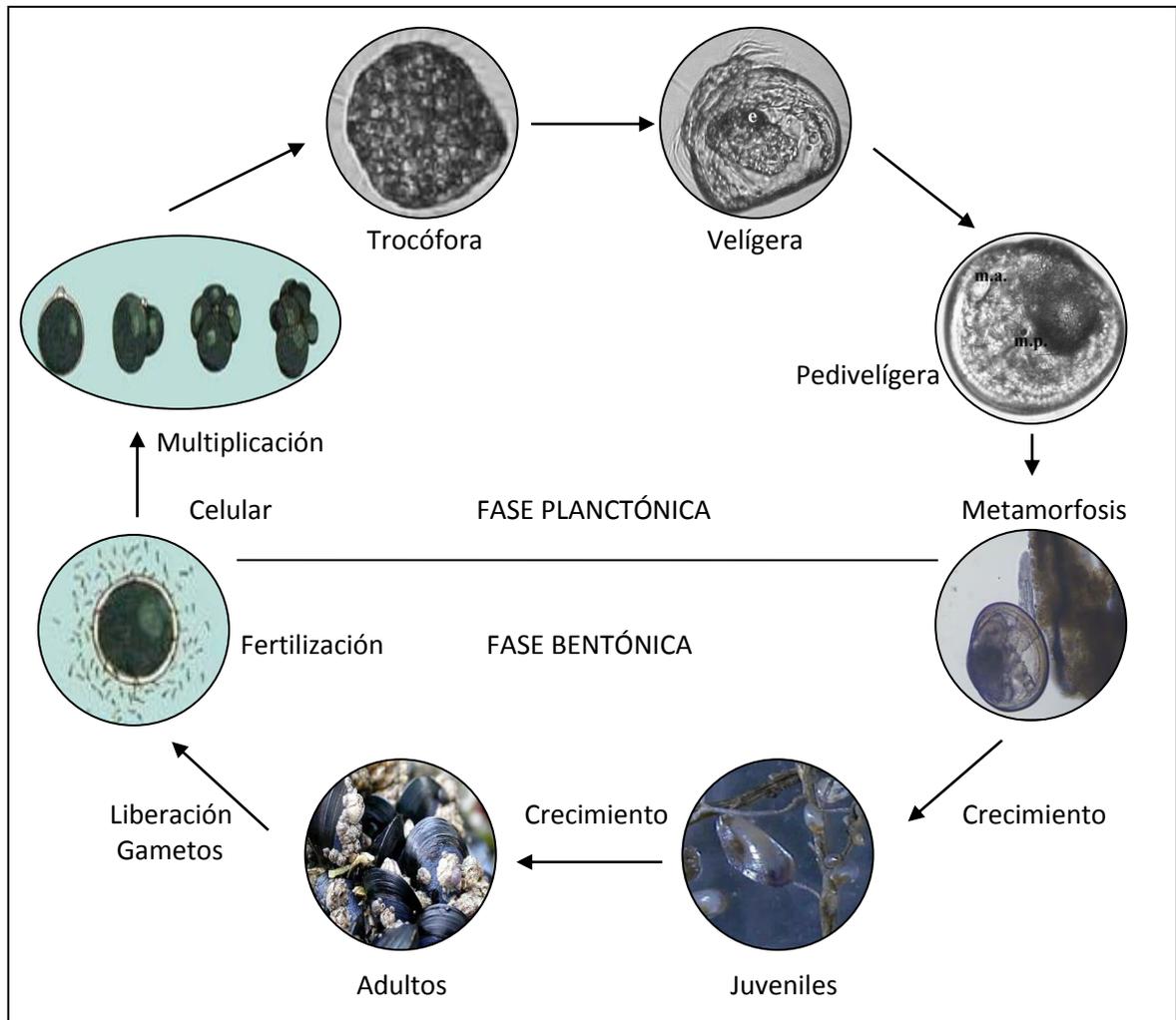


Figura 1: Ciclo de vida de los mitílidos con detalle de la fase planctónica (modificado de Clasing *et al.*, 1998).

La clasificación taxonómica de los representantes del género *Mytilus* tradicionalmente se ha basado en caracteres morfológicos de las conchas, los que suelen ser variables, dada la influencia del ambiente en que se desarrollan los individuos (nivel de las mareas, tipo de sustrato, densidad de mejillones, salinidad, edad, etc.). Cárcamo *et al.* (2005) y Krapivka *et al.* (2007), señalan que este método de clasificación no es simple, es extremadamente variable, debido a la plasticidad fenotípica dentro de una misma especie y al efecto de la distancia geográfica sobre la morfología. Así mismo, Santaclara *et al.* (2006), añaden que la clasificación dentro de este género es compleja, por las semejanzas morfológicas, superposiciones zoogeográficas y evidencias de híbridos naturales entre las poblaciones

silvestres de diferentes especies. Con esta problemática, se torna relevante la identificación a través de otros métodos adicionales a las características morfológicas, como son las técnicas moleculares, que permiten cuantificar las diferencias genéticas entre especies a nivel del DNA.

Tarifeño *et al.* (2005) mencionan que según la literatura taxonómica clásica la única especie del género *Mytilus* en Chile era el *Mytilus chilensis*. Toro (1998), usando marcadores moleculares y características morfológicas entre cuatro tipos de *Mytilus* (*M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* y *M. chilensis*), propone que *Mytilus chilensis* podría ser incluido en el grupo de *Mytilus edulis*, así mismo Borsa *et al.* (2012), utilizando alozimas indica también que *Mytilus chilensis* debería ser incluido como subespecie y nombrado *Mytilus edulis platensis*. Utilizando la amplificación al azar de fragmentos polimórficos de ADN o RAPD, Rego *et al.* (2002) analizaron cuatro especies de mejillones, *Mytilus edulis*, *Mytilus chilensis*, *Mytilus galloprovincialis*, y *Perna canaliculus*; y lograron diferenciar genéticamente a *Mytilus galloprovincialis* del resto de los mejillones, luego Toro *et al.* (2005) caracterizan genéticamente a *Mytilus chilensis*, mostrando evidencia de la presencia de *M. galloprovincialis* en la costa del sur de Chile lo que fue corroborado por Tarifeño *et al.* (2005; 2012). Por otra parte, Cárcamo *et al.* (2005) utilizando alozimas analizan los mejillones de la costa del Pacífico sur de América, los resultados mostraron que las muestras del sur de América genéticamente son más cercanas a *Mytilus galloprovincialis* europeo que a *Mytilus edulis*, aunque éstos poseen frecuencias alélicas particulares y características. Hilbish *et al.* (2000) indican la presencia de alelos propios de *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis* en los *Mytilus* de las costas de Chile. Gérard *et al.* (2008) demuestran la existencia en Chile de *Mytilus* genéticamente más cercanos a *Mytilus galloprovincialis* y otros de carácter endémico. En la actualidad sigue siendo utilizada la clasificación de *Mytilus chilensis* para el rotulado de alimentos a nivel comercial.

Toro *et al.* (2006, 2004b), señalan que en Chile son escasos los estudios genéticos en poblaciones de *Mytilus chilensis*, ya sean naturales o de cultivo y pocas son las publicaciones que tratan de esta especie, a pesar de que dentro del grupo de los moluscos, *Mytilus chilensis*, es la especie de mayor importancia comercial. Toro *et al.* (2004c) estudiaron la estructura genética de *Mytilus chilensis* a lo largo de 1900 km de costa chilena con marcadores moleculares RAPD analizando ocho poblaciones naturales desde Arauco a Punta Arenas, los resultados mostraron que hay poca diferenciación entre estas poblaciones. En un estudio similar por Toro *et al.* (2006) realizado con alozimas concluyó que estas poblaciones actuarían como una única gran población de cruzamiento al azar, con la excepción de la población de Punta Arenas que muestra un mayor grado de diferenciación genética (Toro *et al.* 2004c; 2006).

Martínez-Lage *et al.* (2005) mencionan la importancia de los estudios sobre genética de poblaciones en especies acuícolas, dado que los recursos genéticos se encuentran en las poblaciones naturales. Parte importante, de estos estudios es también conocer la diversidad genética, que se refiere a la variación en el material genético de una población o especie. Rosa-Vélez y Rodríguez-Romero (1989, citados por Rivera y Grijalva, 2006) indican que

una población de baja diversidad genética, con relación a otra de la misma especie tendrá una capacidad inferior para hacer frente a cambios en el ambiente. Esta diversidad se puede medir sobre la base del número de heterocigotos que presenta un locus en la población (Heterocigocidad), el número de alelos en los loci o el número de loci con más de un alelo (Polimorfismo). Sobre la base a valores del estadígrafo  $F_{ST}$  se puede medir el grado de diferenciación genética entre las poblaciones, esto respecto a la distribución de las frecuencias alélicas entre todas las poblaciones que pueden haber sido muestreadas (Holsinger y Weir, 2009).

La diversidad genética de los recursos marinos tiene un valor intrínseco para la conservación y gestión (Diz y Presa, 2009). Es también de utilidad para determinar los rasgos en los que se debe enfatizar en futuros programas de mejora genética, así como para conocer parte de la base genética de la que se dispone para la selección de parentales para dichos programas (Miranda *et al.*, 2006). Para ayudar a la mantención de la diversidad genética dentro y entre las poblaciones y para contribuir a establecer prioridades de conservación es necesario hacer revisión de las distintos marcadores moleculares usados en *M. chilensis* (Toro *et al.*, 2009).

En *Mytilus chilensis* la estructura genética se ha estudiado utilizando distintos marcadores moleculares como alozimas, marcadores de mtDNA, marcadores de DNA nuclear y dentro de estos últimos el RAPD (Cárcamo *et al.*, 2005, Toro, 1998, Toro *et al.*, 2006, Toro *et al.*, 2004c). Los marcadores moleculares corresponden a cualquier fenotipo molecular, originado por un gen (Díaz, 2005), utilizados como herramientas para el análisis directo o indirecto del ADN que se han desarrollado en las últimas décadas (Astorga, 2008). En acuicultura los marcadores moleculares han permitido resolver diversas problemáticas como conocer la diversidad genética, parentesco y paternidad, identificación de especies o cepas, selección asistida por marcadores, entre las principales aplicaciones (Liu y Cordes, 2004, Astorga, 2008). En las últimas décadas se han desarrollado marcadores moleculares para describir polimorfismos genéticos en mejillones (Presa *et al.*, 2002), como alozimas (López, 2005, Cárcamo *et al.*, 2005), marcadores RAPD (Toro *et al.*, 2004c) secuencias de ADN nuclear y mitocondrial, y microsatélites (Presa *et al.*, 2002, Gardestrom *et al.*, 2008, Larraín *et al.*, 2014). Estos últimos se caracterizan por ser altamente polimórficos, lo que permite analizar fenómenos intraespecíficos asociados con la subestructuración genética natural y cambios antropogénicos (Presa *et al.*, 2002), por ejemplo, los microsatélites han probado ser informativos para la detección de sub poblaciones en especies de peces (Liu y Cordes, 2004).

Los marcadores microsatélites, conocidos también como “simple sequence repeats” o “simple tandem repeats” (SSR o STR, respectivamente), son secuencias de ADN cuyo tamaño fluctúa entre 1 a 6 nucleótidos de longitud y que están repetidas una tras otra, en “tándem”, siendo más común los motivos repetidos di, tri o tetranucleotidos. Están presentes en cualquier parte del genoma, codificante o no codificante, aunque son más frecuentes en las regiones no codificante (Tautz, 1993, Jarne y Lagoda, 1996, Thót *et al.*, 2000, Ellegren, 2004, Araneda, 2005). El patrón de herencia de los marcadores

microsatélites es codominante (se distinguen los homocigotos de los heterocigotos). En general presentan una gran cantidad de alelos por locus, dado que las secuencias repetidas en “tándem” tienen tasas de mutación de dos a tres órdenes de magnitud mayores que las secuencias únicas (Ellegren, 2004).

En el género *Mytilus* a la fecha existen 27 microsatélites descritos en bases de secuencias públicas como Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), 21 de los cuales son en *Mytilus galloprovincialis* y los 6 restantes en *Mytilus trossulus* (Presa *et al.*, 2002, Cruz *et al.*, 2005, Gardestrom *et al.*, 2008). Para *Mytilus chilensis* Ouagajjou *et al.*, 2011 han descrito 9 microsatélites. Sin embargo, en estos casos se pueden utilizar partidores desarrollados para especies cercanas, como las mencionadas anteriormente (Araneda, 2005).

### **Hipótesis de trabajo**

1. Las muestras de *Mytilus chilensis* obtenidas de distintos centros de captación de semillas y un banco natural presentan altos niveles de diversidad genética.
2. Existen diferencias genéticas entre las poblaciones de *Mytilus chilensis* y una población de *Mytilus galloprovincialis* de Galicia, España.

### **Objetivos General y Específicos**

#### **Objetivo General**

Estimar la diversidad genética, en cuatro centros de captación y un banco natural de *Mytilus chilensis* y una muestra comercial *Mytilus galloprovincialis* proveniente de Galicia, España.

#### **Objetivos Específicos**

1. Identificar la especie en las muestras de mitílidos obtenida de las distintas localidades del Sur de Chile, e identificar la especie en las muestras envasadas de mitílidos de Galicia (España) utilizando marcadores RFLP-PCR en los genes del rDNA 18S y de la proteína adhesiva polifenólica.
2. Estimar las frecuencias alélicas y genotípicas para cinco loci microsatélites en las muestras de *Mytilus chilensis* y *Mytilus galloprovincialis*.
3. Estimar la diversidad genética de *Mytilus chilensis* y *Mytilus galloprovincialis* por medio de:

- Heterocigocidad promedio por locus, observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ).
  - Porcentaje de loci polimórficos (P).
  - Índice de información polimórfica (PIC).
  - Número de alelos por locus (A).
4. Estimar la estructura poblacional entre los centros de captación, bancos naturales de semillas de *M. chilensis* y población de *M. galloprovincialis* usando distancia ( $D$ ) genética de Reynolds (1983), la varianza estandarizada de las frecuencias alélicas ( $F_{ST}$ ) y análisis factorial de correspondencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Genética y Biotecnología en Acuicultura, dependiente del Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile ubicada en Avenida Santa Rosa 11315, La Pintana, Santiago, Chile.

### Materiales

En el presente estudio se utilizaron ejemplares de *Mytilus chilensis* obtenidos de cinco localidades, de las cuales cuatro corresponden a centros de captación de semilla y una es un banco natural, zona pesquera FAO 87 (Cuadro 1). Se extrajeron cien muestras individuales de “mitílicos” en cada localidad, de las que se usaron 50 muestras de *Mytilus chilensis* previamente identificadas con métodos moleculares para asegurarse que correspondiesen a la especie. El tejido colectado fue el borde del manto, sumergido en tubo tipo eppendorf de 1,5 ml con etanol 95% y almacenado a -20°C.

Cuadro 1. Ubicación localidades de muestreo.

Lugar	Fecha recolección	Latitud Sur	Longitud Oeste
Isla Peel (Banco natural)	16.02.2009	50° 49' 43,66"	74° 07' 03,70"
Piedra Azul	24.06.2009	41° 32' 55, 35"	72° 46' 14, 35"
Pichicolo	24.06.2009	42° 2' 23,76"	72° 35' 27,17"
Canutillar II	24.06.2009	41° 31' 13,9"	72° 20' 15,69"
Canal Coldita - Piedra Blanca	25.06.2009	43° 14' 48,82"	73° 41' 42,77"

Adicionalmente se usaron 50 muestras individuales de tejido de *Mytilus galloprovincialis*, de ejemplares envasados, provenientes de Galicia, España, zona pesquera FAO 27, con fecha 20.06.2008.

## Metodología

### Extracción de ADN

El ADN se extrajo desde muestras de músculo del borde del manto, siguiendo el método de fenol-cloroformo de acuerdo al protocolo de Taggart *et al.* (1992), agregando una etapa de precipitación con solución saturada de NaCl y centrifugación con el fin de eliminar mucopolisacáridos (Rego *et al.*, 2002), excluyendo la agitación con vortex para no dañar la integridad del ADN extraído (Larraín *et al.*, 2012) (Apéndice 1).

### Evaluación de la calidad de ADN

La integridad del ADN extraído fue evaluada con electroforesis en gel de agarosa al 0,7% y tinción con bromuro de etidio, en transiluminador UV Fotodyne modelo 3-3002. Su concentración y pureza se midió con espectrofotómetro NanoDrop modelo ND-1000 en el Laboratorio de Ecología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Las concentraciones de ADN se ajustaron por dilución a 20 ng·µl<sup>-1</sup>.

### Identificación de género y especie

Fue realizada en dos etapas, identificación de género según Santaclara *et al.* (2006), e identificación de especie según Inoue *et al.* (1995) (Figura 2). En la primera, se realizó una RFLP-PCR de un fragmento del rDNA 18S (gen de la sub unidad pequeña nuclear del DNA ribosomal), utilizando los partidores *MusRFLP* (Forward 5'→3' CGAGGCCCGTAATTGGAATGA y Reverse 5'→3' TCAGTCAAGAGCACCAAGGGC), sintetizados por Biosonda S.A. Biotecnología.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo, para las dos etapas, en un volumen final de 25 µl, en un termociclador TECHNE modelo TC-412. En el Cuadro 2 se muestran la mezcla de reactivos para ambas etapas y las condiciones de amplificación para la etapa 1.

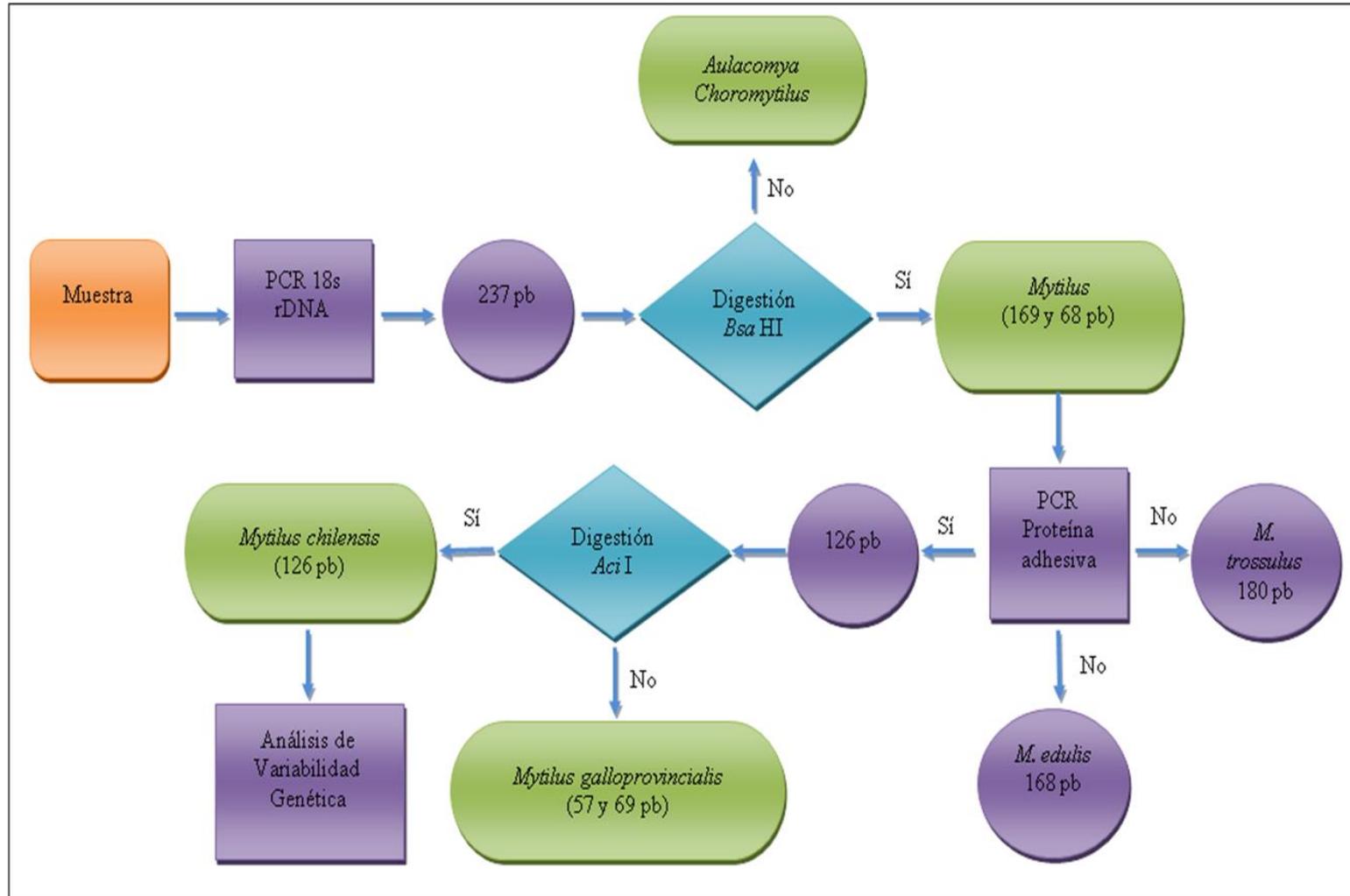


Figura 2. Esquema de las etapas para la identificación de género y especie. Adaptado de Santaclara *et al.* (2006).

Cuadro 2. Volumen y concentración finales de mezcla de reacción para RFLP-PCR *Mus* RFLP y RFLP-PCR Me 15-16 (Izq.) y perfil térmico utilizado en la amplificación del fragmento del gen rDNA 18S (Der.).

RFLP-PCR <i>Mus</i> y Me15-16			Programa PCR-RFLP <i>Mus</i> RFLP		
Reactivos	Vol μl	Concentración	Etapa	T° °C	Tiempo Seg
Agua	15.225	----	Inicialización	95	180
Tampón KCL <sup>+</sup>	2.500	1x	Denaturación	94	30
MgCl <sub>2</sub>	2.000	2 mM	Alineamiento cebador	61	30
dNTPs	0.125	50 μM	Elongación de cadena	72	30
Primer Forward	2.000	1 μM	Ir al paso 2 (29 veces)	-	-
Primer Reverse	2.000	1 μM	Elongación final	72	180
Taq Polimerasa	0.150	1 U/μl	Conservación	15	∞
ADN	1.000	20 ng·μl <sup>-1</sup>			

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1,8% con bromuro de etidio, en transiluminador UV Fotodyne modelo 3-3002 para verificar que todas las muestras amplificaran. Luego se continuó con la digestión de los productos de PCR con la enzima *Bsa*HI (New England BioLabs Inc.) que permite identificar el género *Mytilus* de los géneros *Aulacomya* y *Choromytilus*, según el tamaño de los fragmentos obtenidos (Cuadro 3), para esto se agregaron 5 μl de la solución que contiene a la enzima a 15 μl del producto de PCR. Esta mezcla se dejó durante toda la noche a 37 °C. Los fragmentos de estas digestiones se revisaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2,5% durante 45 a 60 minutos a 80 volts, teñidos con bromuro de etidio, y fueron visualizados en transiluminador de luz ultravioleta. Las imágenes se registraron con cámara digital Nikon modelo Coolpix 990.

Una vez identificadas las muestras individuales pertenecientes al género *Mytilus* se realizó la segunda fase, para esta se hizo nuevamente RFLP-PCR, esta vez en el gen de la proteína adhesiva polifenolica, con los partidores Me 15 (5'→3' CCAGTATACAAACCTGTGAAGA) y Me 16 (5'→3' TGTTGTCTTAATAGGTTTGTAAGA) sintetizados por Biosearch Technologies, Inc. La mezcla de reactivos se muestra en el Cuadro 2 y las condiciones de amplificación se observan en el Cuadro 4.

Los productos de PCR se almacenaron a 5°C y se procedió con la misma metodología utilizada para los productos de la RFLP-PCR *Mus* para determinar el patrón de amplificación de cada individuo. La identificación de amplicones de 126 pb fue seguida por la digestión de éstos con la enzima *Aci* I (Fermentas®), cuyo corte permite distinguir entre las especies *Mytilus chilensis* y *Mytilus galloprovincialis* (Cuadro 5). En esta etapa se

mezclaron 6 µl de la solución que contiene a la enzima y 14 µl de producto de PCR. La solución resultante se dejó durante toda la noche a 37°C. Los resultados de estas digestiones se revisaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2,5%, teñidos con bromuro de etidio durante 45 a 60 minutos. Visualizados en transiluminador de luz ultravioleta Fotodyne modelo 3-3002. Se registraron las imágenes con cámara digital Nikon modelo Coolpix 990.

Cuadro 3. Tamaño de fragmentos de restricción para identificación de género de las muestras de mitílidos usadas en este estudio.

Género	Fragmento con PCR <i>Mus</i>	Fragmento con <i>Bsa</i> HI
	pb	pb
<i>Mytilus</i>	237	169 y 68
<i>Choromitylus</i>	237	237
<i>Aulacomya</i>	237	237

Cuadro 4. Perfil térmico utilizado para la amplificación del fragmento del gen de la proteína adhesiva polifenólica (PCR Me 15-16).

Programa PCR Me 15-16		
Etapa	Temperatura °C	Tiempo Seg
Inicialización	95	180
Denaturación	94	30
Alineamiento/Unión del cebador	56	30
Extensión/Elongación de cadena	72	60
Ir al paso 2 (29 veces)	-	-
Elongación final	72	120
Conservación	15	∞

Cuadro 5. Tamaño de fragmentos de restricción para identificación de especie de las muestras de mitílidos usadas en este estudio.

Especie	Fragmento con PCR Me15-16	Fragmento con <i>Aci I</i>
	pb	pb
<i>Mytilus chilensis</i>	126	126
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	126	69 y 57
<i>Mytilus edulis</i>	180	
<i>Mytilus trossulus</i>	168	

En el proceso de identificación de género no se encontraron muestras individuales distintas a *Mytilus*, en tanto, en la identificación de la especie se encontraron 3 muestras individuales con patrones RFLP distintos a los descritos para *Mytilus chilensis*, las que fueron reemplazadas por otras tres que sí tenían el patrón de RFLP descrito para la especie.

### **Marcadores microsatélites**

Se buscaron secuencias microsatélites en bases de datos públicas y otras fuentes bibliográficas. De estas se seleccionaron 23 secuencias para diseñar partidores específicos y probar su amplificación en muestras de individuos *Mytilus chilensis* y *Mytilus galloprovincialis*. Utilizando estos resultados se seleccionaron para el estudio cinco microsatélites (Cuadro 6) que presentaran buena amplificación, esto basado en su fácil obtención y en la identificación de amplificaciones nítidas en geles de agarosa al 0,7%.

Cuadro 6. Secuencia de los partidores, motivo repetido, rango de tamaño de alelos y número de Accesoión de Genebank para los cinco microsatélites utilizados.

Locus	Motivo repetido	Secuencias partidores(5'→3')	Rango tamaño (pb)	No. Accesion
<i>Mgu 1</i>	(TG) <sub>n</sub> - (AT) <sub>n</sub>	F: ATCAGAATGGCAAAGAAAA R: ACTATGATGGCTGAGAGGATA	115 - 225	AF445370
<i>Mgu 3</i>	(TG) <sub>n</sub>	F: AAATAAAAATTCATCTAATCCC R: AAGCAATCCAAAGTGAGAGG	141 - 159	AF445372
<i>MT 203</i>	(CA) <sub>8</sub>	F: GTTTTCCGAATGGCGAGATA R: ACAACCAGTTCAATAGCGACA	178 - 220	BV725482
<i>MT 282</i>	(GT) <sub>9</sub>	F: TGCCACATTGTTTTCAAGGA R: TTCACGACAGCGACTATGAAA	335 - 381	BV725484
<i>Mg 17</i>	(AT) <sub>n</sub> - (AG) <sub>n</sub>	F: CCACTCAAACGGTAGGAGGTTTCA R: GGGCGGTTTAGCTGATGTTGGTA	290 - 333	AY102084

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 15 y 20 µl, en un termociclador TECHNE modelo TC-412. Los reactivos y protocolos de amplificación se muestran a continuación (Cuadro 7).

Cuadro 7. Reactivos y temperatura de unión usados en la reacción de PCR para los cuatro loci microsátélites.

Concentración	Reactivo	Unidad	Loci				
			<i>Mgu 1</i>	<i>Mgu 3</i>	<i>Mgu 17</i>	<i>MT 203</i>	<i>MT 282</i>
10X	Tampón de PCR	X	1	1	1	1	1
50mM	MgCl	mM	1,5	2,0	2,0	2,0	1,5
10mM	dNTP	μM	100	100	100	100	100
10μM	Partidor “Forward”	μM	0,65	0,20	0,30	0,30	0,30
10μM	Partidor “Reverse”	μM	0,65	0,20	0,30	0,30	0,30
5U·μl <sup>-1</sup>	Taq	U	0,5	0,25	0,35	0,25	0,30
20ng·μl <sup>-1</sup>	ADN	ng	40	30	30	30	30
Temperatura de unión partidor		°C	54	59	60	59	58
Tiempo unión partidor		Seg	40	30	30	20	20

Las condiciones térmicas de amplificación se programaron con una denaturación inicial a 95°C por 5 min., seguida de 35 ciclos de amplificación, cada uno consistente en denaturación a 95°C por 1 min., unión del partidor a temperatura de unión específica (Cuadro 7) y extensión a 72°C por 50 segundos. Concluidos los 35 ciclos se programó una extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se almacenaron a 5°C, para luego, verificar su amplificación en geles de agarosa al 0,7% teñidos con bromuro de etidio. Las imágenes se registraron con cámara Nikon modelo Coolpix 990.

### **Tamaño de los fragmentos amplificados y genotipado**

Para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados de microsátélites se realizó electroforesis, en una cámara vertical de 30 cm de ancho por 40 cm de alto, con geles de poliacrilamida al 6% p/v, según el protocolo de preparación de poliacrilamidas (Anexo I) y fueron teñidos con un kit de tinción con plata para ácidos nucleicos BM-0860 (Winkler Ltda.), según especificación del fabricante (Anexo II).

Terminado el proceso de tinción, se colocó el gel sobre una mica y se cubrió con papel plástico transparente, para dejar un registro fotográfico digital del patrón de bandas de cada individuo. Posteriormente, las fotografías de los geles fueron analizadas con los programas Adobe Photoshop® CS5 Extended versión 12.0 y Microsoft Excel 2007. En este procedimiento se midió la distancia que migraron cada uno de los fragmentos del marcador de tamaño o “ladder” y los alelos visualizados de cada SSR. A partir de la distancia obtenida del “ladder” se obtuvo la curva de distancia relativa de migración para cada fragmento en el gel (eje X) en relación al logaritmo del número de pares de bases (eje Y), y se construyó la ecuación en la que se ingresó la distancia de migración de los alelos, determinando su tamaño. Finalmente, para la visualización de las fotografías, se usaron estándares de tamaños de 10 pb (para los SSR *Mgu 1* y *Mgu 3*), 25 pb (*MT 203*) y 50 pb (*MT 282* y *Mg 17*), y muestras con alelos de tamaño conocido para identificar con certeza el tamaño de los alelos de todas las muestras evaluadas. A partir de este registro y proceso para cada microsatélite se estableció el genotipo para 250 individuos de *Mytilus chilensis* y 50 individuos de *Mytilus galloprovincialis* (Apéndices 2 y 3).

Para identificar errores de genotipado (descarte de alelos grandes, tartamudeo, alelos nulos, conteo de alelos), se utilizó el programa Micro-Checker®, que usa simulación de Monte Carlo para generar las frecuencias esperadas de alelos homocigotos y heterocigotos, de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

## **Análisis Estadístico**

### **Desequilibrio de ligamiento**

Fue evaluado entre pares de loci para todas las poblaciones y dentro de cada población con el programa GENEPOP 4.0.10 (Raymond y Rousset, 1995; Rousset 2008), seguido de la corrección secuencial de Bonferroni para comparaciones múltiples (Rice, 1989).

### **Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas**

Se estimaron por recuento simple, utilizando el programa “The excel microsatellite toolkit V. 3.1.1” (Park, 2001). Con el software Genepop V. 4.0 se analizó la condición de equilibrio de Hardy-Weinberg para los loci analizados.

### **Estimación de la diversidad genética y parentesco**

De acuerdo a los genotipos obtenidos, usando el programa “The excel microsatellite toolkit v. 3.1.1” (Park, 2001) se estimaron: heterocigosidad observada promedio por locus ( $H_o$ ) y heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) según la ley de Hardy-Weinberg, número de alelos por locus (A), y contenido de información polimórfica (PIC).

**La heterocigosidad promedio por locus observada ( $H_o$ )** Es el número de individuos heterocigotos en la población en relación al total de individuos de esta.

**La heterocigosidad promedio por locus esperada ( $H_e$ )** Se calcula conociendo las frecuencias alélicas para el locus en la población y asumiendo que las frecuencias genotípicas se corresponden con la expansión del cuadrado del binomio, trinomio, etc., de estas frecuencias alélicas, cuando el locus presenta dos, tres o más alelos, respectivamente. Esto es representado por la siguiente fórmula:

$$f(A_i A_j) = \sum_{i \neq j=1}^n 2p_i p_j$$

Donde  $p_i$  y  $p_j$  son las frecuencias de los alelos  $A_i$  y  $A_j$  respectivamente.

**El número de alelos por locus (A)** Es el conteo de los alelos visualizados en cada locus.

**El contenido de información polimórfica (PIC)** Se calculó según la siguiente fórmula:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2$$

Donde  $f_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo e  $i$  el número de alelos.

**El equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W)** También conocido como equilibrio panmíctico, es un modelo teórico para genética de poblaciones basado en las siguientes hipótesis:

1. La población es panmíctica (todos los genotipos tienen la misma probabilidad de aparearse y el apareamiento es al azar, condición de panmixia).
2. La población es suficientemente grande (para minimizar la consanguinidad y deriva genética).
3. La población no está sometida a migración, mutación o selección (no hay pérdida ni ganancia de alelos).

Bajo estas circunstancias las poblaciones mendelianas mantienen en equilibrio las frecuencias alélicas de sus loci y éstas junto con las frecuencias genotípicas se mantienen constantes de generación en generación (Kalmes y Huret, 2001). El equilibrio de H-W fue puesto a prueba con una prueba de chi-cuadrado utilizando el programa GENEPOP 4.0.10 aplicando la corrección secuencial de Bonferroni para múltiples test (Rice, 1989).

Además, se calcularon los índices de fijación de Wright (1943, 1949, 1965, 1968)  $F_{IS}$  y  $F_{ST}$ , que miden la desviación de las condiciones de equilibrio de Hardy Weinberg en cada población ( $F_{IS}$ ), y el grado de diferenciación interpoblacional para cada uno de los loci analizados ( $F_{ST}$ ). La estimación del  $F_{IS}$  se realizó según Weir y Cockerham (1984) para

cada locus dentro de cada localidad a través del método exacto de Fisher usando la simulación de Monte Carlo con el programa GENEPOP 4.0.10 (Raymond y Rousset, 1995, Rousset, 2008), mientras que para el  $F_{ST}$  global y entre pares de localidades se usó el programa Genetix 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996). Las fórmulas de cálculo son:

$$F_{IS} = \frac{\overline{H_s} - \overline{H_o}}{\overline{H_s}} \qquad F_{ST} = \frac{\overline{H_T} - \overline{H_s}}{\overline{H_T}}$$

Donde,  $H_T$  es la heterocigosidad esperada promedio de toda la población de acuerdo a la ley de Hardy-Weinberg, y  $H_s$  es la heterocigosidad esperada promedio de cada subpoblación. El valor de  $F_{ST}$  fluctúa entre 0 y 1, 0 indica que las frecuencias alélicas son iguales en todas las poblaciones, es decir, no ha habido diferenciación. Cuando el valor alcanza el máximo teórico posible de 1 la población está fija en alelos diferentes.  $F_{ST}$  no puede ser negativo, ya que siempre  $H_T \geq H_s$ , mientras que  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  pueden ser negativos cuando  $H_o$  es inusualmente alto.

### Parentesco genético

Con el programa IDENTIX (Belkhir *et al.*, 2002) se estimó el parentesco genético mediante el índice  $r_{xy}$  para cada par de individuos a partir de los genotipos multilocus según Queller y Goodnight (1989). Posteriormente usado el ambiente de análisis matemático R se comparó el promedio de los valores  $r_{xy}$  dentro de cada localidad y entre pares de localidades por medio de una prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Esto permitió evaluar la posibilidad de que el déficit de heterocigotos se deba a una mayor consanguinidad.

### Estructura poblacional

Mediante Genetix 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996) se realizó el análisis factorial de correspondencia, obteniendo un gráfico 3D donde se visualizó la similitud de los genotipos multilocus entre las localidades.

### Diferenciación genética

Para su evaluación se estimó el índice  $F_{ST}$  global y entre pares de localidades (Weir y Cockerham, 1984), permitiendo deducir influencias de procesos demográficos en la estructura poblacional (Meirmans y Hedrick, 2011) y estimar el nivel de flujo genético entre localidades (Wright, 1969), basado en la siguiente fórmula:

$$F_{ST} = \frac{1}{4Nm+1}$$

También se calculó la similitud genética entre las localidades a través de la distancia genética de Reynolds (1983), ésta se ha descrito como más exacta para eventos recientes de divergencia estudiados usando microsatélites (Lenstra *et al.*, 2012), ya que no considera la mutación y depende del flujo genético. Ésta es basada en el coeficiente de coancestría ( $\theta$ ), que es la probabilidad de que un par de alelos en un mismo locus tomados al azar desde una población en individuos diferentes sean idénticos por descendencia, es decir, que tengan un ancestro común. Finalmente, la distancia genética entre dos poblaciones o individuos puede medirse como:

$$D = -\ln(1 - \theta) \quad (\text{Reynolds } et al., 1983)$$

Se calculó y representó gráficamente la matriz de distancia genética en un dendrograma de relaciones entre localidades usando el algoritmo de agrupamiento Neighbor joining con el paquete computacional PHYLIP (Felsenstein, 2009) y el programa TreeView 1.6.6 (Page, 1996). La repetibilidad de los nodos se evaluó mediante 5000 iteraciones de re-muestreo usando “bootstrap”.

Mediante el test de Mantel (1967) se puso a prueba el aislamiento por distancia como modelo de diferenciación genética alternativo a la panmixia. Se comparó las matrices de distancia genética ( $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ ) con la de distancia geográfica (Km) estimada como la trayectoria mínima por la línea de la costa, usando el logaritmo de la distancia geográfica recomendado para un hábitat con dos dimensiones (latitud y longitud) (Rousset, 2008). El cálculo del índice de similitud ( $r$ ) se realizó en el programa Genetix 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996) y la significancia de la asociación se probó con 1000 iteraciones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Extracción y evaluación de calidad de ADN

La integridad del ADN extraído evaluada con electroforesis en gel de agarosa mostró ninguna o mínima degradación, su concentración varió entre 28 y 868 ng· $\mu$ l<sup>-1</sup> y su pureza entre 1,6 y 2,1 (relación de absorbancia 260/280 nm).

### Identificación del género y especie

El momento del muestreo se descartó la presencia de individuos de otros géneros (*Aulacomya* y *Choromytilus*) basándose en características morfológicas. Para verificar la correcta identificación se llevó a cabo el proceso de identificación de género mediante RFLP-PCR descrito por Santaclara *et al.* (2006). Debido a que gran parte de las muestras de localidades chilenas correspondían a semillas de tamaño reducido (2 cm de longitud aproximadamente) podía llevarse a confusión con individuos del género *Aulacomya* (Cholga) y *Choromytilus* (Choro zapato), que en la identificación visual de especies no serían detectables. En cuanto a las muestras de Galicia, España, por ser un producto comercial desconchado y congelado esta etapa era necesaria antes de la identificación de la especie, como lo indican los mismos autores. En este proceso no se encontraron muestras individuales distintas al género *Mytilus*. Respecto a la identificación de la especie se encontró un individuo perteneciente a la población Piedra Azul (PA), cuyos fragmentos amplificados de 126 pb al ser tratados con la enzima de restricción *Aci* I mantuvo un alelo sin corte y el otro alelo con corte en dos fragmentos de 51 y 75 pb que difieren de los descritos por Santaclara *et al.* (2006) de 57 y 69 pb, posiblemente por la metodología utilizada en cada estudio de PAGE 8% en este caso v/s secuenciación respectivamente. Este individuo fue considerado posible híbrido de *Mytilus chilensis* x *Mytilus galloprovincialis* (0,4% de representatividad en las muestras). Mientras que en la población de Canal Coldita – Piedra Blanca (CB) se encontraron dos individuos con fragmentos de 126 y 168 pb, este último fragmento corresponde al tamaño de alelo descrito para *Mytilus trossulus* (0,8 % de representatividad en las muestras). Estas tres muestras con alelos distintos a los descritos para *Mytilus chilensis*, fueron reemplazadas por otras tres que sí presentaban alelos representativos de la especie (Cuadro 8).

Cuadro 8. Número de muestras individuales identificadas según presencia de alelos característicos de cada especie.

Especie	Origen geográfico – Poblaciones					
	GA	IP	PA	PI	CN	CB
<i>Mytilus chilensis</i>	0	50	49	50	50	48
<i>Mytilus edulis</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Mytilus trossulus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	50	0	0	0	0	0
<i>M chilensis - M galloprovincialis</i>	0	0	1	0	0	0
<i>M chilensis - M trossulus</i>	0	0	0	0	0	2
Total	50	50	50	50	50	50

GA: Galicia; IP: Isla peel; PA: Piedra azul; PI: Pichicolo; CN: Canutillar II; CB: Canal coldita - Piedra blanca

La segunda etapa desarrollada por Inoue *et al.* (1995) es usada para identificar inequívocamente la especie en larvas y adultos (Wood *et al.*, 2003), además ha sido utilizada por múltiples autores (Skurikhina *et al.*, 2001, Beaumont *et al.*, 2005, Santaclara *et al.*, 2006, Coghlan y Gosling, 2007, Dias *et al.*, 2009, Kijewski *et al.*, 2009, Groenenberg *et al.*, 2011). En este paso, fue necesario hacer el análisis en las muestras provenientes de España y en muestras nacionales, ya que, en las costas chilenas se ha detectado la presencia de *Mytilus galloprovincialis* (Daguin y Borsa, 2000, Tarifeño *et al.*, 2005, 2012, Gérard *et al.*, 2008, Westfall y Gardner, 2010, Westfall *et al.*, 2010). La frecuencia de alelos característicos de *Mytilus chilensis* en las 250 muestras tomadas en localidades de Chile fue de 0,988. El hallazgo de un alelo descrito para de la especie *Mytilus galloprovincialis* en este estudio coincide con la descripción de rango geográfico realizada por Toro *et al.* (2005) desde Arauco a Punta Arenas. Esta especie también fue descrita en la Región del Biobío en Bahía de Coliumo, Bahía de Concepción y Golfo de Arauco por Tarifeño *et al.* (2005, 2012). El alelo encontrado corresponde a un individuo que fue considerado híbrido entre *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus chilensis*, resultados similares han publicado Dias *et al.* (2009) y Kijewski *et al.* (2009) que han reportado la presencia de híbridos de *Mytilus galloprovincialis* con las especies nativas, otros autores señalan posibles zonas híbridas en las que es partícipe esta especie (Inoue *et al.*, 1997, Hilbish *et al.*, 2002, Bierne *et al.*, 2003). La baja frecuencia del alelo *Mytilus galloprovincialis* encontrada en este estudio (0,004) y el limitado tamaño de muestra obtenido en cada localidad (n=50) pudo causar que el alelo no fuera detectado en otras localidades usadas en este estudio y que esta especie pudiera tener una distribución más amplia en la región. Daguin y Borsa (2000), Camus

(2005), Fernández y Castilla (2005) advierten que la presencia de especies invasoras pueden tener impactos ecológicos importantes en el medio.

Por ejemplo, a pesar de que *Mytilus trossulus* se encuentra en el Pacífico noreste, Atlántico noreste y el mar Báltico (Beaumont *et al.*, 2005, Westfall y Gardner, 2010), McDonald *et al.* (1991) encontró que los mejillones de Sud América contenían alelos de *Mytilus trossulus*. Hilbish *et al.* (2000) indica que las hipótesis sobre el origen de los mejillones del Hemisferio Sur hacen distintas predicciones de la relación filogenética entre los mejillones del Hemisferio Norte y Sur, entre las que se menciona que el origen de los mejillones del Hemisferio Sur está estrechamente relacionado con *Mytilus trossulus*. Vidal *et al.* (2009) muestrearon individuos de *Mytilus trossulus* en Valdivia, Chile (aprox. 39°49'S; 73°15'O), luego Fernández-Tajez *et al.* (2011) encontraron dos híbridos aparentes *Mytilus chilensis* x *Mytilus trossulus* en muestras comerciales congeladas de mejillón de origen chileno, lo que se confirmó por secuenciación y RFLP-PCR del gen mitocondrial de la *citocromo oxidasa I* (COI). *Mytilus trossulus* y sus híbridos con especies nativas *Mytilus edulis* y *Mytilus galloprovincialis* se han detectados en centros de cultivo y poblaciones naturales de mejillones en Escocia (Dias *et al.*, 2009). Según la información conocida de la especie de *Mytilus trossulus*, el hallazgo de alelos de 168 bp no es frecuente en las costas chilenas ni en el Hemisferio Sur, su presencia se podría explicar cómo el impacto del transporte por actividades humanas o introgresión por contacto ancestral con esta especie (Kijewski *et al.*, 2009). Algunos autores han mencionado que los híbridos de esta especie en cultivos de *Mytilus edulis* tienen valvas más delgadas, y son de reducido tamaño al estado adulto, lo que comercialmente podría provocar pérdidas económicas (Riginos y Cunningham, 2005, Beaumont *et al.*, 2008, Dias *et al.*, 2009), situación que no se ha evidenciado en los cultivos de las costas chilenas.

### **Tamaño de los fragmentos amplificados y genotipado**

Finalizado el proceso de identificación de especie, se llevaron a cabo las reacciones de PCR con los cinco loci microsatélites que presentaron mejor amplificación en geles de agarosa al 0,7%. Con estos geles se pudo determinar un tamaño de alelos que fluctuó entre 115 y 381 pb, y su número por locus (Cuadro 9). Los genotipos obtenidos están registrados en los Apéndice 2 y 3.

Algunos de los tamaños de alelos observados coinciden con los publicados, a pesar de ser desarrollados otras especies de *Mytilus*, otros difieren o son nuevos tamaños. Así mismo el número de alelos observados, salvo en los loci *MT203*, no es lo encontrado por otros autores, probablemente porque se trata de especies diferentes y por la metodología de genotipado utilizada (genotipado de fragmentos amplificados con partidores fluorescentes en secuenciador automático v/s separación de fragmentos mediante PAGE y tinción con plata usada en esta memoria).

Cuadro 9. Condiciones de resolución, tamaño y número de alelos observados y descritos para cada locus microsatélite analizado.

Locus	No. Acceso GenBank	Tamaño descrito pb	Nº alelos descritos	Tamaño obs. pb	Nº alelos obs.	[Acril:Bis]	Tiempo de corrida h:min
<i>Mgu 1</i>	AF445370	168 - 208	11	115 - 225	18	19:1	1:50
<i>Mgu 3</i>	AF445372	143 - 151	5	141 - 169	10	19:1	1:50
<i>MT 203</i>	BV725482	161 - 197	8 a 13	174 - 220	11	19:1	1:50
<i>MT 282</i>	BV725484	336 - 354	6 a 7	335 - 381	6	29:1	2:20
<i>Mg 17</i>	AY102084	280	6	277 - 333	7	29:1	2:20

Acril/Bis: Proporción de Acrilamida/Bisacrilamida usada en los geles.

El programa Micro-Checker (Van Oosterhout *et al.*, 2004) no detectó descarte de alelos grandes, debido a una amplificación menor del alelo de mayor tamaño llevando a considerar como homocigoto a un individuo que realmente es heterocigoto (Pompanon *et al.*, 2005, Van Oosterhout *et al.*, 2004). Se detectó presencia de alelos nulos en todas las localidades para los loci *Mgu1*, *Mgu3*, *MT203* y *Mg17*, mientras que para el locus *MT282* solo en dos localidades chilenas y en las muestras de España. Los alelos nulos son definidos como alelos existentes que no son observados usando los partidores estándar. Polimorfismo no identificado, sustitución o inserción/delección de base, en los lugares de unión de los partidores puede causar que algunos alelos de microsatélites amplifiquen pobremente o no lo hagan. Algunas veces la presencia de alelos nulos puede ser detectada por desviaciones de la herencia mendeliana clásica, o menor cantidad de heterocigotos en una población que la predicha a partir de las proporciones de Hardy-Weinberg (O'Reilly y Wright, 1995).

En cuanto al tartamudeo se detectó en la localidad de España para el locus *Mgu3* y *Mgu1*, además de tres localidades chilenas para *Mgu1*. Este error se debe la metodología donde algunos de los alelos de microsatélites dinucleótidos son visibles como bandas escalonadas, en lugar de visualizarse un solo producto discreto. El tartamudeo puede causar problemas para identificar ciertos alelos, a pesar de que a menudo el patrón de tartamudeo es constante entre individuos, de modo que los alelos bien separados pueden ser identificados inequívocamente (O'Reilly y Wright, 1995). Bovo *et al.* (1999) indica que se debe a la tendencia de *Taq* polimerasa a añadir en el extremo 3' de la nueva hebra un nucleótido no presente en el templado, al final de la elongación. Dado que este artefacto para cada loci

microsatélite no se presenta en todas las localidades usadas en este estudio el posible error por tartamudeo señalado por el programa Micro-Checker se desestima.

Antes de realizar los análisis de la estructura poblacional es esencial comprobar que la variación genética encontrada mediante los microsatélites cumpla con los tres supuestos básicos en un análisis poblacional: **a)** Neutralidad selectiva, **b)** Inexistencia de alelos nulos y **c)** Independencia de los loci (Murray, 1996, Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

**a) Neutralidad selectiva:** Los loci involucrados en adaptaciones locales muestran valores de  $F_{ST}$  significativamente mayores que aquellos selectivamente neutros (Beaumont y Balding, 2004; Excoffier *et al.*, 2009). Para identificar las regiones del genoma que han sido blanco de selección se debe obtener la distribución esperada del estadístico  $F_{ST}$  a través de muchos loci. En este caso, tal análisis no tiene sentido habiendo estudiado solo cinco loci (Cuadro 11), sin embargo, llama la atención el alto valor  $F_{ST}$  del locus *Mgu3* (0,160 y 0,163, al incluir seis o cinco localidades en el en análisis, respectivamente) que haría pensar que no se trata de un locus neutral.

**b) Alelos nulos:** La presencia de alelos nulos ha sido encontrada en muchas taxa presentándose en los moluscos en una frecuencia particularmente alta (Chapuis y Estoup, 2007), este fenómeno en SSR de *Mytilus* ha sido ampliamente descrito (Gardeström *et al.*, 2007; Ouagajjou *et al.*, 2011; Presa *et al.*, 2002; Yu y Li, 2007). Otra razón que hace esperable la presencia de alelos nulos en microsatélites heterólogos es que, ésta aumenta cuanto mayor es la separación evolutiva entre la especie en la que se desarrolló el SSR y la especie en la cual se usa. En este estudio los SSR se desarrollaron para *Mytilus edulis*, *Mytilus trossulus* o *Mytilus galloprovincialis* y se usaron en *Mytilus chilensis*, por lo que la presencia de alelos nulos es esperable.

**c) Independencia de los loci:** Los loci utilizados deben ser independientes, es decir, no mostrar desequilibrio de ligamiento. Muchas veces es probable que el desequilibrio de ligamiento encontrado se deba a deriva de algunos cromosomas en alta frecuencia puramente por azar (Hartl y G.Clark, 1989).

### **Desequilibrio de ligamiento**

Luego de aplicar la corrección de Bonferroni, los resultados del desequilibrio de ligamiento indicaron que los genotipos en los cinco loci microsatélites eran independientes sin detectarse desequilibrio de ligamiento (Apéndice 4 y 5).

### **Estimación de las frecuencias genotípicas y alélicas**

Los cinco loci microsatélites analizados fueron polimórficos en las seis localidades estudiadas (Apéndice 6). Se detectaron un total de 52 alelos en los 300 individuos

analizados y 37 alelos en 250 individuos de localidades de Chile, en promedio se encontraron 6,9 alelos por locus considerando los 300 individuos y 6,6 alelos por locus con 250 individuos colectados en Chile. El locus *Mgu1* presentó el mayor número de alelos, 14 en Piedra Azul (PA) y Pichicolo (PI), el con menor número de alelos fue *Mg17* con dos alelos en Pichicolo (PI). Para los 250 individuos colectados en Chile todos los loci mostraron distribución de alelos comunes entre los sitios, sólo se encontró un alelo privado en baja frecuencia de 0,02 en la localidad de Pichicolo (PI) para el locus *Mgu3*. Considerando los 300 individuos analizados se encontraron tres alelos privados para *Mgu1* con frecuencias de 0,04; 0,34 y 0,02; en *Mgu3* se detectaron cinco alelos privados de los cuales dos tenían frecuencias de 0,02, otros dos con frecuencias de 0,24 y uno con frecuencia de 0,0008. Para *MT203* sólo se presentó un alelo privado, con frecuencia de 0,0008, mientras que para *MT282* dos alelos privados cuyas frecuencias fueron 0,02 y 0,12. Finalmente para *Mg17* fueron cuatro alelos privados con frecuencias de 0,0816; 0,449; 0,0408 y 0,1428. Todos los alelos privados detectados al considerar los 300 individuos corresponden a la localidad de Galicia, España. Es interesante, este hallazgo pues la presencia de estos alelos privados, podría ser útil para identificar el origen chileno o gallego en una muestra de choritos. Cabe mencionar que el alelo privado encontrado con sólo 250 individuos de origen chileno está presente en la población de Galicia, España, por lo tanto, para la totalidad de individuos no es contabilizado (Cuadro 10).

La frecuencia del alelo más común no excedió el 0,95 (Toro *et al.*, 2006), por lo tanto, los cinco loci microsatélites usados en *Mytilus chilensis* y *M. galloprovincialis* fueron polimórficos en todas la localidades estudiadas.

### **Estimación de la diversidad genética y parentesco**

El contenido de información polimórfica (PIC) indica la calidad de información que posee un marcador microsatélite, su valor varía entre 0 y 1, donde valores superiores a 0,5 y más cercanos a uno se consideran muy informativos, mientras que los valores entre 0,25 y 0,5 son medianamente informativos y los valores inferiores a 0,25 poco informativos (Martínez *et al.*, 2006, Felmer *et al.*, 2008). En los loci del estudio *Mgu1* tuvo el mayor valor de PIC con 0,857 (con 300 individuos) y 0,864 (con 250 individuos), *Mgu3* tuvo el menor valor de 0,451 (300 individuos) y 0,402 (250 individuos) seguido por *Mg17* con un valor de 0,484 (300 individuos) y 0,435 (250 individuos). Los demás loci presentaron resultados considerados informativos, es decir, fueron mayores a 0,5. Al contabilizar la localidad de Galicia (GA) los índices de información polimórfica aumentan debido a que esta población presenta más alelos, y algunos diferentes a los presentes en las localidades de Chile (Cuadro 10 y 11).

La  $H_O$  para 300 muestras estudiadas fluctuó entre 0,140 (*Mgu3*) y 0,483 (*MT282*), para 250 muestras varió entre 0,076 y 0,536 en los mismos loci. La  $H_E$  con seis localidades presentó valores entre 0,516 (*Mgu3*) y 0,879 (*Mgu1*) y con cinco localidades el menor valor fue

0,473 (*Mgu3*) y el mayor 0,885 (*Mgu1*). Los marcadores con los valores extremos son los mismos con seis o cinco localidades analizadas (Cuadro 11).

Los valores de  $F_{IS}$  positivos indican déficit de heterocigotos en relación a los valores esperados de Hardy-Weinberg (H-W), indicando una desviación significativa del equilibrio. Para los loci *Mgu1*, *Mgu3*, *MT203* y *Mgl7* ninguna de las localidades está en equilibrio, todas están desviadas significativamente de H-W. Los valores de  $F_{IS}$  por localidad muestran desviación significativa de H-W para todas las localidades en todos los loci, a excepción de Canutillar (CN) y Canal Coldita-Piedra blanca (CB) para el locus *MT282* (Cuadro 10). Diz y Presa (2008, 2009) y Li *et al.* (2009) utilizando el mismo tipo de marcadores han tenido resultados equivalentes en el estudio de mejillones. El déficit de heterocigotos encontrado puede deberse a que el locus esté bajo selección, a la presencia de alelos nulos (falsa lectura del heterocigoto provocando exceso de homocigotos), altos niveles de consanguineidad (apareamiento entre individuos emparentados dentro de la población) o a una subestructuración dentro de la población (efecto Wahlund) (Murphy *et al.*, 1990, Aranguren-Méndez *et al.*, 2005, Enriquez-Espinoza y Grijalva-Chon, 2010). El efecto Wahlund no puede descartarse como causante del déficit de heterocigotos en las localidades en que todos los loci se vieron afectados.

El  $r_{xy}$  promedio en las 6 localidades analizadas al estimar el parentesco genético entre pares de individuos pertenecientes a un mismo sitio (valores de la diagonal en el Cuadro 12) fue de  $0,070 \pm 0,052$ , mayor que el valor de  $-0,012 \pm 0,071$  obtenido entre individuos de localidades diferentes (mezcla al azar, valores fuera de la diagonal Cuadro 12). El test de permutaciones por genotipos realizado para ver la significancia del valor de  $r_{xy}$  total indicó que es significativamente distinto de cero ( $P=0,004$ ). Los valores esperados de parentesco para las relaciones progenitor-progenie, hermanos completos, medio hermanos son 0,5, 0,5 y 0,25; respectivamente y 0 para individuos no emparentados (Araneda *et al.* 2004). Los valores negativos de  $r_{xy}$  pueden ocurrir si los genotipos de los dos individuos comparados muestran menos alelos idénticos por descendencia que los esperados por azar (Camara *et al.*, 2008).

Cuadro 10. Estimadores de diversidad genética de *Mytilus chilensis* y *Mytilus galloprovincialis* en localidades de Chile y una muestra comercial de Galicia.

LOCUS		GA	IP	PA	PI	CN	CB
<i>Mgu 1</i>	n	50	50	50	50	50	50
	A	12	13	14	14	13	12
	Ho	0,480	0,240	0,500	0,300	0,340	0,500
	He	0,847	0,866	0,902	0,886	0,883	0,888
	PIC	0,820	0,843	0,884	0,866	0,862	0,868
	F <sub>is</sub> (WyC)	0,436	0,725	0,448	0,664	0,617	0,440
<i>Mgu 3</i>	n	50	50	50	50	50	50
	A	10	4	4	4	4	4
	Ho	0,460	0,100	0,160	0,040	0,041	0,040
	He	0,729	0,555	0,634	0,491	0,394	0,291
	PIC	0,698	0,471	0,566	0,386	0,328	0,257
	F <sub>is</sub> (WyC)	0,371	0,821	0,750	0,919	0,897	0,864
<i>MT 203</i>	n	50	50	50	50	50	50
	A	9	9	9	9	9	9
	Ho	0,540	0,560	0,380	0,420	0,420	0,500
	He	0,804	0,753	0,769	0,729	0,817	0,717
	PIC	0,774	0,720	0,729	0,687	0,787	0,689
	F <sub>is</sub> (WyC)	0,331	0,259	0,508	0,426	0,488	0,305
<i>MT 282</i>	n	50	50	50	50	50	50
	A	5	4	4	4	4	4
	Ho	0,220	0,480	0,420	0,560	0,620	0,600
	He	0,366	0,649	0,653	0,649	0,614	0,563
	PIC	0,345	0,570	0,587	0,572	0,540	0,471
	F <sub>is</sub> (WyC)	0,401	0,263	0,359	0,139	-0,009	-0,067
<i>Mg 17</i>	n	50	50	50	50	50	50
	A	7	3	3	2	3	3
	Ho	0,102	0,235	0,222	0,163	0,380	0,150
	He	0,767	0,547	0,536	0,502	0,540	0,563
	PIC	0,727	0,467	0,450	0,373	0,428	0,456
	F <sub>is</sub> (WyC)	0,868	0,574	0,588	0,678	0,298	0,736
Todos	n	50	50	50	50	50	50
	A	8,6	6,6	6,8	6,6	6,4	6,4
	Ho	0,360	0,323	0,336	0,297	0,360	0,358
	He	0,703	0,674	0,699	0,651	0,650	0,605
	PIC	0,673	0,614	0,643	0,577	0,589	0,548
	F <sub>is</sub> (WyC)	0,481	0,528	0,531	0,565	0,458	0,456

Desviación significativa ( $P < 0.008$ ) del equilibrio de Hardy-Weinberg después de corrección secuencial de Bonferroni, A: número de alelos, H<sub>o</sub>: heterocigocidad observada, H<sub>e</sub>: Heterocigocidad esperada, PIC: contenido de información polimórfica, F<sub>is</sub>: índice de fijación según Weir y Cockerham.

Cuadro 11. Estimadores de diversidad genética global por locus de *Mytilus chilensis* (n=250) y *Mytilus galloprovincialis* (n=50).

LOCUS	A		Ho		He		PIC		F <sub>IS</sub>		F <sub>ST</sub>		F <sub>IT</sub>	
	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5	6	5
<i>Mgu 1</i>	18	15	0,393	0,376	0,879	0,885	0,857	0,864	0,555	0,579	0,036	0,039	0,570	0,568
<i>Mgu 3</i>	10	5	0,140	0,076	0,516	0,473	0,451	0,402	0,720	0,850	0,160	0,163	0,759	0,757
<i>MT 203</i>	11	10	0,470	0,456	0,765	0,757	0,731	0,723	0,388	0,397	0,004	0,004	0,391	0,388
<i>MT 282</i>	6	4	0,483	0,536	0,582	0,626	0,514	0,548	0,171	0,137	0,099	0,114	0,255	0,271
<i>Mg 17</i>	7	3	0,209	0,230	0,576	0,538	0,484	0,435	0,645	0,575	0,054	0,054	0,667	0,672
<b>Global</b>	52	37	0,339	0,335	0,663	0,656	0,607	0,594	0,496	0,508	0,071	0,075	0,529	0,531

Los resultados de parentesco presentados en el Cuadro 12, indican que en general no hay evidencia de apareamiento entre individuos emparentados, por lo tanto es poco probable que la consanguinidad cause parte del déficit de heterocigotos porque, aunque los resultados del test de parentesco indican que los pares de individuos dentro de cada localidad estaban más estrechamente relacionados que lo que lo están pares de individuos de localidades diferentes, ninguno de estos valores indicaron relación mayor entre los individuos que la esperable por azar (Cuadro 12). La fecundación del género *Mytilus* ocurre en el medio acuático donde se liberan los gametos. Kordos y Burton (1993), Natunewicz y Epifanio (2001), Natunewicz *et al.* (2001) y Véliz *et al.* (2006) señalan que parches discretos de larvas se podrían mantener en la columna de agua durante días y hasta semanas en este escenario es posible que las larvas emparentadas se dispersen en grupos sin mezclarse, y que bajo ciertas condiciones, larvas del mismo grupo familiar sean transportadas en el mismo cuerpo de agua y se fijen en un mismo lugar, influenciando así la estructura genética en la etapa adulta.

Como se mencionó previamente, la presencia de alelos nulos (Shields *et al.*, 2010) es un fenómeno frecuente en genética de poblaciones de bivalvos marinos y podría explicar parte del déficit de heterocigotos en los loci que mostraron desviaciones del equilibrio de H-W en este estudio. Toro *et al.* (2006) sugieren que los alelos nulos no pueden ser la única razón causante del déficit de heterocigotos, dado que en su estudio con alozimas (marcador que no es influenciado por la presencia de alelos nulos), también se encontró déficit generalizado de heterocigotos en todos los loci y desviaciones del equilibrio Hardy – Weinberg. Gardeström *et al.* (2008) y Presa *et al.*, (2002) también reportaron déficit de heterocigotos y posible presencia de alelos nulos en algunos loci en *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus trossulus*. Se ha reportado que la presencia de alelos nulos tuvo efectos menores en diferenciación poblacional, distancias genéticas y asignación de individuos a poblaciones y que la corrección de las frecuencias alélicas debido a la presencia de alelos nulos no modificó los resultados obtenidos (Chapuis y Estoup, 2007, Gardeström *et al.*, 2007, Diz y Presa, 2008).

Cuadro 12. Valor promedio de parentesco ( $r_{xy}$ ) entre pares de individuos resultante al comparar localidades basado en 5 loci microsatélites

$r_{xy}$	GA	IP	PA	PI	CN	CB
GA	0,108	-0,084	-0,063	-0,064	-0,122	-0,142
IP		0,025	0,000	0,037	0,028	0,053
PA			0,020	0,007	-0,012	-0,030
PI				0,046	0,050	0,060
CN					0,066	0,097
CB						0,153

GA: Galicia; IP: Isla peel; PA: Piedra azul; PI: Pichicolo; CN: Canutillar II; CB: Canal coldita - Piedra blanca

### **Estructura poblacional**

El análisis factorial de correspondencia (AFC) por localidades muestra la similitud de los genotipos multilocus en un gráfico tridimensional (Figura 3), que explica el 91,88% de la variación genotípica total al considerar las muestras de las seis localidades. El 70,05% de la variación de los genotipos multilocus de los individuos entre las localidades es explicada por el eje 1, que separa la localidad Galicia (GA) del resto de las localidades, corroborando que estas muestras pertenecen a una población que tiene una genética muy distinta a las localidades Chilenas, pues pertenece a otra especie de mitílidos. El eje 2 explica el 13,59% de la variación y separa la localidad de Canal Coldita – Piedra Blanca (CB) de las demás, mientras que el eje 3 explica el 8,23% que separa Canutillar (CN) y Pichicolo (PI) de las otras localidades.

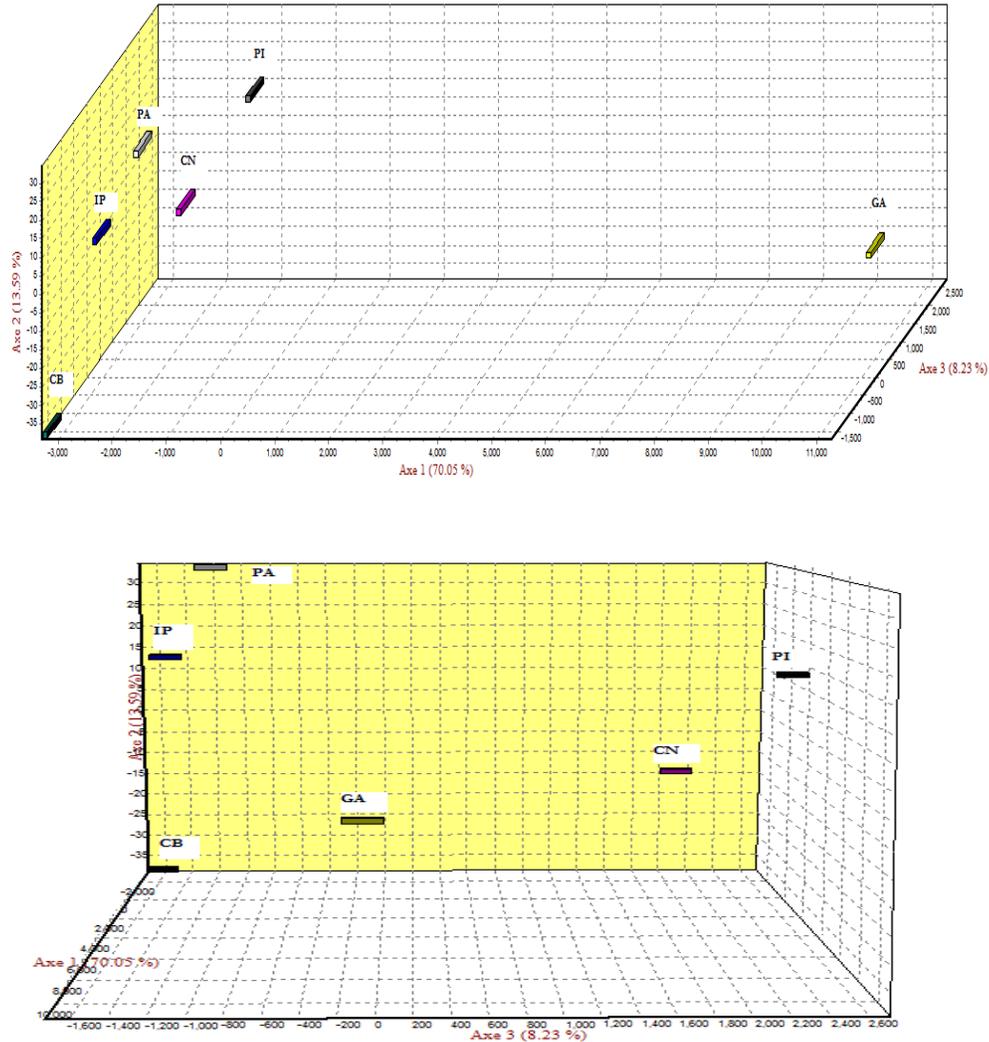


Figura 3: Análisis factorial de correspondencia (AFC) por localidades, ejes 1, 2 (superior) y 3 (inferior).

### Diferenciación genética

El valor de  $F_{ST}$  global considerando las seis localidades es altamente significativo (intervalo de confianza al 95%: 0,02519 – 0,10913) e indica que el 7,1% de la varianza total de las frecuencias alélicas está entre las localidades (Cuadro 13), y que el 92,9 % de la varianza entre las frecuencias alélicas se explicaría por la variación intra localidades. Cuando se usaron los datos de cinco localidades (sólo localidades chilenas) el valor de  $F_{ST}$  global fue de 0,075 (7,5% de variación inter poblacional) indicando la baja diferenciación genética que hay en la zona bajo estudio en el Sur de Chile. Al analizar entre pares de sitios (Cuadro 13) el mayor valor de  $F_{ST}$  (0,179) se da entre las localidades de Canal Coldita – Piedra

Blanca (CB) y Galicia (GA) considerando las seis localidades, resultado que tiene sentido dado que se trata de localidad de hemisferios distintos y especies diferentes. Para las cinco localidades del sur de Chile el valor mayor es 0,074 entre Canal Coldita – Piedra Blanca (CB) y Piedra azul (PA). Ocho de los quince test realizados mostraron valores de  $F_{ST}$  significativos después de la corrección para comparaciones múltiples (Rice, 1989) y de estos ocho, cinco corresponden a pares con la localidad de Galicia.

Toro *et al.* (2006) y Carcamo *et al.* (2005) utilizando alozimas también han encontrado diferenciación genética baja con valores globales de  $F_{ST}$  de 0,0303 y 0,0122, respectivamente al estudiar la estructura poblacional de *Mytilus chilensis*. El  $F_{ST}$  global obtenido en este estudio fue bajo (0,075) y significativamente distinto de cero, sugiriendo una estructura genética detectable y con probablemente un alto nivel de flujo genético entre localidades separadas por hasta 1.360 km (Isla Peel, IP y Canutillar, CN) a lo largo de la costa chilena estudiada (Cuadro 14). El flujo genético es favorecido por el sistema reproductivo (fertilización externa), la prolongada etapa pelágica de las larvas y las condiciones oceanográficas de la zona (Toro *et al.*, 2004a, Toro *et al.*, 2006). El conocimiento actual sobre manejo de semillas sugiere que la transferencia de semillas entre zonas donde se encuentra la especie a causa de la acción antrópica, probablemente ha reducido las diferencias genéticas que naturalmente existían entre estas localidades en Chile, provocando la homogeneidad genética interlocalidades (Diz y Presa, 2009). Sin embargo, la población de Punta Arena analizada por Toro *et al.* (2004c; 2006) parece ser genéticamente divergente de las poblaciones de distribución más al Norte, patrón que no se vio corroborado en este estudio.

Cuadro 13: Estimación de  $F_{ST}$  entre pares de localidades de *M. chilensis* basada en 5 loci microsatélite

FST	IP	PA	PI	CN	CB
GA	0,107	0,098	0,108	0,146	0,179
IP		0,012	0,000	0,015	0,028
PA			0,019	0,039	0,074
PI				0,004	0,026
CN					0,006

Valores oscurecidos no son significativos después de la corrección de Bonferroni para múltiples test. GA: Galicia; IP: Isla Peel; PA: Piedra Azul; PI: Pichicolo; CN: Canutillar II; CB: Canal Coldita - Piedra Blanca.

Cuadro 14: Estimación del número de migrantes (Nm) entre pares de localidades de *M. chilensis* basada en 5 loci microsatélite.

Nm	PA	PI	CN	CB
IP	41,167	0,000	32,833	17,357
PA		25,816	12,321	6,257
PI			124,500	18,731
CN				82,833

Nm > 1 indica un alto valor de flujo génico. IP: Isla Peel; PA: Piedra Azul; PI: Pichicolo; CN: Canutillar II; CB: Canal Coldita - Piedra Blanca.

El dendrograma (Figura 4) de relaciones entre localidades construido a partir de la matriz de distancia genética de Reynolds mostró a la localidad de Isla Peel (IP) más separada de las otras localidades, los valores de bootstrap que indican la repetibilidad de los nodos, fueron altos, el valor más bajo se da entre Galicia (GA) y Piedra Azul (PA).

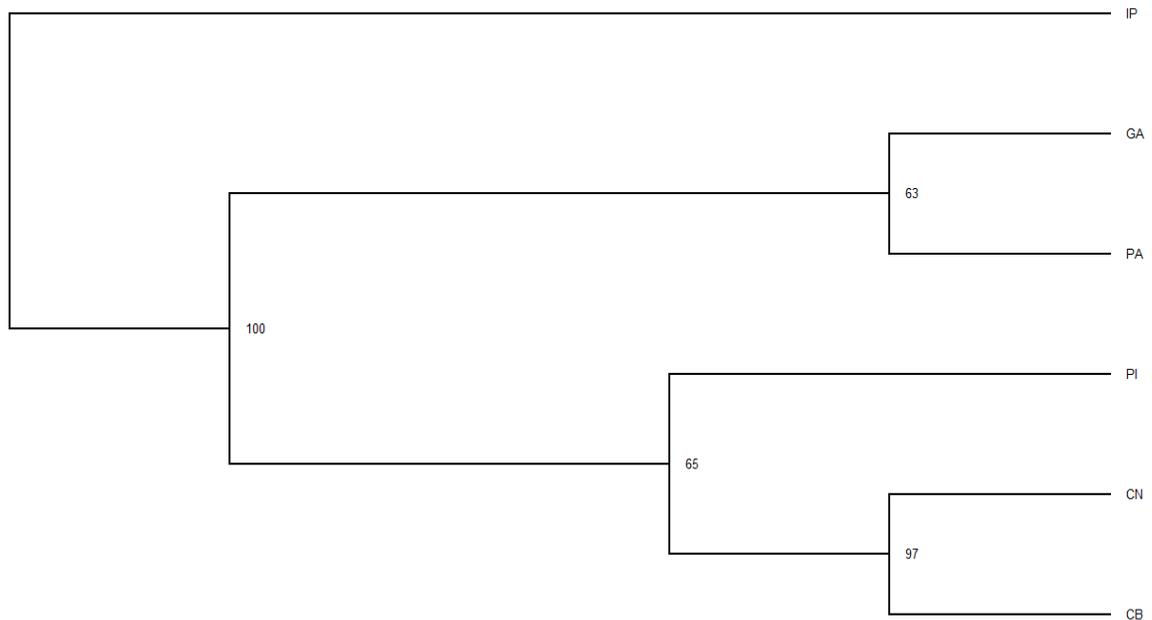


Figura 4: Dendrograma no enraizado que muestra la relación entre las localidades utilizando la distancia genética de Reynolds para seis localidades.

GA: Galicia IP: Isla Peel, PA: Piedra Azul, PI: Pichicolo, CN: Canutillar, CB: Canal Coldita – Piedra Blanca.

El test de Mantel no mostró correlación significativa ( $r= 0,76$ ;  $P=0,196$ ) entre la matriz de divergencia genética ( $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ ) y la de distancia geográfica entre las seis localidades analizadas.

## CONCLUSIONES

De acuerdo al marcador RFLP ME 15 - ME 16 *Aci I*, la especie *Mytilus chilensis*, es predominante en la zona de estudio en el Sur de Chile.

En la zona de estudio también se encuentra la presencia de alelos de *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus trossulus* en muy baja frecuencia, indicando la existencia de posibles híbridos.

La diferenciación genética de la zona es baja, pero significativa, producto posiblemente de un alto nivel de flujo genético.

La población de *Mytilus galloprovincialis* originaria de España presenta un acervo genético distinto de las poblaciones de *Mytilus chilensis* provenientes de la zona sur de Chile.

Se determinó que las poblaciones de *Mytilus chilensis* se agrupan en un nodo genético que a su vez se agrupa con *Mytilus galloprovincialis*. Esto apoya la hipótesis de que *Mytilus chilensis* forma parte del complejo *Mytilus* y que existirían varias de sus especies presentes en las costas de Chile.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, M. and A. K. Sparks. 1970. Chromosome number structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. The Biological Bulletin 138: 1- 13.
- Araneda, C., C. Correa, N. Lam, E. Uribe, M. Camiruaga y P. Iturra. 2004. Asignación de paternidad-maternidad y parentesco cercano en un plantel de avestruces (*Struthio camelus*), utilizando seis loci microsatélites polimórficos. Avances en Producción Animal 29(1-2): 3-14.
- Araneda, C. 2005. Marcadores genéticos basados en PCR. Pp 13-33. En: Díaz, N., C. Araneda, P. Iturra y R. Neira. El uso de marcadores genético moleculares en el mejoramiento genético de peces. Serie publicaciones para la acuicultura n°4. Fundación para la Innovación Agraria (FIA). 65p.
- Aranguren-Méndez, J. A., R. Roman, W. Isea-Villasmil, Y. Villasmil y J. Jordana. 2005. Los microsatélites (SSR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. Archivos Latinoamericanos de producción animal, 13(1): 1 -6.
- Astorga, M.P. 2008. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. Pp 277-287. En: Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (Eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. Puerto Montt, Chile 20-24 de agosto de 2007. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO.
- Beaumont, M. A. and D. J. Balding. 2004. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. Molecular Ecology, 13(4): 969-980.
- Beaumont A. R., G. Turner, A. R. Wood and D. O. F. Skibinski. 2005. Laboratory hybridizations between *Mytilus* species and performance of pure species and hybrid veliger larvae at lowered salinity. Journal of molluscan studies, 71(3): 303-306.
- Beaumont, A. R., M. P. Hawkins, F. L. Doig, I.M. Davies, and M. Snow. 2008. Three species of *Mytilus* and their hybrids identified in a Scottish Loch: natives, relicts and invaders? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 367(2): 100-110.
- Belkhir K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste and F. Bonhomme. 1996. GENETIX 4,05, Logiciel sous Windows <sup>TM</sup> pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome,

Population, Interactions: CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier France.

Belkhir, K., V. Castric, and F. Bonhomme. 2002. Program Note: IDENTIX, a software to test for relatedness in a population using permutation methods. *Molecular Ecology Notes* (2):611-614.

Bierne, N., P. Borsa, C. Daguin, D. Jollivet, F. Viard, F. Bonhomme, and P. David. 2003. Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Molecular Ecology* 12: 447-461.

Borsa, P., V. Rolland and C. Daguin-Thiébaud. 2012. Genetics and taxonomy of Chilean smooth-shelled mussels *Mytilus* spp. (Bivalvia: Mytilidae). *Comptes Rendus Biologies* 335: 51-61.

Bovo, D., M. Rugge and Y. H. Shiao. 1999. Origin of spurious multiple bands in the amplification of microsatellite sequences. *Mol Pathol*, 52 (1):50-51.

Camara, M. D., S. Evans and C. J. Langdon. 2008. Parental relatedness and survival of Pacific oysters from a naturalized population. *Journal of shellfish research*, 27(2): 323-336.

Camus, P. A. 2005. Introducción de especies en ambientes marinos chilenos: no sólo exóticas, no siempre evidentes. *Revista Chilena de Historia Natural* 78: 155-159.

Cárcamo, C., A. Comensaña, F. Winkler and A. Sanjuan. 2005. Allozyme identification of mussels (Bivalvia: *Mytilus*) on the pacific coast of South America. *Journal of Shellfish Research* 24: 1101-1115.

Chapuis, M. P. and A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution*, 24(3):621-631.

Clasing, E., A., Oñate y H., Arriagada. 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. 36p.

Coghlan, B. and E. Gosling. 2007. Genetic structure of hybrid mussel populations in the west of Ireland: two hypotheses revisited. *Marine Biology*, 150(5): 841-852.

Cruz, F., M. Pérez and P. Presa. 2005. Distribution and abundance of microsatellites in the genome of bivalves. *Gene* 346: 241-247.

Daguin, C. And P. Borsa. 2000. Genetic relationships of *M galloprovincialis* Lmk populations worldwide. Evidence from nuclear-DNA markers. pp.389-397. *In*: H. E.

Crame A., Taylor J., Bivalve Systematics and Evolution, vol. 177. Geological Society of London Special Publications.

Dias, P. J., A. Dordor, D. Tulett, S. Piertney, I. M. Davies and M. Snow. 2009. Survey of mussel (*Mytilus*) species at Scottish shellfish farms. *Aquaculture Research*, 40(15): 1715-1722.

Díaz, N. 2005. Marcadores genético moleculares. Pp 4-12. *En: Díaz, N., C. Araneda, P. Iturra y R. Neira. El uso de marcadores genético moleculares en el mejoramiento genético de peces. Serie publicaciones para la acuicultura n°4. Fundación para la Innovación Agraria (FIA). 65p.*

Diz, A. P. and P. Presa. 2008. Regional patterns of microsatellite variation in *Mytilus galloprovincialis* from the Iberian Peninsula. *Marine Biology*, 154(2): 277-286.

Diz, A. and P. Presa. 2009. The genetic diversity of *Mytilus galloprovincialis* in Galician Rías (NW Iberian estuaries). *Aquaculture* 287: 278-285.

Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.

Enriquez-Espinoza, T. L. y J. M. Grijalva-Chon 2010. Diversidad genética de *Crassostrea gigas* y *Crassostrea corteziensis* de un laboratorio de producción del noroeste de México. *Ciencias marinas*, 36(4): 333-344.

Excoffier, L., T. Hofer and M. Foll. 2009. Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity*, 103: 285-298.

Felmer, R., B. Sagredo, R. Chávez, S. Iruira, C. Folch, L. Parra, A. Catrileo and M. Ortiz. 2008. Implementation of a molecular system for traceability of beef based on microsatellite markers. *Chilean Journal of Agricultural Research* 68(4): 342-351.

Felsenstein, J. 2009. Phylogeny Inference Package PHYLIP, Version 3.69. Department of Genome Sciences and Department of Biology. University of Washington, Seattle, WA, USA.

Fernández, M. and J. C. Castilla. 2005. Marine conservation in Chile: Historical perspective, lessons, and challenges. *Conservation Biology* 19(6): 1752-1762.

Fernández-Tajes, J., A. Longa, J. García-Gil, Y. Chiu, Y. Huang, J. Méndez and R. Lee. 2011. Alternative PCR-RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification. *European Food Research and Technology* 233: 791-796.

Figueras, A. 2007. Biología y cultivo del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) en Galicia. Consejo superior de investigaciones científicas. Madrid, España. 289p.

Gardeström, J., R. T. Pereyra and C. Andre. 2008. Characterization of six microsatellite loci in the Baltic blue mussel *Mytilus trossulus* and cross-species amplification in North Sea *Mytilus edulis*. Conservation Genetics 9: 1003-1005.

Gérard, K., N. Bierne, P. Borsa, A. Chenuil and J. P. Féral. 2008. Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. Mussels from Northern and Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations. Molecular Phylogenetics and Evolution 49: 84-91.

González, J. 2005. South Pearl Co.: Nuevo emprendimiento en exportación de *Mytilus chilensis* (chorito). Tesis Magíster en Administración. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Económicas y Administrativas. Santiago, Chile. 42p.

Groenenberg, D. S. J., F. P. Wesselingh, S. Rajagopal, J. M. Jansen, M. M. Bos, G. van der Velde, E. Gittenberger, B. W. Hoeksema, H. Raad and H. Hummel. 2011. On the identity of broad-shelled mussels (Mollusca, Bivalvia, *Mytilus*) from the Dutch delta region. Contributions to Zoology 80(2): 95-106.

Hartl, D. L. and G. A. Clark, A. 1989. Principles of population genetics. Sunderland, Massachusetts U.S.A.: Sinauer Associates, Inc. Publisher.

Helm, M. 2006. El futuro de los criaderos: tecnologías en desarrollo. pp. 173-182. *En*: Helm, M.M., N. Bourne, A. Lovatelli (Eds). Cultivo de bivalvos en criadero: un manual práctico. FAO Documento Técnico de Pesca. No. 471. Roma, FAO. 184p.

Hilbish, T. J., A. Mullinax, S. I. Dolven, A. Meyer, R. K. Koehn and P. D. Rawson. 2000. Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of transequatorial migration. Marine Biology 136: 69-77.

Hilbish, T. J., E. W. Carson, J. R. Plante, L. A. Weaver and M. R. Gilg. 2002. Distribution of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and their hybrids in open-coast populations of mussels in southwestern England. Marine Biology 140: 137-142.

Holsinger, K. E. and B. S. Weir. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting  $F_{st}$ . Nature Reviews Genetics 10: 639-650.

Inoue, K., S. Odo, T. Noda, S. Nakao, S. Takeyama, E. Yamaha, F. Yamasaki and S. Harayama. 1997. A possible hybrid zone in the *Mytilus edulis* complex in Japan revealed by PCR markers. Marine Biology 128: 91-95.

Jarne, P. and P. J. L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.

Kalmes, R. and J. L. Huret. 2001. Hardy-Weinberg model. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* 5(2): 156-163.

Kijewski, T., J. W. M. Wijsman, H. Hummel and R. Wenne. 2009. Genetic composition of cultured and wild mussels *Mytilus* from The Netherlands and transfers from Ireland and Great Britain. *Aquaculture* 287: 292-296.

Kordos, L. M., and Burton, R. S. 1993. Genetic differentiation of Texas Gulf Coast populations of the blue crab *Callinectes sapidus* *Marine Biology*, 117(2): 227-233.

Krapivka, S., J. E. Toro, A. C. Alcapán, M. Astorga, P. Presa, M. Pérez and R. Guíñez. 2007. Shell-shape variation along the latitudinal range of the Chilean blue mussel *Mytilus chilensis* (Hupe 1854). *Aquaculture Research* 38: 1770-1777.

Ladoukakis, E. M. and E. Zouros. 2001. Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. *Molecular Biology and Evolution* 18 (7): 1168-1175.

Larraín, M. A., N. F. Díaz, C. Lamas, C. Vargas, C. Araneda. 2012. Genetic composition of *Mytilus* species in mussel populations from southern Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research* 40 (4): 1077-1084.

Larraín, M. A., N. F. Díaz, C. Lamas, C. Uribe, C. Araneda. 2014. Traceability of mussel (*Mytilus chilensis*) in southern Chile using microsatellite molecular markers and assignment algorithms. Exploratory survey. *Food Research International* 62: 104-110.

Lenstra, J. A., L. F. Groeneveld, H. Eding, J. Kantanen, J. L. Williams, P. Taberlet, E. L. Nicolazzi, J. Sölkner, H. Simianer, E. Ciani, J. F. Garcia, M. W. Bruford, P. Ajmone-Marsan and S. Weigend. 2012. Molecular tools and analytical approaches for the characterization of farm animal genetic diversity. *Animal Genetics* 43(5): 483-502.

Liu, Z. J. and J. F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238: 1-37.

López, J. L. 2005. Role of proteomics in taxonomy: the *Mytilus* complex as a model of study. *Journal of Chromatography B* 815: 261-274.

Mantel, N. 1967. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Research*, 27 (2 Part 1): 209-220.

- Márquez, C. 2006. Genotoxicidad en organismos acuáticos: el caso del mejillón *Mytilus californianus* (Conrad, 1837). pp. 189-193. *En*: Pimentel, A. E., A. R. Ortiz, M. Breña. Tópicos de genética. Sociedad mexicana de genética. México. 386p.
- Martínez, D. R., D. A. López, M. L. Villar, F. R. Figueroa y H. F. Gajardo. 1986. Depredación de organismos intermareales por roedores. *Biota* 2: 87-90.
- Martínez-Lage, A., F. Rodríguez-Fariña, A. González-Tizón and J. Méndez. 2005. Origin and evolution of *Mytilus* mussel satellite DNAs. *Genome* 48: 247-256.
- Martínez, Z. R. D. y Z. E. N. Fernández. 2006. Avances en la Caracterización genética y Morfología del bovino criollo de origen patagónico. pp. 1-6. Cátedra de Genética Animal Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Argentina.
- Miranda, S., J. C. Rosas, L. L. Aranda, R. Ortiz, M. Ponce y H. Ríos. 2006. Análisis molecular de la diversidad genética de frijol común manejada por campesinos en Cuba. *Agronomía Mesoamericana* 17 (3): 369-382.
- McDonald, J. H., Seed, R. and R. K. Koehn. 1991. Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the northern and southern hemispheres. *Marine Biology* 111: 323-333.
- Meirmans, P. G. and P. W. Hedrick. 2011. Assessing population structure: FST and related measures. *Molecular Ecology Resources*, 11(1): 5-18.
- Murphy RW, J. W. Sites, DG. Buth, CH. Haufler. 1990. Proteins. pp. 45–126. *In*: Isosyme electrophoresis. *In*: Hillis DM, Moritz C (eds.), *Molecular Systematics*. Sinauer Associates Inc., Massachusetts.
- Murray, B. W. 1996. The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. Graduate course in biology (Dept. of Biology, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada) Available from <http://helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html>.
- Natunewicz, C. C., and C. E. Epifanio. 2001. Spatial and temporal scales of patches of crab larvae in coastal waters. *Marine Ecology Progress Series* 212: 217-222.
- Natunewicz, C. C., C. E. Epifanio and R. W. Garvine. 2001. Transport of crab larval patches in the coastal ocean. *Marine ecology. Progress series* 222: 143-154.
- O'reilly, P., and J. M. Wright. 1995. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *Journal of Fish Biology* 47(sA): 29-55.
- Osorio, C. 2002. Moluscos marinos en Chile: especies de importancia económica: guía para su identificación. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. Santiago, Chile. 211p.

- Ouagajjou, Y., P. Presa, M. Astorga and M. Pérez. 2011. Microsatellites of *Mytilus chilensis*: A genomic print of its taxonomic status within *Mytilus* sp. *Journal of Shellfish Research*, 30(2): 325-330.
- Pacheco, E. y S. Olave. 2000. Cultivo de choritos en la zona sur de Chile. Proyecto "Innovaciones en la tecnología de cultivo de chorito (*Mytilus chilensis*), tendientes a mejorar la calidad y rentabilidad de la actividad mitilícola en la X Región". Curso. Valparaíso, Chile. Instituto de Fomento Pesquero (IFOP). 23p.
- Page, R. D. 1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer applications in the biosciences: CABIOS.*, 12(4): 357-358.
- Park, S. 2001. Microsatellite toolkit. Department of Genetics, Trinity College Dublin, Ireland.
- Plaza, H., Y. Ortúzar, M. Gonzalez y J. Aros. 2005. Estado de situación y perspectivas de la industria del chorito. Fishing partners Ltda. 67p. Disponible en <http://www.fishingpartners.cl/publicaciones/200507151158550.Estado%20de%20situacion%20y%20perspectivas%20de%20la%20industria%20del%20chorito.pdf>. Leído el 24 de marzo de 2009.
- Pompanon, F., A. Bonin, E. Bellemain and P. Taberlet. 2005. Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 6(11): 847-846.
- Presa, P., M. Pérez and A. Diz. 2002. Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus* spp.). *Conservation Genetics* 3: 441-443.
- Queller, D. C. and K. F. Goodnight. 1989. Estimating Relatedness Using Genetic Markers. *Evolution*, 43(2): 258-275.
- Raymond, M. and F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49(6): 1280-1283.
- Rego, I., A. Martínez, A. González-Tizón, J. Vieites, F. Leira and J. Méndez. 2002. PCR technique for identification of mussel species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1780-1784.
- Reynolds, J., B. S. Weir and C. C. Cockerham. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105(3): 767-779.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43(1): 223-225.

Riginos, C. and W. Cunningham. 2005. Invited review: Local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* X *Mytilus trossulus*) hybrid zones. *Molecular Ecology* 14: 381-400.

Rivera, M. and J. M. Grijalva. 2006. Genetic variability and differentiation in cultured White shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei* with low and high growth. *Ciencias Marinas* 32(1A): 1-11.

Rousset, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology. Resources* 8(1): 103-106.

Saavedra, C., D. T. Stewart, R. R. Standwood and E. Zouros. 1996. Species-specific segregation of gender-associated mitochondrial DNA types in an area where two mussel species (*Mytilus edulis* and *M. trossulus*) hybridize. *Genetics* 143:1359-1367.

Saavedra, C., M. I. Reyero and E. Zouros. 1997. Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics* 145: 1073-1082.

Santaclara, F. J., M. Espiñeira, A. G. Cabado, A. Aldasoro, N. Gonzalez-Lavín and J. M. Vieites. 2006. Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:8461 -8470.

Shields, J. L., Heath, J. W. and D. D. Heath. 2010 Marine landscape shapes hybrid zone in a broadcast spawning bivalve: introgression and genetic structure in Canadian west coast *Mytilus*. *Marine Ecology Progress Series* 399: 211-223.

Skurikhina, L. A., Kartavtsev, Y. F., Chichvarkhin, A. Y. & Pan'kova, M. V. (2001). Study of two species of mussels, *Mytilus trossulus* and *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mytilidae), and their hybrids in Peter the Great Bay of the Sea of Japan with the use of PCR markers. *Russian Journal of Genetics* 37 (12): 1448-1451.

SUBPESCA, PROCHILE y SONAPESCA. 2009. Chile azul: Principales recursos pesqueros y de acuicultura. 3era ed. Ziom Advertising. Santiago, Chile. 89p.

SUBPESCA. 2012. Vedas por especie D.S. N° 176-83 Modifica período de Veda Estacional del recurso Chorito. (F.D.O. 14-09-1983) 1983. Disponible en: [http://www.subpesca.cl/normativa/605/articles-81772\\_documento.pdf](http://www.subpesca.cl/normativa/605/articles-81772_documento.pdf) . Leído el 10 de enero de 2012.

SUBPESCA. 2010. Informe exportaciones 2010. Disponible en: [http://www.subpesca.cl/controls/neochannels/neo\\_ch847/neoch847.aspx?appinstanceid=855&pubid=1588](http://www.subpesca.cl/controls/neochannels/neo_ch847/neoch847.aspx?appinstanceid=855&pubid=1588). Leído el 10 de enero de 2012.

SUBPESCA. 2011. Informe sectorial de pesca y acuicultura. Departamento de análisis sectorial. Disponible en: [http://www.subpesca.cl/controls/neochannels/neo\\_ch847.aspx?appinstanceid=855&pubid=1588](http://www.subpesca.cl/controls/neochannels/neo_ch847.aspx?appinstanceid=855&pubid=1588). Leído el 10 de enero de 2012.

Taggart, J. B., R. A. Hynes, P. A. Prodöhl and A. Ferguson. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. *Journal Fish Biology* 40: 963-965.

Tarifeño, E., R. Galleguillos, J. Gardner, I. Lépéz, D. Arriagada, A. Llanos, S. Astete, S. Ferrada, S. Rodríguez y S. Gacitúa. 2005. Presencia del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) (Bivalvia, Mollusca) en las costas de la región del Biobío, Chile. *En: XXV Congreso de Ciencias del Mar*. Colacmar. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Viña del mar, Chile. p. 16–20.

Tarifeño, E., R. Galleguillos, A. Llanos-Rivera, D. Arriagada, S. Ferrada, C B. Canales-Aguirre y M. Seguel. 2012. Identificación errónea del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) como la especie, *Mytilus chilensis* (Hupe 1854) en la Bahía de Concepción, Chile. *Gayana* 76 (2): 167-172.

Tautz, D. 1993. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. pp21-28. *In: Peña, S. D. J., R. Chakraborty, J. T. Epplen and A. J. Jeffreys. DNA fingerprinting: state of the science*. Birkhäuser Verlag. Basel, Switzerland. 469p.

Toledo, C. 2008. Mitilicultura al 2010, los desafíos de un sector con proyección. *Revista Aqua* 20 (marzo): 28-36.

Toro, J. E. 1998. PCR-based nuclear and mtDNA markers and Shell morphology as an approach to study the taxonomic status of Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Bivalvia). *Aquatic Living Resources* 11 (5): 347-353.

Toro, J. E., D. J. Innes and R. J. Thompson. 2004a. Genetic variation among life-history stages of mussels in a *Mytilus edulis*-*M. trossulus* hybrid zone. *Marine Biology* 145: 713-725.

Toro, J. E., A. C. Alcapán, A. M. Vergara and J. A. Ojeda. 2004b. Heritability estimates of larval and spat Shell height in the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) produced under controlled laboratory conditions. *Aquaculture Research* 35: 56-61.

Toro, J. E., J. A. Ojeda and A. M. Vergara. 2004c. The genetic structure of *Mytilus chilensis* (Hupe 1854) populations along the Chilean coast based on RAPDs analysis. *Aquaculture Research*, 35 (15): 1466-1471.

Toro, J. E., J. A. Ojeda, A. M. Vergara, G. C. Castro and A. C. Alcapán. 2005. Molecular characterization of the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) demonstrates

evidence for the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* in southern Chile. *Journal of Shellfish Research* 24(4): 1117-1122.

Toro, J. E., G. C. Castro, J. A. Ojeda and A. M. Vergara. 2006. Allozymic variation and differentiation in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis*, along its natural distribution. *Genetics and Molecular Biology* 29 (1): 174-179.

Toro, M. A., J. Fernández and A. Caballero. 2009. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livestock Science* 120: 174-195.

Tóht, G., Z. Gáspári and J. Jurka. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.

Uriarte, I. 2008. Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en Chile. Pp. 61-75. *En: Lovatelli, A., A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. Puerto Montt, Chile 20-24 de agosto de 2007. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. 359p.*

Van Oosterhout, C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills and P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.

Veliz, D., P. Duchesne, E. Bourget and L. Bernatchez. 2006. Genetic evidence for kin aggregation in the intertidal acorn barnacle (*Semibalanus balanoides*). *Molecular Ecology* 15(13): 4193 - 4202.

Vidal, R., C. Penaloza, R. Urzua and J. E. Toro. 2009. Screening of ESTs from *Mytilus* for the detection of SSR markers in *Mytilus californianus*. *Molecular Ecology Resources* 9(5): 1409 - 1411.

Weir, B. S. and C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

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

Westfall, K. M., P. H. Wimberger and J. P. A. Gardner. 2010. An RFLP assay to determine if *Mytilus galloprovincialis* Lmk. (*Mytilidae; Bivalvia*) is of Northern or Southern hemisphere origin. *Molecular Ecology Resources* 10(3): 573 - 575.

- Wood, A. R., Beaumont, A. R., Skibinski, D. O. F. & 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: 61-66.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114 - 138.
- Wright, S. 1949. The genetical structure of populations. *Annals of Human Genetics* 15(1): 323 - 354.
- Wright, S. 1965. Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution* 19: 395 - 420.
- Wright, S. 1968. *Evolution and the genetics of populations, vol. 4. Variability Within and Among Natural Populations*. University of Chicago Press, Chicago.
- Wright, S. 1969. *Evolution and the genetics of populations, vol. 2. The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press, Chicago.
- Yu, H. and Q. I. Li. 2007. Development of EST-SSRs in the Mediterranean blue mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Molecular Ecology Notes* 7(6): 1308 - 1310.
- Zagal, C. y C. Hermosilla. 2008. *Guía de invertebrados marinos del sur de Chile*. Editorial Fantástico Sur. Punta Arenas, Chile. 264p.
- Zouros, E., A. Oberhauser, C. Saavedra and K. R. Freeman. 1994. An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Genetics* 91: 7463-7467.
- Zouros, E. 2000. The exceptional mitochondrial DNA system of the mussel family Mytilidae. *Genes And Genetic Systems* 75: 313-318.

## ANEXOS

### Anexo I. Protocolo para determinar el tamaño de los fragmentos amplificados

#### Preparación del molde para gel de poliacrilamida

1. Los vidrios se limpian con alcohol 70 % y papel al menos dos veces. Se deja secar el alcohol y se revisa si hay alguna suciedad en los vidrios, si lo hubiese se quita y se limpia nuevamente. Usar siempre las mismas caras del vidrio hacia el interior del molde.
2. Se aplica SIGMACOTE® (SL2-100ML, SIGMA) en ambos vidrios en la cara interior del molde, en cantidad suficiente para cubrir ambos con una capa delgada y pareja, esparcida con papel con movimientos circulares.
3. Se colocan los espaciadores de 0.5 mm entre ambos vidrios en dos de los lados, y se sujeta todo con pinzas para preparar el molde.

#### Preparación de la solución de poliacrilamida

1. Se prepara la mezcla del gel de poliacrilamida al 6%, según las indicaciones ver cuadro a continuación:

Solución	Cantidad
	mL
TBE 5X	3.0
ACRILAMIDA 19:1 40% p/v Winkler®	5.0
APS 10%	0.2
AGUA DESTILADA	21.8

2. Se prepara un tapón para los vidrios en tubo eppendorf de 2ml con la misma solución preparada anteriormente, más 10  $\mu$ l de Temed y se coloca rápidamente en la base de los vidrios. Se espera 10 minutos aproximadamente para que el tapón polimerice.
3. Se agrega 50  $\mu$ L de Temed a la mezcla y se vacía el contenido en el molde evitando la formación de burbujas dentro del gel, se coloca la peineta y se deja polimerizar unos 30 a 45 minutos.

### Montaje del gel en la cámara

1. Se saca cuidadosamente la peineta y las pinzas. Se limpia bien de todos los restos de acrilamida sobre la superficie exterior.
2. Se coloca el molde en la cámara de electroforesis. Los compartimentos superior e inferior deben estar llenos con tampón de corrida TBE 0,5 X, se limpian los restos de gel y burbujas del espacio que ocupaba la peineta.
3. Se cargan entre 1,5 y 2  $\mu\text{L}$  de producto de PCR con tampón de carga 6X en cada pocillo.
4. Se programa la fuente de poder en 30 mA y 10 Watts, y luego de 1 hora y 30 minutos se saca el gel.

### Anexo II. Tinción del gel

Los geles de poliacrilamida fueron teñidos con un Nitrato de Plata, utilizando un kit de tinción para ácidos nucleicos, marca Winkler.

Se saca el molde de la cámara de electroforesis, se separan los vidrios y se lleva el gel a la solución de fijación, luego tinción, se enjuaga el gel dos veces como máximo con agua destilada, se coloca en la solución de revelado (hasta que aparezcan los fragmentos), y por último se pasa a la solución de detención. El gel debe permanecer 30 minutos en cada una de las soluciones, aunque en el revelado puede ser un poco más, hasta que aparezcan los fragmentos amplificados. Las soluciones se preparan según lo indicado a continuación:

Proceso	Solución	Agua destilada
	mL	
Fijación	10 sol. A	90
Tinción	2 sol. B	98
Revelado	10 sol. D y 2 sol. C	88
Detención	10 sol. E	90

## APÉNDICES

### Apéndice 1. Protocolo de Extracción de ADN modificado de Taggart *et al.* (1992)

#### Materiales y reactivos.

- Solución 1 (tampón de lisis): 0.2 M EDTA pH 8.0; 0.5% sodium lauroylsarcosine (SIGMA L-5125) ó 50 mM Tris HCl pH 8.0; 100 mM EDTA pH 8.0; 100 mM NaCl; 1% SDS
- Proteinasa K 20 mg·mL<sup>-1</sup>
- RNAsa (libre de DNAsa) 20 mg·mL<sup>-1</sup>
- Fenol equilibrado pH 8.0
- Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1)
- Etanol 92%
- Etanol 70%
- Tampón TE (1/4 TE; ¾ agua PCR)
- Tubos Eppendorff con tapa estériles
- Puntas de micropipetas estériles
- Baño de agua o incubador a 55 o 37° C

#### Día 1

1. Agregar a cada tubo Eppendorff 375 µL de la Solución 1 y 10 µL de Proteinasa K
2. Agregar tejido a cada tubo (por ejemplo 70 mg músculo, 10 mg hepatopáncreas), secar con un papel absorbente el exceso de Etanol en el tejido.
3. Agitar vigorosamente e incubar (baño de agua) durante la noche, con movimiento, a una temperatura de 37° C.

#### Día 2

1. Agregar 5 µL de RNAsa a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos e incubar por 60 minutos a una temperatura de 37° C con agitación.
2. Agregar 130 µL de NaCl saturado. Agitar vigorosamente.
3. Centrifugar 12.000 rpm por 10 minutos.
4. Trasladar sobrenadante a tubo limpio de 2 mL.
5. Agregar 400 µL de Fenol a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos y luego agitarla por 20 minutos.
6. Agregar 400 µL de Cloroformo: Alcohol isoamílico a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos y luego agitarla por 20 minutos.
7. Centrifugar los tubos (10.000 rpm) durante 5 minutos

8. Cuidadosamente remover 300  $\mu\text{L}$  de la fase acuosa superior (usando una punta de micropipeta de boca ancha) a un tubo eppendorff nuevo. **Nota:** No tocar el material de la interfase. Usar solo las fases acuosas libres de desechos residuales.
9. Agregar 900  $\mu\text{L}$  de Etanol 92% frío. Mezclar mediante vigorosa inversión de los tubos 6 veces. El ADN debiera precipitar (condensarse).
10. Centrifugar 2 minutos a 5.000 rpm.
11. Extraer el Etanol volteando cuidadosamente el tubo.
12. Agregar 1 mL de Etanol 70%.
13. Agitar suavemente durante 30 minutos.
14. Cuidadosamente extraer el Etanol volteando el tubo.
15. Cuidadosamente extraer el Etanol restante (50 a 100  $\mu\text{L}$ ) usando una micropipeta.
16. Permitir que el ADN se seque parcialmente a temperatura ambiente (5 minutos), NO permitir que se seque completamente.
17. Resuspender el pellet en el Tampón TE (100  $\mu\text{L}$ ). Permitir que el ADN se disuelva a temperatura ambiente por dos días.
18. Cargar en gel de agarosa al 0,7% para ver resultados.
19. Luego congelar el ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Apéndice 2. Genotipos de *Mytilus chilensis*.**

<b>Muestra</b>	<b>Mgu 1 A</b>	<b>Mgu 1 B</b>	<b>Mgu 3 A</b>	<b>Mgu 3 B</b>	<b>MT 203 A</b>	<b>MT 203 B</b>	<b>MT 282 A</b>	<b>MT 282 B</b>	<b>Mgu 17 A</b>	<b>Mgu 17 B</b>
IP01	155	155	147	147	178	188	335	335	315	315
IP02	155	155	147	147	178	178	335	353	315	315
IP03	153	153	147	147	178	184	335	335	315	315
IP04	197	197	147	147	178	178	335	353	0	0
IP05	181	217	147	147	178	178	335	335	315	333
IP06	155	155	143	143	188	202	335	335	333	333
IP07	187	187	147	147	188	202	335	335	333	333
IP08	197	197	147	147	178	178	335	353	315	315
IP09	177	177	147	147	178	188	353	353	315	315
IP10	153	181	147	147	178	198	353	353	0	0
IP11	171	217	143	143	178	178	335	353	291	291
IP12	153	153	147	159	178	188	353	353	0	0
IP13	153	153	147	147	178	184	353	353	333	333
IP14	173	173	143	143	178	202	353	353	0	0
IP15	153	153	147	157	202	202	335	353	291	333
IP16	181	181	143	143	194	206	353	353	315	315
IP17	155	171	143	143	178	198	335	353	0	0
IP18	153	153	143	143	178	198	347	347	0	0
IP19	177	177	143	143	178	178	335	347	291	291
IP20	155	155	143	143	178	202	335	347	0	0
IP21	187	217	143	143	178	202	335	353	0	0
IP22	115	187	143	143	178	202	335	335	315	333
IP23	181	217	143	143	206	220	335	353	0	0
IP24	155	155	143	143	178	178	335	353	315	315
IP25	155	155	147	147	198	198	353	353	315	333
IP26	155	155	147	147	178	202	335	353	333	333
IP27	177	177	157	157	178	198	335	335	315	315
IP28	153	153	157	157	178	188	347	347	0	0
IP29	181	217	143	143	184	202	347	347	333	333
IP30	115	115	143	143	198	216	353	353	315	333
IP31	151	151	143	143	178	178	335	347	315	315
IP32	187	187	143	143	178	184	353	353	0	0
IP33	153	153	143	143	188	188	353	353	315	315

(Continúa)

**Apéndice 2. (Continuación)**

<b>Muestra</b>	<b>Mgu 1 A</b>	<b>Mgu 1 B</b>	<b>Mgu 3 A</b>	<b>Mgu 3 B</b>	<b>MT 203 A</b>	<b>MT 203 B</b>	<b>MT 282 A</b>	<b>MT 282 B</b>	<b>Mgu 17 A</b>	<b>Mgu 17 B</b>
IP34	155	155	143	143	194	206	335	335	0	0
IP35	153	181	143	143	178	178	335	347	315	333
IP36	155	155	147	147	178	178	335	353	315	333
IP37	177	177	143	143	184	184	353	353	0	0
IP38	155	155	147	159	178	178	353	353	315	315
IP39	177	177	143	157	188	188	335	353	333	333
IP40	155	155	143	157	194	206	335	353	315	315
IP41	155	155	143	143	188	188	335	347	315	315
IP42	181	181	143	143	188	188	335	353	315	315
IP43	151	151	143	143	178	178	347	347	315	315
IP44	153	153	143	143	188	188	347	347	0	0
IP45	151	151	147	147	188	188	335	335	315	315
IP46	153	177	147	147	178	178	335	347	0	0
IP47	155	163	143	143	178	198	335	347	315	333
IP48	151	151	143	143	194	206	353	381	0	0
IP49	171	181	143	143	198	216	353	381	315	315
IP50	175	175	143	143	178	198	335	353	291	291
PA01	115	187	143	143	178	178	353	353	315	315
PA02	175	217	143	143	188	188	353	353	333	333
PA03	115	175	143	143	188	188	353	353	315	315
PA04	175	175	143	143	188	188	353	353	333	333
PA05	115	217	143	143	178	178	353	353	315	315
PA06	155	175	143	143	188	188	335	353	315	315
PA07	155	171	147	159	178	178	353	381	315	315
PA08	181	181	159	159	188	202	335	353	315	333
PA09	163	163	157	157	188	188	353	353	0	0
PA10	189	189	157	157	188	188	353	353	315	333
PA11	155	173	157	157	188	188	335	335	315	315
PA12	163	163	157	157	178	184	335	353	315	315
PA13	155	155	147	159	192	192	335	353	291	291
PA14	153	181	147	147	178	178	347	347	0	0
PA15	173	177	147	147	178	178	335	353	333	333

(Continúa)

**Apéndice 2. (Continuación)**

<b>Muestra</b>	<b>Mgu 1 A</b>	<b>Mgu 1 B</b>	<b>Mgu 3 A</b>	<b>Mgu 3 B</b>	<b>MT 203 A</b>	<b>MT 203 B</b>	<b>MT 282 A</b>	<b>MT 282 B</b>	<b>Mgu 17 A</b>	<b>Mgu 17 B</b>
PA16	175	175	143	143	194	206	353	353	315	315
PA17	181	181	147	147	178	184	353	353	333	333
PA18	115	163	147	147	188	188	335	335	0	0
PA19	155	155	147	147	198	216	353	353	291	291
PA20	155	181	147	147	178	178	353	381	0	0
PA21	187	187	147	159	194	206	335	353	291	291
PA22	173	181	143	157	178	178	335	353	0	0
PA23	155	177	143	143	178	178	353	353	333	333
PA24	173	187	143	143	198	198	335	335	315	333
PA25	151	151	143	143	194	194	347	347	333	333
PA26	173	173	143	143	178	178	353	353	315	333
PA27	217	217	143	143	178	202	353	353	333	333
PA28	155	197	143	143	178	178	335	353	291	315
PA29	177	177	143	143	184	184	335	353	315	333
PA30	155	155	143	143	184	184	335	353	315	333
PA31	155	177	147	159	188	202	353	381	333	333
PA32	153	153	147	159	188	188	353	353	315	315
PA33	177	187	147	159	188	188	335	335	315	315
PA34	187	187	147	147	178	178	335	335	333	333
PA35	151	177	147	159	188	202	335	353	315	315
PA36	151	151	147	147	188	202	353	381	315	333
PA37	151	217	147	147	178	194	335	381	315	315
PA38	155	155	147	147	188	188	347	347	315	315
PA39	155	155	147	147	198	216	347	347	315	333
PA40	155	177	147	147	178	178	335	335	315	315
PA41	177	177	147	147	198	216	347	347	315	315
PA42	175	181	147	147	178	198	335	347	315	315
PA43	181	181	147	147	178	198	347	353	315	315
PA44	155	181	147	147	194	206	335	347	315	315
PA45	155	155	147	147	178	178	353	353	315	315
PA46	153	181	147	147	178	188	335	347	315	333
PA47	171	181	147	147	178	202	335	353	315	315

(Continúa)

**Apéndice 2. (Continuación)**

<b>Muestra</b>	<b>Mgu 1 A</b>	<b>Mgu 1 B</b>	<b>Mgu 3 A</b>	<b>Mgu 3 B</b>	<b>MT 203 A</b>	<b>MT 203 B</b>	<b>MT 282 A</b>	<b>MT 282 B</b>	<b>Mgu 17 A</b>	<b>Mgu 17 B</b>
PA48	153	153	147	147	178	178	347	347	333	333
PA49	163	177	147	147	188	188	353	353	315	315
PA50	175	175	147	147	188	202	347	347	315	315
PI01	173	225	147	147	178	178	335	353	315	315
PI02	155	181	147	147	198	216	353	381	315	315
PI03	163	181	147	147	178	178	335	353	333	333
PI04	177	177	147	147	178	178	335	353	315	315
PI05	181	181	147	147	178	198	335	353	315	333
PI06	177	177	147	147	178	178	335	347	333	333
PI07	163	163	147	147	178	178	335	353	315	315
PI08	155	155	147	147	184	184	335	353	315	315
PI09	155	155	147	147	178	188	335	335	315	333
PI10	153	163	147	147	178	178	335	335	333	333
PI11	151	171	141	147	188	188	353	353	315	315
PI12	155	187	147	147	188	188	353	353	333	333
PI13	173	173	147	147	184	184	353	381	0	0
PI14	173	225	147	147	188	188	335	353	0	0
PI15	189	189	143	143	178	184	335	335	333	333
PI16	151	151	143	143	188	188	353	353	315	315
PI17	155	155	143	143	178	202	353	353	315	315
PI18	163	163	143	143	198	202	335	353	333	333
PI19	155	177	143	143	178	178	335	353	0	0
PI20	153	153	143	143	188	188	353	353	315	333
PI21	163	177	143	143	178	178	335	335	315	333
PI22	153	153	143	143	188	188	347	347	315	315
PI23	181	181	143	143	206	220	335	353	333	333
PI24	163	163	143	143	178	178	335	353	333	333
PI25	155	175	143	143	202	216	353	353	333	333
PI26	181	181	143	143	178	178	335	335	0	0
PI27	181	181	143	143	178	178	335	353	333	333
PI28	163	163	147	147	198	202	335	353	315	315
PI29	217	217	147	159	202	216	347	347	333	333

(Continúa)

## Apéndice 2. (Continuación)

<b>Muestra</b>	<b>Mgu 1 A</b>	<b>Mgu 1 B</b>	<b>Mgu 3 A</b>	<b>Mgu 3 B</b>	<b>MT 203 A</b>	<b>MT 203 B</b>	<b>MT 282 A</b>	<b>MT 282 B</b>	<b>Mgu 17 A</b>	<b>Mgu 17 B</b>
PI30	181	181	147	147	188	188	335	353	315	315
PI31	181	181	147	147	188	202	353	381	0	0
PI32	181	181	143	143	178	178	335	335	333	333
PI33	155	155	143	143	188	202	335	347	333	333
PI34	153	153	143	143	188	202	335	335	333	333
PI35	155	177	143	143	178	184	335	353	315	315
PI36	187	187	147	147	178	184	335	347	315	315
PI37	155	181	143	143	178	178	353	353	315	315
PI38	177	177	143	143	178	178	335	353	315	315
PI39	175	181	143	143	178	178	335	353	333	333
PI40	187	187	143	143	178	178	347	353	315	315
PI41	189	189	143	143	192	202	353	353	315	315
PI42	177	177	143	143	178	184	353	381	315	315
PI43	197	197	143	143	178	184	335	335	315	333
PI44	153	155	143	143	178	178	335	335	315	315
PI45	181	181	143	143	184	184	347	347	315	333
PI46	155	155	143	143	188	188	335	353	315	333
PI47	163	177	143	143	188	202	347	347	333	333
PI48	153	153	143	143	184	202	347	347	315	315
PI49	153	153	143	143	178	184	335	353	0	0
PI50	189	189	143	143	178	178	335	353	0	0
CN01	197	197	143	143	178	202	353	353	315	315
CN02	175	175	147	147	194	206	335	353	315	333
CN03	225	225	143	143	194	206	353	381	315	333
CN04	173	173	143	143	188	188	335	347	315	333
CN05	163	163	143	143	178	198	335	353	333	333
CN06	181	181	143	143	188	202	335	335	333	333
CN07	217	217	143	143	188	202	335	353	333	333
CN08	181	181	143	143	188	188	335	353	315	333
CN09	181	181	143	143	198	216	347	353	315	333
CN10	177	177	147	147	188	202	335	335	315	333
CN11	177	197	143	143	194	206	335	353	315	315

(Continúa)

## Apéndice 2. (Continuación)

<b>Muestra</b>	<b>Mgu 1 A</b>	<b>Mgu 1 B</b>	<b>Mgu 3 A</b>	<b>Mgu 3 B</b>	<b>MT 203 A</b>	<b>MT 203 B</b>	<b>MT 282 A</b>	<b>MT 282 B</b>	<b>Mgu 17 A</b>	<b>Mgu 17 B</b>
CN12	163	163	143	143	194	206	335	353	315	315
CN13	187	197	143	143	194	206	353	353	315	315
CN14	153	153	143	143	194	206	353	353	333	333
CN15	163	163	143	157	178	178	335	335	333	333
CN16	153	163	143	143	198	202	335	335	315	315
CN17	151	163	147	147	188	188	353	353	315	333
CN18	163	163	143	143	178	178	353	353	315	315
CN19	181	181	143	143	178	178	347	353	315	333
CN20	163	163	143	143	184	184	353	353	291	291
CN21	155	181	143	143	178	178	353	353	315	315
CN22	155	177	143	143	198	198	335	335	333	333
CN23	153	177	143	143	178	178	335	353	315	333
CN24	181	181	143	143	198	216	347	335	291	333
CN25	155	187	143	143	178	178	335	353	315	315
CN26	175	175	143	143	178	178	335	353	315	315
CN27	151	177	143	143	188	202	335	353	315	333
CN28	175	175	143	143	202	202	347	347	315	333
CN29	177	177	143	143	188	202	353	381	315	333
CN30	115	115	0	0	178	178	353	353	333	333
CN31	153	175	147	159	178	178	335	353	315	333
CN32	175	175	147	147	178	178	347	353	333	333
CN33	153	153	147	147	178	178	335	347	315	315
CN34	173	173	143	143	188	202	353	353	315	315
CN35	175	175	147	147	178	178	335	353	315	333
CN36	175	175	147	147	178	178	347	353	315	333
CN37	155	177	147	147	188	188	353	381	315	315
CN38	177	177	143	143	184	184	353	381	315	315
CN39	177	177	143	143	184	202	353	353	333	333
CN40	155	197	143	143	194	206	335	353	315	333
CN41	187	197	143	143	188	188	353	353	315	315
CN42	155	177	143	143	184	184	335	353	291	315
CN43	177	177	143	143	178	192	353	381	315	333

(Continúa)

## Apéndice 2. (Continuación)

<b>Muestra</b>	<b>Mgu 1 A</b>	<b>Mgu 1 B</b>	<b>Mgu 3 A</b>	<b>Mgu 3 B</b>	<b>MT 203 A</b>	<b>MT 203 B</b>	<b>MT 282 A</b>	<b>MT 282 B</b>	<b>Mgu 17 A</b>	<b>Mgu 17 B</b>
CN44	177	177	143	143	184	184	335	353	315	315
CN45	151	163	147	147	188	188	335	353	333	333
CN46	153	153	147	147	178	184	335	353	333	333
CN47	155	177	143	143	198	198	353	353	333	333
CN48	177	177	143	143	184	184	335	353	333	333
CN49	177	177	143	143	178	178	347	353	315	315
CN50	155	177	147	147	178	178	335	335	315	315
CB01	177	177	143	143	178	178	335	353	333	333
CB02	115	151	143	143	178	178	335	347	0	0
CB03	115	175	147	159	178	198	335	353	333	333
CB04	163	175	143	143	184	184	335	353	315	315
CB05	175	187	147	147	178	188	335	335	333	333
CB06	151	151	147	147	178	194	353	353	315	315
CB07	177	177	143	143	178	178	353	381	333	333
CB08	177	187	143	143	178	184	335	335	0	0
CB09	177	187	143	143	178	178	335	353	315	333
CB10	155	175	143	143	178	188	335	353	333	333
CB11	151	177	143	143	178	178	335	353	333	333
CB12	151	177	143	143	178	178	353	353	0	0
CB13	155	197	143	143	178	178	335	353	333	333
CB14	163	175	143	143	178	178	335	353	333	333
CB15	163	175	143	143	178	194	335	353	333	333
CB16	175	175	143	143	178	178	335	353	0	0
CB17	153	153	143	143	178	198	353	353	291	291
CB18	153	153	143	143	178	178	335	347	333	333
CB19	151	153	143	157	178	178	335	353	315	315
CB20	155	177	143	143	178	188	335	347	315	315
CB21	177	177	143	143	178	194	335	347	315	315
CB22	197	197	143	143	178	198	335	353	315	315
CB23	175	175	143	143	178	178	353	353	315	315
CB24	197	197	143	143	178	194	335	335	333	333
CB25	153	153	143	143	188	188	335	353	315	315

(Continúa)

## Apéndice 2. (Continuación)

<b>Muestra</b>	<b>Mgu 1 A</b>	<b>Mgu 1 B</b>	<b>Mgu 3 A</b>	<b>Mgu 3 B</b>	<b>MT 203 A</b>	<b>MT 203 B</b>	<b>MT 282 A</b>	<b>MT 282 B</b>	<b>Mgu 17 A</b>	<b>Mgu 17 B</b>
CB26	153	153	143	143	198	216	335	335	315	315
CB27	217	217	143	143	192	192	353	353	333	333
CB28	151	151	143	143	178	178	353	353	0	0
CB29	155	177	143	143	198	216	335	353	333	333
CB30	151	151	143	143	178	178	335	335	315	333
CB31	153	153	143	143	178	194	335	347	0	0
CB32	189	189	143	143	198	216	335	353	0	0
CB33	153	187	147	147	178	202	353	353	0	0
CB34	153	177	147	147	194	206	353	353	315	333
CB35	153	197	147	147	184	184	353	353	315	333
CB36	151	151	143	143	178	198	353	353	315	315
CB37	155	155	147	147	192	192	353	353	315	315
CB38	163	177	143	143	188	188	353	353	333	333
CB39	155	177	143	143	192	198	335	353	315	333
CB40	153	153	143	143	178	178	335	353	0	0
CB41	115	175	143	143	178	198	335	353	333	333
CB42	115	115	143	143	188	202	353	353	315	315
CB43	175	175	143	143	192	202	335	353	333	333
CB44	171	171	143	143	178	178	353	381	0	0
CB45	171	175	143	143	178	194	353	353	315	315
CB46	151	153	143	143	198	216	353	381	315	315
CB47	151	153	143	143	188	188	335	353	291	291
CB48	115	217	143	143	184	202	335	353	291	315
CB49	175	175	147	147	178	178	353	353	315	315
CB50	197	197	143	143	188	188	335	353	333	333

**Apéndice 3. Genotipos de *Mytilus galloprovincialis*.**

<b>Muestra</b>	<b>Mgu 1 A</b>	<b>Mgu 1 B</b>	<b>Mgu 3 A</b>	<b>Mgu 3 B</b>	<b>MT 203 A</b>	<b>MT 203 B</b>	<b>MT 282 A</b>	<b>MT 282 B</b>	<b>Mgu 17 A</b>	<b>Mgu 17 B</b>
GA01	155	161	147	147	178	188	335	335	315	315
GA02	181	181	147	147	194	206	335	335	315	315
GA03	161	163	147	153	188	188	335	347	291	291
GA04	197	197	147	153	188	198	335	347	277	277
GA05	181	181	147	153	188	194	347	347	315	315
GA06	161	161	147	157	188	188	335	335	291	315
GA07	161	161	147	147	174	174	335	335	291	291
GA08	161	189	147	147	192	202	353	353	277	325
GA09	161	161	145	153	174	174	335	353	291	291
GA10	161	189	143	143	178	198	335	335	315	315
GA11	161	161	147	157	178	198	335	335	333	333
GA12	181	189	143	151	178	178	335	335	333	333
GA13	181	197	147	153	178	178	335	335	315	315
GA14	163	163	147	147	192	192	335	353	277	325
GA15	161	161	151	153	184	184	335	335	283	283
GA16	181	181	151	151	184	184	335	367	291	291
GA17	163	181	147	153	192	202	335	335	283	325
GA18	163	163	147	147	184	184	335	335	315	315
GA19	189	189	147	147	184	184	335	335	283	283
GA20	181	181	147	157	192	202	353	353	315	315
GA21	163	163	147	147	184	184	335	335	315	315
GA22	163	217	147	147	192	202	335	335	307	307
GA23	163	197	143	143	178	178	335	335	291	291
GA24	163	163	145	145	178	178	335	335	315	315
GA25	171	197	145	157	178	192	335	335	291	291
GA26	155	175	147	159	178	194	335	335	315	315
GA27	163	163	145	157	188	202	335	363	333	333
GA28	179	189	147	147	188	202	335	335	283	283
GA29	197	197	147	157	188	202	335	335	315	315
GA30	163	197	147	147	178	178	335	363	283	283
GA31	163	217	145	145	178	178	347	347	315	315
GA32	161	181	147	159	178	202	335	363	283	283
GA33	177	177	147	147	178	192	335	363	283	315

(Continúa)

**Apéndice 3. (Continuación)**

<b>Muestra</b>	<b>Mgu 1 A</b>	<b>Mgu 1 B</b>	<b>Mgu 3 A</b>	<b>Mgu 3 B</b>	<b>MT 203 A</b>	<b>MT 203 B</b>	<b>MT 282 A</b>	<b>MT 282 B</b>	<b>Mgu 17 A</b>	<b>Mgu 17 B</b>
GA34	189	189	147	147	178	188	347	347	315	315
GA35	163	189	145	145	178	178	335	335	333	333
GA36	181	197	147	157	178	178	335	335	283	283
GA37	163	163	147	147	178	178	335	335	283	283
GA38	163	163	147	147	178	178	335	335	283	283
GA39	163	177	143	143	178	178	335	335	315	315
GA40	163	163	145	149	188	202	335	335	333	333
GA41	163	163	147	147	178	178	335	335	0	0
GA42	177	177	143	157	188	202	335	363	315	315
GA43	163	189	143	153	188	202	335	335	325	325
GA44	161	177	143	153	194	206	335	335	283	283
GA45	163	177	141	141	178	192	335	335	325	325
GA46	181	181	147	153	188	198	335	363	283	283
GA47	161	177	147	169	188	202	335	335	333	333
GA48	155	177	147	147	178	192	335	335	315	315
GA49	155	181	153	153	178	192	335	335	315	315
GA50	145	145	145	145	178	178	335	335	315	315

**Apéndice 4. Desequilibrio de ligamiento entre pares de loci para todas las poblaciones y corrección secuencial de Bonferroni. Número de test (K): 10,  $\alpha$ : 0.05,  $\alpha/K$ : 0.005.**

Locus 1	Locus 2	P-Value	gl	$\alpha$ corregido	Significancia
Mgu 1 A	Mgu 3 A	0.022492	0	0.005	NS
Mgu 1 A	MT 203 A	0.28282	1	0.00555556	NS
Mgu 3 A	MT 203 A	0.534323	2	0.00625	NS
Mgu 1 A	MT 282 A	0.779415	3	0.00714286	NS
Mgu 3 A	MT 282 A	0.045608	4	0.00833333	NS
MT 203 A	MT 282 A	0.012705	5	0.01	NS
Mgu 1 A	Mg 17 A	0.834021	6	0.0125	NS
Mgu 3 A	Mg 17 A	0.757092	7	0.01666667	NS
MT 203 A	Mg 17 A	0.103341	8	0.025	NS
MT 282 A	Mg 17 A	0.747378	9	0.05	NS

**Apéndice 5. Desequilibrio de ligamiento entre pares de loci dentro de cada población y corrección secuencial de Bonferroni. Número de test (K): 60,  $\alpha$ : 0.05,  $\alpha/K$ : 0.00083.**

Población	Locus 1	Locus 2	P-Value	gl	$\alpha$ corregido	Significancia
GA50	MT 203 A	MT 282 A	0.01501	0	0.00083333	NS
CB50	Mgu 3 A	MT 282 A	0.018708	1	0.00084746	NS
PA50	MT 203 A	MT 282 A	0.028972	2	0.00086207	NS
PI50	MT 203 A	MT 282 A	0.029722	3	0.00087719	NS
GA50	Mgu 1 A	Mgu 3 A	0.048408	4	0.00089286	NS
IP50	MT 203 A	Mg 17 A	0.056542	5	0.00090909	NS
GA50	Mgu 1 A	MT 203 A	0.064094	6	0.00092593	NS
PI50	Mgu 1 A	Mgu 3 A	0.06709	7	0.0009434	NS
GA50	MT 282 A	Mg 17 A	0.067552	8	0.00096154	NS
CN50	Mgu 1 A	Mgu 3 A	0.074628	9	0.00098039	NS
PI50	Mgu 3 A	MT 282 A	0.092884	10	0.001	NS
CB50	Mgu 1 A	Mgu 3 A	0.095176	11	0.00102041	NS
IP50	Mgu 3 A	MT 282 A	0.144808	12	0.00104167	NS
IP50	Mgu 1 A	Mg 17 A	0.145584	13	0.00106383	NS
CN50	Mgu 1 A	MT 203 A	0.149396	14	0.00108696	NS
GA50	MT 203 A	Mg 17 A	0.151424	15	0.00111111	NS
PA50	Mgu 3 A	MT 282 A	0.174238	16	0.00113636	NS
PI50	MT 203 A	Mg 17 A	0.229958	17	0.00116279	NS
GA50	Mgu 3 A	MT 203 A	0.24369	18	0.00119048	NS
PI50	Mgu 1 A	MT 282 A	0.250684	19	0.00121951	NS
CB50	Mgu 1 A	MT 203 A	0.271736	20	0.00125	NS
PA50	Mgu 3 A	Mg 17 A	0.274742	21	0.00128205	NS
PA50	MT 203 A	Mg 17 A	0.2827	22	0.00131579	NS
CB50	Mgu 1 A	MT 282 A	0.282894	23	0.00135135	NS
IP50	Mgu 3 A	MT 203 A	0.30389	24	0.00138889	NS
PA50	Mgu 1 A	Mgu 3 A	0.313104	25	0.00142857	NS
CN50	MT 203 A	Mg 17 A	0.32832	26	0.00147059	NS
PA50	Mgu 3 A	MT 203 A	0.33786	27	0.00151515	NS
CN50	MT 203 A	MT 282 A	0.34146	28	0.0015625	NS
IP50	Mgu 3 A	Mg 17 A	0.3703	29	0.0016129	NS
CB50	Mgu 3 A	MT 203 A	0.378714	30	0.00166667	NS
IP50	Mgu 1 A	MT 203 A	0.419028	31	0.00172414	NS
GA50	Mgu 3 A	Mg 17 A	0.428588	32	0.00178571	NS
CN50	MT 282 A	Mg 17 A	0.446812	33	0.00185185	NS
CN50	Mgu 1 A	Mg 17 A	0.489932	34	0.00192308	NS
IP50	Mgu 1 A	MT 282 A	0.540632	35	0.002	NS

(Continúa)

**Apéndice 5. (Continuación)**

Población	Locus 1	Locus 2	P-Value	gl	$\alpha$ corregido	Significancia
CB50	MT 203 A	Mg 17 A	0.545634	36	0.00208333	NS
CB50	Mgu 3 A	Mg 17 A	0.551144	37	0.00217391	NS
CB50	Mgu 1 A	Mg 17 A	0.581366	38	0.00227273	NS
PI50	Mgu 3 A	MT 203 A	0.583924	39	0.00238095	NS
GA50	Mgu 3 A	MT 282 A	0.611774	40	0.0025	NS
PI50	MT 282 A	Mg 17 A	0.644408	41	0.00263158	NS
GA50	Mgu 1 A	MT 282 A	0.687668	42	0.00277778	NS
PI50	Mgu 3 A	Mg 17 A	0.750622	43	0.00294118	NS
CN50	Mgu 3 A	MT 203 A	0.762248	44	0.003125	NS
PI50	Mgu 1 A	MT 203 A	0.774666	45	0.00333333	NS
PI50	Mgu 1 A	Mg 17 A	0.779372	46	0.00357143	NS
CB50	MT 203 A	MT 282 A	0.7866	47	0.00384615	NS
CB50	MT 282 A	Mg 17 A	0.808168	48	0.00416667	NS
PA50	Mgu 1 A	MT 282 A	0.816458	49	0.00454545	NS
CN50	Mgu 1 A	MT 282 A	0.820442	50	0.005	NS
GA50	Mgu 1 A	Mg 17 A	0.823072	51	0.00555556	NS
IP50	MT 203 A	MT 282 A	0.844414	52	0.00625	NS
CN50	Mgu 3 A	Mg 17 A	0.851696	53	0.00714286	NS
CN50	Mgu 3 A	MT 282 A	0.865814	54	0.00833333	NS
IP50	MT 282 A	Mg 17 A	0.92888	55	0.01	NS
PA50	Mgu 1 A	MT 203 A	0.935788	56	0.0125	NS
PA50	Mgu 1 A	Mg 17 A	0.955526	57	0.01666667	NS
PA50	MT 282 A	Mg 17 A	0.991512	58	0.025	NS
IP50	Mgu 1 A	Mgu 3 A	0.999328	59	0.05	NS

**Apéndice 6. Frecuencias alélicas para cinco loci microsatélite en cinco localidades de *Mytilus chilensis* y una localidad de *Mytilus galloprovincialis*.**

Locus	Alelo	Localidades					
		GA	IP	PA	PI	CN	CB
<i>Mgu1</i>	115	-	3.00	4.00	-	2.00	6.00
	145	2.00	-	-	-	-	-
	151	-	8.00	6.00	3.00	3.00	14.00
	153	-	19.00	6.00	12.00	9.00	18.00
	155	4.00	26.00	21.00	17.00	8.00	7.00
	161	17.00	-	-	-	-	-
	163	28.00	1.00	6.00	12.00	13.00	4.00
	171	1.00	3.00	2.00	1.00	-	3.00
	173	-	2.00	6.00	4.00	4.00	-
	175	1.00	2.00	10.00	2.00	13.00	16.00
	177	9.00	11.00	11.00	12.00	24.00	15.00
	179	1.00	-	-	-	-	-
	181	16.00	10.00	13.00	20.00	11.00	-
	187	-	6.00	7.00	5.00	3.00	4.00
	189	10.00	-	2.00	6.00	-	2.00
	197	9.00	4.00	1.00	2.00	6.00	8.00
	217	2.00	5.00	5.00	2.00	2.00	3.00
	225	-	-	-	2.00	2.00	-
	<i>Mgu 3</i>	141	2.00	-	-	1.00	-
143		10.00	58.00	31.00	62.00	74.49	83.00
145		12.00	-	-	-	-	-
147		48.00	33.00	51.00	36.00	23.47	15.00
149		1.00	-	-	-	-	-
151		4.00	-	-	-	-	-
153		12.00	-	-	-	-	-
157		8.00	7.00	9.00	-	1.02	1.00
159		2.00	2.00	9.00	1.00	1.02	1.00
169		1.00	-	-	-	-	-

(Continúa)

## Apéndice 6. (Continuación)

Locus	Alelo	Localidades					
		GA	IP	PA	PI	CN	CB
<i>MT 203</i>	174	4.00	-	-	-	-	-
	178	37.00	44.00	36.00	45.00	34.00	50.00
	184	10.00	6.00	6.00	13.00	12.00	6.00
	188	16.00	18.00	30.00	21.00	18.00	12.00
	192	11.00	-	2.00	1.00	1.00	6.00
	194	4.00	4.00	6.00	-	7.00	7.00
	198	4.00	10.00	7.00	4.00	8.00	10.00
	202	12.00	10.00	7.00	11.00	11.00	4.00
	206	2.00	5.00	3.00	1.00	7.00	1.00
	216	-	2.00	3.00	3.00	2.00	4.00
220	-	1.00	-	1.00	-	-	
<i>MT 282</i>	335	79.00	40.00	28.00	41.00	33.00	37.00
	347	8.00	17.00	18.00	14.00	10.00	5.00
	353	6.00	41.00	49.00	41.00	52.00	55.00
	363	6.00	-	-	-	-	-
	367	1.00	-	-	-	-	-
	381	-	2.00	5.00	4.00	5.00	3.00
<i>Mg 17</i>	277	4.08	-	-	-	-	-
	283	22.45	-	-	-	-	-
	291	13.27	10.29	7.78		4.00	6.25
	307	2.04	-	-	-	-	-
	315	38.78	60.29	60.00	54.65	52.00	45.00
	325	7.14	-	-	-	-	-
	333	12.24	29.41	32.22	45.35	44.00	48.75