



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología Marina

PROFESOR PATROCINANTE:

Dr. Oscar Chaparro T.

Instituto de Biología Marina

Facultad de ciencias

PROFESOR CO-PATROCINANTE:

Dr. Jorge Toro Y.

Instituto de Biología Marina

Facultad de ciencias

**PATRONES REPRODUCTIVOS Y SU INFLUENCIA EN LA
ESTRUCTURA GENÉTICO POBLACIONAL EN DOS ESPECIES
SIMPÁTRICAS DEL GÉNERO *Crepidula* (GASTROPODA:
CALYPTRAEIDAE) EN LA COSTA INTERIOR DE LA ISLA DE
CHILOE.**

**Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al título de Biólogo Marino.**

Alfonso José Schmidt Mery

VALDIVIA – CHILE

2005

AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy sinceramente a mi tutor Dr. Oscar Chaparro, por la paciencia y apoyo recibido, ya que fue un pilar muy importante en mi desarrollo como estudiante y como persona; de verdad muchísimas gracias profe.

Agradezco a toda mi familia, partiendo por Alfonso (Papá) y Carmen Gloria (Mamá), porque tuvieron la confianza y me dieron la oportunidad de llegar a Valdivia para desarrollarme como profesional; viejos muchas gracias de verdad, los quiero mucho. Pero también fueron muy importantes Emilia, Macarena, Martín, Loreto, Rafael, Rene, Sofía, y Zeta, ya que ustedes, a la distancia me dieron una fuerza y un apoyo gigante.

Creo que mi estadía en valdivia no habría sido tan buena y con tan bonitos momentos sino hubieran estado Pancho, Marcos, Paulo, Pacita, Suzanne, Carola, Andrea, Matias, Ronnie, Lis y Rodrigo, gracias por los carretes, chupateras, almuerzos, onces, estudios, son super especiales para mi. Y en forma muy especial agradezco a la Fer (Fernada), por toda su comprensión, risas, apoyo y compañía.

Agradezco a mi co-patrocinante Dr. Jorge Toro, por todo los consejos y trucos necesarios para los análisis moleculares realizados.

No puedo dejar de agradecer a la gente que me dio los consejos y animo necesario para terminar este largooooooooo trabajo, muchas gracias a la Mini (Yina), Macpuches (Mauro y Cristian), Juanita (Yohana), como también Marcela y Rosella.

Por ultimo no puedo dejar de lado a San FONDECYT 1020171 y 1010166, ya que su auspicio fue fundamental en la realización de todo este trabajo.

INDICE GENERAL

INDICE FIGURAS	4
INDICE TABLAS	5
RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCION	9
MATERIALES Y METODOS	12
1.- Muestreo Poblacional	12
2.- Extracción de ADN	12
3.- Medición y Cálculo de la concentración de ADN	13
4.- Amplificación del ADN	14
4.1.- RAPDs	14
4.2.- RFLPs	15
5.- Electroforesis en geles de agarosa	16
6.- Análisis de los datos obtenidos	17
RESULTADOS	18
1.- Identificación de especies	18
2.- Análisis genético poblacional	19
2.1.- Número de bandas amplificadas	19
2.2.- Flujo génico	19
2.3.- Diversidad genética	19
2.4.- Número de loci polimórficos	20
2.5.- Distancia génica	20
2.6.- Heterozigocidad promedio	20
2.7.- AMOVA	21
2.8.- Test de Mantel	21
DISCUSION	22
CONCLUSION	27
BIBLIOGRAFIA	28
ANEXO I – FIGURAS	36
ANEXO II – TABLAS	43

INDICE FIGURAS

- Fig. 1.-** Mapa de la zona de muestreo, indicando cada una de las poblaciones de donde fueron recolectados especímenes de *C. fecunda* y *C. dilatata*.....31
- Fig. 2.-** Patrón de bandas resultantes de la amplificación del ADN por medio de partidor I- COI, en (A) *C. dilatata* y (B) *C. fecunda*, en dos programas de amplificación probados.....32
- Fig. 3.-** Patrón de bandas resultantes después de aplicar la enzima de restricción NLA-IV al producto amplificado (**F = *C. fecunda***; **D = *C. dilatata***; **L = ladder**).....32
- Fig. 4.-** Patrón de bandas resultantes del partidor CRE 35, con el cual se realizó la identificación de especies **D = *C. dilatata*** y **F = *C. fecunda***. La banda con un peso de 380 pb, refleja la existencia de individuos no identificables.....33
- Fig. 5.-** Número de ejemplares de *C. dilatata*, *C. fecunda* y ejemplares no identificados en los diferentes lugares muestreados en la Isla de Chiloé.....33
- Fig. 6.-** Porcentaje de bandas amplificadas, en cada una de las áreas de muestreo donde se encontraron ejemplares de *C. dilatata*.....34
- Fig. 7.-** Número de bandas en cada una de las poblaciones de *C. fecunda* y su distribución en porcentajes.....34
- Fig. 8.-** Diversidad génica intra e interpoblacional (error estándar), en *C. dilatata* y *C. fecunda* *Inter: Cálculo interpoblacional (media; error estándar).....35

Fig. 9.- Flujo génico determinado para ambas especies en estudio; para cada pareja de poblaciones estudiadas Qp = Quempillén, Qm = Quemchi, DI = Dalcahue, QI = Queilen, Ch = Chaiguao, Yd = Yaldad y Inter = Análisis interpoblacional por especies.....35

Fig. 10.- Dendrograma basado en UPGMA sobre las distancias génica de las muestras de *C. fecunda*.....36

Fig. 11.- Dendrograma basado en UPGMA sobre las distancias génica de las muestras de *C. dilatata*.....36

INDICE TABLA

Tabla. 1.- Secuencia de los partidores utilizados que amplificaron patrones de bandas polimórficas.....	38
Tabla. 2.- Número y porcentaje de loci polimórficos, para cada especie y en cada una de las poblaciones estudiadas.....	38
Tabla. 3.- Distancia génica para <i>C. dilatata</i> , obtenida en base a los cálculos bajo de la diagonal (Nei, 1972) y sobre la diagonal (Nei, 1978).....	38
Tabla. 4.- Distancia génica para <i>C. fecunda</i> , obtenida en base a los cálculos bajo de la diagonal (Nei, 1972) y sobre la diagonal (Nei, 1978).....	39
Tabla. 5.- Heterozigocidad promedio, para cada especie en cada una de la poblaciones estudiadas.....	39
Tabla. 6.- Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) para <i>C. dilatata</i> y <i>C. fecunda</i> , mediante 999 permutaciones.....	39
Tabla. 7.- Resumen de las distancias geográficas lineal de cada una de las poblaciones estudiadas.....	40

RESUMEN

En el sur de Chile coexisten *Crepidula dilatata* (Lamarck, 1822) y *Crepidula fecunda* (Gallardo, 1979). Ambas especies tienen una gran similitud morfológica, diferenciándose por el tipo de desarrollo larval y por el tamaño máximo de los individuos adultos. Esto genera dificultades en la identificación de ambas especies. De momento, la diferenciación entre especies, lo representa el mecanismo reproductivo. *C. dilatata*, incorpora huevos nutricios en las ovicapsulas, los que son consumidos durante el desarrollo intracapsular permitiendo la eclosión de juveniles reptantes. En *C. fecunda* el desarrollo intracapsular alcanza al estadio de larva véliger, las que eclosionan permaneciendo aproximadamente 15 días en la columna de agua. De acuerdo a esto, resulta evidente que las estrategias reproductivas (desarrollo directo e indirecto), pudieran influenciar las capacidades de dispersión, lo que repercutiría en el flujo génico y en la estructura genética poblacional de ambas especies. Las técnicas de RAPDs resultaron útiles para la diferenciación de ambas especies y posibilitaron la realización de análisis genéticos poblacionales. En *C. fecunda* (larva pelágica) se identificó un flujo génico y una diversidad génica interpoblacional mayor que en *C. dilatata* (desarrollo directo), presentando poblaciones genéticamente más homogéneas en el rango geográfico estudiado. De este modo, se confirma que el patrón de desarrollo larval (directo o planctónico) influye en la estructura genética poblacional.

SUMMARY

The species *Crepidula dilatata* (Lamarck 1822) and *Crepidula fecunda* (Gallardo 1979) coexists in the southern Chile. Both species have a strong morphological similarity, but differing in the kind of larval development and also in their maximum sizes as mature individuals. This morphological similarity generates difficulties in the identification of both species. At the moment, the differentiation among species is carried out taken into account their reproductive mechanism. *C. dilatata* incorporates nurse eggs inside of the capsule, which are ingested by the embryos during the intracapsular development allowing reaching the juvenile stage before to hatch. In *C. fecunda* the intracapsular development reach up to the early veliger stage, which hatch from the capsules to the water column where they remain about 15 days before to settle. Those different development ways made evident that reproductive strategies (direct and indirect development), could influence on the dispersion capabilities, in the gene flow and in the population genetic structure. The techniques of RAPDs were useful for the differentiation of both species facilitating population genetic analysis.

C. fecunda (with pelagic larva) has a larger gene flow and a strong diversity among population than *C. dilatata* (direct development). The first one presents populations genetically more homogeneous than *C. dilatata* in the studied geographical range. Based on that, it is possible to confirm that pattern of larval development (direct or planktonic) play a large role on the population genetic structure.

INTRODUCCIÓN

Los patrones básicos en las estrategias reproductivas de invertebrados marinos incluyen los ciclos holobentónicos, con un desarrollo embrionario larval directo sin fase larval pelágica, un ciclo totalmente pelágico y uno pelago-bentónico donde el desarrollo larval es mixto. Este último caso, se destaca la presencia de una larva de vida libre en la columna de agua, previo al proceso de asentamiento y metamorfosis en el bentos (Thorson 1950, Mileikovsky 1971, Gallardo 1987, 1989)

La presencia o ausencia de larva pelágica podría influir en las características de las estructuras poblacionales, debido al impacto en la capacidad de dispersión de las especies (flujo génico) (Hunt 1993, Hoskin 1997, Collin 2001, 2003). Así por ejemplo, una larva pelágica (lecitotrófica o planctotrófica), puede permanecer en la columna de agua por semanas o meses, a merced de las corrientes, aumentando de este modo el nivel de dispersión, en contraste con una estrategia reproductiva de tipo directo, donde los individuos eclosionan como juveniles desde las estructuras incubatorias maternas (Collin 2001). La pérdida de la fase larval pelágica podría favorecer la divergencia evolutiva en especies con poblaciones localmente adaptadas, diversificando entre ellas la expresión de ciertos rasgos de su historia de vida y a su vez sus frecuencias génicas. En contraste, una mayor dispersión larval implicaría una mayor plasticidad fenotípica para adaptarse a condiciones generalizadas y de menor especificidad, dado el mayor rango geográfico que generalmente colonizan las especies con larva libre (Strathmann 1980, Gallardo 1989, Pechenik 1999, Marshall & Keough 2003).

Por lo tanto, la estrategia reproductiva con presencia de una larva pelágica, aseguraría, de no encontrarse barreras geográficas o corrientes oceánicas particulares, una mayor dispersión larval (mayor flujo génico), pero disminuiría su estructura poblacional (Strathmann 1986, Hunt 1993, Collin 2001), resultando en poblaciones genéticamente homogéneas. Esto no ocurriría con una estrategia de desarrollo directo, donde la capacidad de dispersión a lugares distantes se ve limitada, debido a la ausencia de estructuras natatorias larvales, generando con ello poblaciones genéticamente más heterogéneas (Holmes *et al.* 2004).

Diferentes son las alternativas que utilizan las especies para favorecer la dispersión génica. Así por ejemplo, se tiene la presencia de larvas planctónicas; el asentamiento de especies sésiles sobre especies móviles (Collin 2001); la llegada al tracto digestivo de algunos vertebrados móviles (e.g. bivalvo antártico *Myrella*, Domaneschi 2002), y por último el rafting, fenómeno que alude al uso de estructuras flotantes, (e. g. algas o trozos de maderas) como medio de dispersión (Picken 1980, Highsmith 1985, Johannesson 1988, Martel & Chia 1991, Worcester 1994,).

El rafting resulta particularmente relevante como mecanismo de dispersión para especies incubadoras, ya que las hembras podrían ser transportadas llevando consigo una cohorte de descendientes suficientemente numerosa para potencialmente llegar a generar una nueva población (Highsmith 1985, O'Foighil 1989).

Los moluscos gastrópodos pertenecientes a la familia Calyptraeidae se caracterizan por ser hermafroditas protándricos e incluyen en su mecanismo reproductivo, la formación de cápsulas y el cuidado parental físico. En las costas de Chile coexisten *Crepidula dilatata* (Lamarck 1822) y *Crepidula fecunda* (Gallardo 1979) presentando una distribución desde los 29° 58' S hasta 41° 52' S y de 12° 5' S hasta 41° 31' S, respectivamente (Collin 2003). Ambas especies habitan tanto en el nivel intermareal como en el submareal utilizando sustratos duros para el asentamiento (Gallardo 1977). Estas especies llegan a presentar densidades importantes en estuarios y bahías en la costa interior de la Isla de Chiloé, como así también en bahías y fiordos protegidos de los canales chilenos australes. Ambas especies tienen una gran similitud morfológica, diferenciándose básicamente por el tipo de desarrollo larval y por el tamaño máximo que alcanzan los individuos adultos (Gallardo 1976, 1977, 1979, Brown & Olivares 1996).

Los estudios taxonómicos de las especies chilenas del género *Crepidula*, se han basado principalmente en criterios morfológicos, donde se compara fundamentalmente la morfometría de la concha, de la radula y el hábitat (Gallardo 1979, Brown & Olivares 1996). Basado en lo anterior, el reconocimiento específico tiene resultados de poca claridad, más aún, considerando que la morfometría de estos gastrópodos es variable. El género *Crepidula* presenta una extraordinaria plasticidad fenotípica, en la dirección del incremento de la concha, durante el crecimiento sobre

sustratos duros (Collin 2000). Además, estas especies pueden vivir simpátricamente, lo cual dificulta, aun más, la identificación específica y la estimación de la frecuencia en que ambas se encuentran en un determinado lugar.

Actualmente, la diferenciación entre ambas especies se basa en las características de las posturas. En *C. dilatata*, las cápsulas poseen huevos nutricios que son usados como alimento extra-embriónico durante el desarrollo intracapsular, lo que permite la eclosión de juveniles reptantes bien desarrollados con una longitud de concha de entre 0.9 y 1.2 mm (Gallardo 1976, 1977, 1979, Chaparro & Paschke 1990). Por su parte, en *C. fecunda* todos los huevos depositados al interior de las cápsulas se desarrollan en larvas véliger, las cuales eclosionan a la columna de agua, donde permanecen aproximadamente 15 días antes de asentarse y metamorfosear con una longitud de concha de aproximadamente 0.5 - 0.6 mm (Montiel 2002).

De acuerdo al mecanismo reproductivo de ambas especies, pareciera esperable que *C. dilatata* tuviera un nivel de dispersión menor debido a la ausencia de larva pelágica, reduciendo con ello el flujo génico entre poblaciones. En tanto, *C. fecunda* vería favorecida su dispersión por la presencia de una larva véliger de vida libre, que continúa su desarrollo en la columna de agua por un período de 2 semanas antes de asentarse (Montiel 2002). En consideración con lo anteriormente expuesto, es que en la presente investigación se pretende diferenciar ambas especies, a nivel genético por medio de las técnicas de Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs) y Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs), las cuales se basan en la reacción en cadena de la polimerasa y el uso marcadores moleculares. Ambas técnicas presentan muy buenas cualidades para lograr la diferenciación interespecífica, así como para comparar el nivel de dispersión de estas especies. También se pretende identificar el grado de influencia que puede llegar a tener la estrategia reproductiva de cada una de estas especies en el aislamiento poblacional.

En el presente estudio se pondrá a prueba la hipótesis:

El tipo de desarrollo larval influye en la estructura genética poblacional de las especies de *Crepidula dilatata* y *Crepidula fecunda*, que habitan en la costa interior de la Isla de Chiloé.

Objetivos generales

1. Establecer los marcadores moleculares basándose en la técnica PCR para permitir la diferenciación específica de *Crepidula dilatata* y *Crepidula fecunda*.
2. Por medio de la técnica molecular Random amplified polymorphic DNA (RAPD) se determinara el flujo génico y la estructura genético-poblacional *Crepidula dilatata* y *Crepidula fecunda*, en la costa interior de la isla de Chiloé.

MATERIAL Y METODO

1. Muestreo poblacional

La obtención de ejemplares de *Crepidula* se realizó por medio de recolección manual, tanto desde el intermareal como del submareal a lo largo de toda la costa interior de la isla de Chiloé, recolectando un mínimo de 50 individuos por población. Las localidades muestreadas fueron: Quempillén (41° 52` S; 73° 46` W), Quemchi (42° 08` S; 73° 28` W), Dalcahue (42° 22` S; 73° 39` W), Queilen (42° 52` S; 73° 28` W), Chaiguao (43° 08` S; 73° 29` W) y Yaldad (43° 08` S; 73° 44` W) (Fig. 1).

Con el fin de corroborar con los marcadores moleculares y comprobar la identificación de ambas especies, se recolectaron individuos que fueron identificados a nivel específico, en base a su tipo de desarrollo embrionario larval. A todos los individuos recolectados, se les extrajo un trozo de tejido del pie y de masa visceral, los cuales se fijaron en etanol al 95 % y se conservaron en tubos Eppendorf a – 20 °C.

2. Extracción de ADN

El ADN genómico se obtuvo por medio de la maceración gruesa de un trozo de tejido de cada muestra (100 - 150 mg). Cada trozo de tejido macerado fue digerido en lysis-buffer (50 mM Tris-HCL (pH 8.0); 1.0 % SDS; 25 nM EDTA) con 200 µg de

proteínaza K (Sigma) incubado a 37 °C durante 12 horas en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente, se adicionó a la muestra, 500 µl de una solución de fenol-cloroformo-isoamil alcohol con proporciones de (24:24:1). La mezcla de cada tubo se agitó en un vortex por unos segundos y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 5 °C. Enseguida, se sifonó el sobrenadante que contiene el ADN, cuidando de no tocar la capa intermedia. El sobrenadante obtenido fue transferido a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml, previamente autoclavado. El ADN extraído se resuspendió en 200 µl de etanol al 95 % y se mantuvo en el freezer por 30 minutos, para precipitar la muestra. Luego se extrajo el etanol, dejando los tubos con el pellet de ADN. Para concentrar y desecar las muestras se utilizó el equipo SAVANT DNA 110. El pellet de ADN obtenido, se resuspendió en 200 µl de agua ultradestilada (Toro 1998) y se realizó una limpieza de las muestras. Para ello se añadieron 200 µl de Cloruro de Litio (8 M) manteniendo las muestras durante 3 horas a -20 °C y posterior a lo cual se centrifugaron a 10.400 rpm por 30 minutos a 4 °C (Sambrook *et al.* 1989). La limpieza del ADN se continuó con la eliminación del sobrenadante y lavando el pellet con etanol al 70 %. Posteriormente se efectuó la desecación por 20 minutos haciendo uso del concentrador de DNA (SAVANT DNA 110). Terminando el procedimiento de limpieza se resuspendió el pellet de ADN resultante en 200 µl de agua bidestilada y se almacenó a -20 °C, hasta el momento de su amplificación.

3. Medición y cálculo de la concentración del ADN.

El ADN de las muestras fue cuantificado, tomando lecturas de absorvancias a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (UV / VIS spectrophotometer SUV 2120). Para realizar la medición fue necesario diluir las muestras en una proporción de 1/20.

Como criterio de pureza se consideró la razón de la lectura obtenida ($^{260\text{ nm}}/_{280\text{ nm}}$) próxima a 1.8 (Sambrook & Russell 2001). Para realizar los cálculos de concentración se consideró el valor 1.0 de absorvancia (A) a 260 nm, el cual equivale a 50 µg/ml de

ADN doble hebra (Sambrook & Russell 2001). Para obtener la concentración de ADN de cada muestra se ocupó la siguiente formula:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g/ml}) = \frac{(\text{A } 260 \times \text{factor de dilución} \times 50 \mu\text{g ADN/ml})}{\text{Volumen total muestra (ml)}}$$

4. Amplificación del ADN:

4.1 RAPDs

La técnica RAPDs utiliza marcadores moleculares que presentan un solo oligonucleótido de entre 5 y 10 pares de bases con una secuencia arbitraria, la cual se utiliza para amplificar regiones anónimas del ADN genómico (nuclear o mitocondrial), sin la necesidad de secuenciación previa. La amplificación del ADN se llevó a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimeraza (PCR), utilizando una mezcla total de 25 μl (en tubos para PCR ultra delgados de 500 μl ; Gordon technologies). La mezcla de reacción se preparó con 1 μl de ADN genómico (concentración de aproximadamente 50 ng/ μl), 2.5 μl de dNTPs (2 mM), 1.75 μl de MgCl_2 (25 mM), 2.5 μl PCR – buffer 10 X, 4.5 μl del partidor (10 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$), 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (5 U/ μl) (Invitrogen) y 12.55 μl de agua bi-destilada.

La reacción fue cubierta con una gota de aceite mineral para evitar evaporación y posteriormente cada una de las muestras se dispuso en el termo-ciclador (Amplifitron[®] II, Thermolyne Inc.). El programa del termo-ciclador (después de ajustarlo al mejor resultado, en presencia y claridad de banda), comenzaba con una desnaturalización general del ADN a 95 °C por 15 segundos y luego 36 ciclos, los cuales constaban con una desnaturalización parcial a 94 °C por 30 segundo, un proceso de anillaje a 32 °C por 30 segundos y por último un periodo de duplicación a 72 °C por 1 minuto y terminado los 36 ciclos se mantuvo el producto amplificado a 4 °C.

Los tres partidores que presentaron resultados satisfactorios, es decir con presencia de polimorfismo, fueron seleccionados de un total de 49, los cuales fueron sintetizados por Biosource international a una concentración de 100 mM (Tabla 1).

4.2 RFLPs

Esta técnica se basa en la incorporación, a la muestra a amplificar, de un partidor codificante y el posterior corte del producto amplificado con una enzima de restricción para obtener patrones de bandas discriminantes. En esta investigación fue utilizado el partidor citocromo oxidasa mitocondrial (I-COI) (Folmer *et al.* 1994, Baldwin *et al.* 1996, Collin 2003) LCO 1490: 5'-ggccaacaatacataaagatattgg-3' y HCO 2198: 5'-taaacttcagggtgaccaaaaaatca-3'

La amplificación de la muestra de ADN con el partidor I-COI, se realizó con una mezcla total de 25 μ l (en tubos para PCR ultra delgados de 500 μ l; Gordon technologies) en los cuales se preparó la reacción, con 5 μ l de ADN genómico extraído con una concentración de aproximadamente 50 ng/ μ l; 2.0 μ l de dNTPs (2 mM), 1.5 μ l de MgCl₂ (25 mM), 2.5 μ l PCR – buffer 10X, 2.5 μ l de cada uno de los partidores ocupados (10 μ M/ μ l), 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (5 U/ μ l) (Invitrogen) y 8.8 μ l de agua bidestilada. La reacción fue cubierta con una gota de aceite mineral para evitar evaporación y se ubicó cada una de las muestras en el termo-ciclador (Amplifitron[®] II, Thermolyne Inc.). Como control se utilizó una muestra sin ADN genómico. El programa del termo-ciclador, consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 2 minutos y luego 35 ciclos consistentes en una desnaturalización del ADN a 95 °C por 1 minuto, un proceso de anillaje a 52 °C por 1 minuto y por último un período de duplicación a 72 °C por 1 minuto. Una vez terminado el programa de amplificación, el producto fue mantenido a 4 °C.

Después de la amplificación, el producto obtenido fue digerido con la enzima de restricción NLA - IV (New England Biolabs). Esta enzima de restricción corta el ADN en la secuencias 5'... GGNNCC... 3'. Se mezcló 7.5 μ l de producto amplificado, 0.5 μ l

enzima de restricción (NLA - IV), 1.0 μ l de NE buffer 4 10 XI, 0.5 μ l albumina del suero bobino (BSA) acetilado y 1 μ l agua bidestilada (Baldwin *et al.* 1996). La mezcla fue incubada por 12 horas a 37 °C.

5. Electroforésis en geles de agarosa :

La totalidad de los fragmentos de ADN, amplificados con los partidores utilizados, se separaron en geles de agarosa (Invitrogen Ultra Pure 1000), los cuales fueron preparados a una concentración del 1.2 % en buffer TBE 0.5 X (44.5 mM tris base, 44.5 mM ácido bórico, 1M EDTA pH 8). A esta mezcla se le agregó ethidium bromide (10 mg/ml) a una concentración en la mezcla del 1 %. Cada solución de agarosa fue vertida en moldes de acrílico donde se mantuvo una peineta que permitio la creación de pequeños recipientes una vez que la agarosa solidifico. Estos recipientes fueron usados para la depositación del producto amplificado o digerido con enzimas de restricción, donde se utilizo una mezcla de 10 μ l de producto amplificado y 3 μ l buffer de carga (0.03 % azul de bromofenol, 0.03 % de xilen cianol, 60 % de gicerol y 50 mM EDTA) como frente de migración. En cada gel se cargó un patrón de bandas estándar 1000 bp (ladder DNA, Promega) para la identificación aproximada del peso molecular de las bandas amplificadas. Los geles con las muestras incorporadas fueron sumergidos en una cámara electroforética conteniendo el buffer TBE 0.5 X (44.5 mM tris base, 44.5 mM ácido bórico, 1 M EDTA pH 8). Cada gel fue sometido por aproximadamente 1 hora y 30 minutos a 75 Volts. La visualización de los patrones de bandas en cada una de los geles se llevó a cabo bajo luz UV y donde, además, se capturó la imagen del gel por medio de una cámara fotográfica digital marca SONY[®].

6. Análisis de los datos obtenidos:

Los resultados obtenidos con la técnica de los RAPDs, fueron analizados a partir de los patrones de bandas obtenidos directamente de las fotografías capturadas de los geles de agarosa. Así se codificó las bandas presentes como (1) y las ausentes como (0), con lo cual se configuró una matriz de datos.

La identificación de especies fue realizada en base a los datos obtenidos en la matriz, donde se buscaron las bandas o patrones de bandas discriminantes para cada una de las dos especies estudiadas.

El análisis estadístico se realizó con los programas computacionales POPGENE 32 (Population Genetics Software) (Yeh *et al.* 1997) y GenAlEx version 5.1 (Peakall & Smouse 2001).

Al utilizar el programa POPGENE y debido a la inexistencia de trabajos enzimáticos en estas poblaciones, fue necesario asumir que las poblaciones estudiadas presentan el equilibrio de Hardy - Weinberg ($F_{IS} = 0.0$). También se asumió que las bandas presentes en cada uno de los loci son diferentes e independientes y que no presentan co-migración. Con este programa computacional se calculó el flujo génico (Nm) en base al coeficiente de diferenciación poblacional (Gst), aplicando la fórmula [$Nm = 0.5 (1 - Gst)/Gst$] (Mc. Dermott & Mc. Donald 1993). También, se determinaron la diversidad genética (h), las distancias génicas (D) (basados en las fórmulas de Nei 1972, 1978), además del número y porcentaje de loci polimórficos. Esto último permitió estimar la variabilidad existente entre las especies estudiadas. Basado en el patrón de diferenciación genética (distancia genética de Nei 1972, 1978), se generó un dendrograma, utilizando el UPGMA (Unweighed Pair Group Method with Airthmetic Mean).

Con el programa GenAlEx, se realizó un análisis por especie del número de bandas presentes en cada una de las poblaciones estudiadas, como también se determinó la heterocigocidad promedio. Además, se realizó el análisis molecular de varianza (AMOVA; Excoffier *et al.* 1992), el cual permite evaluar la variación inter e intrapoblacional, entregando una medida de la varianza que es atribuída a cada fuente de variación, lo que permite valorar el grado de panmixia de las poblaciones (Holmes *et*

al. 2004, Sands *et al.* 2003, Kruse *et al.* 2003). Paralelamente, se realizó el test de Mantel, por medio del programa GenAlEx version 5.1, análisis que permite realizar comparaciones pareadas entre distancias génicas y distancias geográficas, mediante un gran número de permutaciones al azar.

RESULTADOS

1. Identificación de especies

La primera aproximación, para la identificación específica realizada en base a la técnica genética Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs), no mostró resultados utilizables, debido a la existencia de patrones de bandas iguales entre ambas especies (Fig. 2, A , Fig. 2, B), incluso después de haberse ocupado la enzima de restricción NLA -IV (Fig. 3).

El uso de la técnica RAPD, permitió la identificación de un total de 34 loci amplificados en un total de tres partidores, con una distribución de 12, 12 y 10 loci, para los partidores CRE 20, CRE 28, y CRE 35 respectivamente (Tabla 1).

Los patrones de bandas obtenidas en cada una de las especies, permitió identificar la existencia de bandas discriminantes en ***Crepidula dilatata*** y ***Crepidula fecunda***, en los patrones de bandas del partidore CRE 35. Las bandas existentes para ***C. fecunda*** presentaron un peso aproximadamente de 700, 400 y 300 pares de bases, en cambio ***C. dilatata*** presentó sólo bandas con pesos de 500 y 300 pares de bases. Aquellos individuos en que no se presentó el patrón de bandas discriminantes, fueron excluidos de todo análisis (Fig. 4).

La separación específica de los ejemplares muestreados en todas las poblaciones permitió reconocer que el 70 % de ellos fueron ***C. fecunda*** y un 19 % de ***C. dilatata***, en tanto el 11% correspondió a ejemplares no identificados.

La existencia de una mayoría de individuos de la especie ***C. dilatata*** se identificó en la localidad de Quempillén, en tanto ***C. fecunda***, tuvo presencia mayoritariamente en las localidades de Dalcahue y Yaldad. En el resto de las poblaciones (Quemchi,

Queilen, Chaiguao) se observó la presencia de ambas especies, pero con prevalencia de la especie *C. fecunda* (Fig. 5).

2. Análisis genético poblacional

2.1 Número de bandas amplificadas

La comparación de la cantidad de bandas amplificadas para cada una de las especies y en cada una de las poblaciones en estudio, entregó un valor promedio levemente menor en *C. dilatata* (22 ± 1.50) que en *C. fecunda* (25 ± 4.67).

A nivel poblacional, se observó que el menor número de bandas se registró en la población de Quempillén con 18 bandas para la especie *C. fecunda*. El resto de las poblaciones mantuvo un número parecido de bandas por especie (Fig. 6 y 7). Algunas bandas privadas fueron identificadas para los ejemplares de *C. dilatata*, en la poblaciones de Quempillén y Quemchi, siendo exclusivas para las poblaciones donde se encuentran y determinan en algún grado, la singularidad de esa población (Fig. 7).

2.2 Flujo Génico

El flujo génico para *C. dilatata* fue de 0.91 y de 1.86 para *C. fecunda*. Un análisis del flujo génico estimado en forma pareada entre las poblaciones muestran, para casi todas las localidades analizadas, valores mayores para la especie *C. fecunda*, con la excepción de los pares de localidades Quempillén - Queilen y Quempillén - Chaiguao (Fig. 9).

2.3 Diversidad Genética

La diversidad genética intra e interpoblacional, fue mayor en cada uno de los lugares muestreados para *C. fecunda* que para *C. dilatata* (0.20 y 0.14 respectivamente). Esto sugiere la existencia de mayor intercambio genético, entre los individuos de cada una de las poblaciones de *C. fecunda*. Por su parte, la población de

Quempillén tuvo los menores valores de diversidad génica, tanto para ***C. dilatata*** (0.09 ± 0.02) como para ***C. fecunda*** (0.11 ± 0.05) (Fig. 8).

2.4 Numero de Loci Polimórficos

En ***C. dilatata***, el número de loci polimórficos fue bastante similar fluctuando entre 19 y 22; en tanto que para ***C. fecunda***, éstos fluctuaron entre 16 - 30, valores que representan un porcentaje de loci polimórficos para cada especie de 85.3 % y 100 %, respectivamente.

Las poblaciones que presentaron los valores más bajos de loci polimórficos fueron las de Chaiguao (19) para ***C. dilatata*** y Quempillén (16) para ***C. fecunda*** (Tabla 2).

2.5 Distancia génica

En ***C. dilatata***, la población de Yaldad es la que presenta una mayor distancia génica entre todas las poblaciones estudiadas. Así, las poblaciones de Quempillén, Queilen, Quemchi y Chaiguao, presentan una menor distancia genética entre ellos, siendo Chaiguao la población que más se aleja en este grupo (Tabla 3 y Fig. 11).

En el caso de ***C. fecunda***, Yaldad y Quempillén corresponden a las poblaciones más alejadas genéticamente, en relación a los otras poblaciones estudiadas. Las poblaciones de Quemchi, Chaiguao y Dalcahue presentaron las mayores cercanías genéticas, siendo esta última, la población más alejada en el grupo (Tabla 4 y Fig. 10).

Por su parte, la magnitud de la distancia génica para ***C. dilatata*** es aproximadamente el doble que la de ***C. fecunda*** (Fig. 10 y 11).

2.6 Heterozigocidad promedio

La heterozigocidad promedio en cada una de las poblaciones estudiadas, fue mayor para ***C. fecunda*** que para ***C. dilatata*** (Tabla 5). Por su parte, en la población de Quempillén, tanto ***C. dilatata*** como ***C. fecunda***, presentaron los valores más bajos de

todas las poblaciones estudiadas, sugiriendo que esta localidad tendría características biológicas y oceanográficas especiales.

2.7 AMOVA

El análisis molecular de varianza identificó diferencias significativas ($p < 0.01$) para *C. dilatata* y *C. fecunda*, explicado por variaciones intrínsecas de cada población.

En ambas especies (*C. dilatata* y *C. fecunda*) el porcentaje de variación interpoblacional fue mayor que el intrapoblacional, indicando que la variación genética total, es explicada mayoritariamente por las diferencias entre poblaciones (Tabla 6).

2.8 Test de Mantel

La correlación entre distancia geográfica y distancia génica, utilizando 5000 permutaciones, determinó correlaciones significativas ($p < 0.05$) para ambas especies. Cuando se utilizó la distancia génica estimada según Nei (1972), para el caso de *C. dilatata* se obtuvo un valor de 0.111. Por su parte, los valores de correlación de Mantel para *C. fecunda* fueron 0.342 al utilizar la distancia génica estimada según Nei (1972).

DISCUSIÓN

Los análisis basados con marcadores RFLPs no permitieron encontrar diferencias entre las dos especies de *Crepidula* estudiadas. La secuenciación obtenidas con el partidador COI entre *C. dilatata* y *C. fecunda*, mostró una diferencia de sólo 1.7 % en las pares de bases obtenidas (Collin 2003). Estos resultados podrían justificar la incapacidad para lograr una diferenciación de las especies estudiadas, mediante RFLPs, debido que ésta técnica, se basa en la presencia de patrones de bandas diferentes en geles de agarosa una vez digerido el ADN amplificado. Como consecuencia del bajo porcentaje de diferenciación entre los pares de bases secuenciados, no fue posible obtener diferencias específicas, a pesar de utilizar la enzima de restricción *NLA-IV*.

Sin embargo, la técnica con marcadores RAPDs permitió identificar bandas discriminantes, posibilitando con ellas la identificación específica de las muestras obtenidas. (Crossland *et al.* 1993, Andre *et al.* 1999, Rego *et al.* 2002, Costa *et al.* 2004, Liu & Cordes 2004). La metodología utilizada (RAPDs) presenta ventajas que dan consistencia a los resultados. Lo anterior, se debe a que los partidores utilizados no son codificantes y tienen un tamaño pequeño (5-10 Pb), los cuales se insertan en todo tipo de ADN, ya sea nuclear o mitocondrial, posibilitando incluso la detección de pequeñas diferencias entre individuos. Sin embargo, la técnica de los RAPDs complica la replicidad de la investigación, debido a factores tales como la calidad y concentración del ADN, el tipo de polimeraza, la concentración de magnesio, el tipo de termociclador y el programa utilizado para la amplificación (Parker *et al.* 1998, Féral 2002, Hermosilla 2004, Liu & Cordes, 2004). Sin embargo, una vez estandarizado se logra una alta repetibilidad que permite ser utilizado en estudios de sistemáticas y ecología.

La distribución porcentual de cada una de las especies en las poblaciones muestreadas, indica la presencia de ambas especies a lo largo de todo el territorio estudiado, pero en Dalcahue y Yaldad se presentó sólo la especie *C. fecunda* y en Quempillén gran parte de los individuos fueron identificados como *C. dilatata*. Lo anterior podría indicar que *C. fecunda* se presenta en sectores con influencias marinas, en tanto que *C. dilatata* se asociaría a lugares con mayor influencia estuarina. Por otro

lado, el porcentaje de individuos no identificados (11%, 25 individuos), podría deberse a la existencia de artefactos técnicos, ya sea en la extracción del ADN, como también en el protocolo de amplificación.

El flujo génico interpoblacional de *C. dilatata* (0.89) es bastante reducido, a diferencia de *C. fecunda* (1.86), cuando se tiene en consideración lo señalado por Slatkin (1994), quien señala que valores de flujo génico sobre 1, indican que las poblaciones sobrepasan los efectos de la deriva génica y se impide, con esto, la diferenciación local.

Los resultados de un análisis pareado por población para cada especie, corrobora un mayor flujo génico de *C. fecunda* que de *C. dilatata*. La únicas excepciones a favor de la especie con desarrollo directo (*C. dilatata*) corresponde a los pares de poblaciones de Quempillén - Chaiguao y Quempillén - Queilen. Esta última situación pudiera explicarse por un efecto antropogénico, ya que ambas poblaciones se encuentran en un sector dedicado a la acuicultura de bivalvos (*Mytilus* y *Ostrea*), y donde las especies del género *Crepidula* son epibiontes de este tipo de invertebrados (Gallardo 1979). Una situación similar, ha sido descrita para la especie *O. chilensis*, donde la actividad acuícola distorsiona la estructura genética poblacional debido al traslado de ejemplares de un lugar a otro (Toro 1996).

La existencia de un mayor flujo génico entre las poblaciones de Quempillén, Queilen y Chaiguao para el caso de *C. dilatata*, podría estar relacionado con las corrientes marinas superficiales (0 - 30 mts.) que se desplazan desde el Golfo de Ancud al Golfo del Corcovado con movimiento neto desde el sector norte de la Isla de Chiloe, hacia el Sur de ella (Silva 1998), lo que podría facilitar la deriva de ejemplares vía rafting.

La presencia de valores de diversidad génica más altos en la especie de *C. fecunda*, en cada una de las poblaciones estudiadas, podría ser explicado por la presencia de una larva pelágica con una duración en la columna de aguas de aproximadamente 15 días (Soto 2001), siendo un factor importante en la dispersión y en el intercambio génico de esta especie. En tanto, la población de Quempillén presentó los menores valores de diversidad génica en ambas especies. El río Quempillén es un estuario que desemboca en las aguas del río Pudeto, situación que

podría actuar como barrera tanto de entrada, como para la salida de larvas, siendo un sector de retención larval (Bilton *et al.* 2002) resultando de esta forma en una población con una reducida diversidad genética.

El porcentaje de loci polimórficos, es decir, el porcentaje de un gen que se expresa de diferentes formas en una población, se presentó en un rango entre 47 % - 85 %, para ***C. fecunda*** y de 55 % - 85 % para ***C. dilatata***, siendo mayores estos valores que el promedio de loci polimórficos para un conjunto de moluscos (41.2%, Fuijo *et al.* 1983). En tanto, el porcentaje de loci polimórficos de ***Ostrea edulis*** están registrados en un rango entre 18.2 % y 40.9 % (Saavedra *et al.* 1993). Al igual que para los prosobranquios ***Cominella lineolata*** con 24.1% y ***Bedeva hanleyi*** con 41.7% (Hoskin 1997). Esto resultados indicarían que los valores de la presente investigación serían mayores que los publicados, tal vez, justificados por el uso de técnicas diferentes, ya que los autores nombrados realizaron sus estudios en base a electroforésis enzimática, metodología indirecta, basada en la expresión genética, sin basarse en el ADN de los individuos.

El análisis de los dendrogramas para ambas especies, indican que la distancia génica de ***C. fecunda*** es la mitad de la presente en ***C. dilatata***, lo cual permite inferir que las diferencias en sus estrategias reproductivas (larva pelágica versus desarrollo directo) presentan un efecto importante en la configuración genética de cada especie.

Las distancias génicas de especies con desarrollo directo tales como ***Crepidula cf. convexa*** (0.008 - 0.076) y ***Crepidula convexa*** (0.037 - 0.057), fueron inferiores a los registrados en este estudio para ***C. dilatata*** (0.067 - 0.200), lo cual señala que en ésta última especie, el intercambio genético es menor que para las especies del hemisferio norte. La presencia de distancias génicas menores se puede deber a factores tales como la densidad poblacional de cada una de la especies (Scheltema 1971), o a factores reproductivos. La especie del hemisferio norte produce entre 8 – 20 cápsulas por hembra y cada cápsula presenta entre 15 – 25 embriones (Hendler & Franz 1971), en tanto ***C. dilatata*** solo desarrolla entre 9 – 22 cápsulas por hembra con un rango entre 2 -12 embriones (Penchaszadeh *et. al* 2002). Estos factores podrían afectar fuertemente la capacidad dispersiva de las especies, debido a que una mayor cantidad de descendientes por generación favorecería el intercambio entre poblaciones.

La distancia génica obtenida en *C. fecunda* fue de 0.013 - 0.105, en tanto que, para las especies *Crepidula fornicata* y *Crepidula plana*, ambas con desarrollo planctónico fueron de 0.003 - 0.016 y 0.052 - 0.097 respectivamente (Hoagland 1984). A pesar que las tres especies presentan larva pelágica, sólo en los casos de *C. fecunda* y *C. plana* se identifican altos valores de distancias génicas, los que en el caso de la primera, podría deberse a la presencia de corrientes marinas (Silva 1998) que impidan, debido a su magnitud y dirección, un efectivo transporte larval entre las poblaciones estudiadas (Scheltema 1971)

Los promedios de heterozigocidad para *C. dilatata* (0.09 - 0.16) y para *C. fecunda* (0.11 - 0.19), se encuentran dentro de los rangos reportados para diferentes especies de moluscos (0.05 - 0.21, Fujio *et al.* 1983).

La heterozigocidad promedio fue muy baja en caso de *C. dilatata*, lo cual hace evidente que el intercambio génico entre las poblaciones estudiadas fue muy escaso, significando una disminución a futuro del pool génico de estas poblaciones. Esta heterozigocidad no sólo puede estar influenciada por la mecánica reproductiva de la especie (e.g. ausencia de larva pelágica), sino por factores geográficos, y oceanográficos que pueden interrumpir el flujo de individuos entre las poblaciones. (Collin 2001, Wares *et al.* 2001, Zacherl *et al.* 2003).

Especies con desarrollo directo tales como *C. dilatata*, *C. convexa* y *C. atrasolea* muestran concordancia en los resultados de AMOVA, ya que la variación interpoblacional presenta mayor relevancia que la variación intrapoblacional, indicando que la variación existente es mayor entre las poblaciones. En cambio, los datos obtenidos para *C. fecunda* no coinciden con los datos para *C. fornicata* (Collin 2001), ya que presenta mayor variación a nivel intrapoblacional. *C. fecunda*, libera larvas con tamaño de 0.35 – 0.44 mm longitud de concha (Cubillos 2004), en tanto que *C. fornicata* 0.44 - 0.48 mm longitud de concha (Collin 2001). Por otro lado, los tamaños de asentamiento son de 0.5 - 0.6 mm. longitud de la concha (Montiel 2002) y 0.94 - 1.00 mm longitud de la concha (Pechenik *et al.* 1996), respectivamente. Esta situación podría representar, para *C. fecunda*, un menor tiempo de dispersión larval, ya que ella permanece solo 15 días en la columna de agua. Por su parte *C. fornicata*, presenta un

periodo larval pelágico de 34 días (Thouzeau 1991), lo cual se traduce en una mayor capacidad de dispersión larval.

Por otro lado, el tamaño poblacional de las especies podrían también tener un impacto en la dispersión larval, ya que especies con densidades altas presentarían un número elevado de larvas en el periodo reproductivo, con lo cual asegurarían mayor dispersión y por ende la posible conquista de nuevos territorios (Scheltema 1971).

El test de Mantel, aplicado para ambas especies del presente estudio, fue significativo ($p < 0.05$), pero con bajos valores de correlación. Esto podría deberse a que la distancia geográfica entre las poblaciones estudiadas fue de sólo aproximadamente 230 kilómetros, lo que influiría en la sensibilidad del análisis. Por otro lado, la configuración geomorfológica de la costa también pudiera haber impactado en el bajo correlación de Mantel. Así por ejemplo, las poblaciones de Yaldad y Chaiguao, son las más cercanas geográficamente (39 km), pero sus distancias génicas son muy altas (***C. dilatata*** = 0.208; ***C. fecunda*** = 0.108). Yaldad es una bahía protegida y no recibe directamente la influencia de corrientes que si afectarían al sector de Chaiguao, traduciendo en una escasa posibilidad de deriva larval desde éste último lugar hacia el interior de la bahía de Yaldad (Silva 1998).

En la presente investigación se logró ajustar las técnicas genéticas para lograr la diferenciación de especies. Estos métodos genéticos, deben ser un complemento necesario para asegurar la correcta identificación de especies, a los ya tradicionales métodos morfométricos, debido a que estos últimos presentan grandes variaciones (plasticidad fenotípica), impuestos por las condiciones ambientales imperantes en cada localidad (Seed 1992).

En consideración a los resultados de la presente investigación se hace evidente que la presencia de un estado larval pelágico permite un mayor flujo génico interpoblacional, lo que favorecería una mayor heterocigocidad de las poblaciones.

Por otra parte, el desarrollo directo conlleva a un aumento en la homogeneidad intrapoblacional y por ende en un aislamiento poblacional, producto de las dificultades que tiene el proceso de dispersión, llevado a cabo principalmente por los estadios juveniles.

En el futuro será necesario llevar a cabo estudios genéticos complementados con trabajos ecológicos y oceanográficos, con el fin de lograr una visión acabada de los factores que estarían afectando la estructura genética poblacional de cada una de las especies.

CONCLUSIONES

- Con las técnicas RAPDs fue posible la identificación genética de las especies de ***Crepidula dilatata*** y ***Crepidula fecunda***.
- Las estrategias reproductivas en las especies estudiadas, influyen en la conformación genética poblacional en el área de estudio. Es decir, la presencia de larva pelágica en el desarrollo larval (***C. fecunda***) asegura una dispersión mayor respecto de aquellos que tienen un desarrollo directo (***C. dilatata***).
- La estrategia reproductiva no explica totalmente la estructura genético poblacional de ***C. fecunda*** y ***C. dilatata***, ya que existen factores geográficos, hidrodinámicos, biológicos, denso poblacionales y antropológicos, que podrían influir en la conformación genética de las poblaciones estudiadas.

BIBLIOGRAFIA

- Andre, C.; Lindegarth, M.; Jonsson, P. R. & Sundberg, P. 1999.** Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 79, 563 - 565
- Baldwin, B. S.; Black, M.; Sanjur, O.; Gustafson, R.; Lutz, R. A. & Vrijenhoek, R. 1996.** A diagnostic molecular marker for zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and potentially co-occurring bivalves: mitochondrial COI. *Mol. Biol. Biotech.* 5, 9 - 14.
- Bilton, D. T.; Paula, J. & Bishop, J. D. D. 2002.** Dispersal, genetic differentiation and speciation in estuarine organisms. *Est. Coast. and Shelf Sci.* 55, 937 - 952.
- Brown, D. I. & Olivares, C. A. 1996.** A new species of *Crepidula* (Mollusca: Mesogastropoda: Calyptraeidae) from Chile: additional characters for the identification of eastern Pacific planar *Crepidula* group. *J. Nat. Hist.* 30, 1443 - 1458.
- Chaparro, O. R. & Paschke, K. A. 1990.** Nurse egg feeding and energy balance in embryos of *Crepidula dilatata* (Gastropoda: Calyptraeidae) during intracapsular development. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 65, 183 - 191.
- Collin, R. 2000.** Phylogeny of the *Crepidula plana* (Gastropoda: Calyptraeidae) cryptic species complex in North America. *Can. J. Zool.* 78, 1500 - 1514.
- Collin, R. 2001.** The effects of mode of development on phylogeography and population structure of North Atlantic *Crepidula* (Gastropoda: Calyptraeidae). *Mol. Ecol.* 10, 2249 - 2262.

- Collin, R. 2003.** Phylogenetic relationships among Calyptraeid gastropods and their implications for the biogeography of marine speciation. *Syst. Biol.* 52, 618 - 640.
- Costa, F. O.; Cunha, M. R.; Neuparth, T.; Theodorakis, C. W.; Costa, M. H. & Shugart, L. R. 2004.** Application of RAPD DNA fingerprinting in taxonomic identification of amphipods: a case-study with ***Gammarus*** species (Crustacea: Amphipoda). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 84, 171 - 178.
- Crossland, S.; Coates, D.; Grahame, J. & Mill, P. J. 1993.** Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in separating two sibling species of ***Littorina***. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 96, 301 - 305.
- Cubillos, V. M. 2004.** Canibalismo intracapsular en ***Crepidula fecunda***: una aproximación experimental. Tesis de Biol. Mar., Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. 31 pp.
- Domaneschi, O. 2002.** New perspectives on the dispersal mechanisms of the Antarctic brooding bivalve ***Mysella charcoti*** (Lamy 1906). *Polar Biol.* 25, 538 - 541.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E. & Quattro, J. M. 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplo-types: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 131, 479 - 491.
- Féral Jean-Pierre. 2002.** How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 268, 121– 145
- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994.** DNA primer for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I diverse metazoan invertebrates. *Mol. Biol. Biotech.* 3, 294 - 299.

- Fujio, Y.; Yamanaka, R., Smith, P.T. 1983.** Genetic Variation in Marine Molluscs. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49, 1809 - 1817.
- Gallardo, C. S. 1976.** Historia natural y reproducción de *Crepidula dilatata* Lamark en una población de Bahía Mehuin (Prov. Valdivia, Chile). *Medio Ambiente*. 2, 44 – 50.
- Gallardo, C. S. 1977.** Two modes of development in the morphospecies *Crepidula dilatata* (Gastropoda: Calyptraeidae) from southern Chile. *Mar. Biol.* 39: 241-251.
- Gallardo, C. S. 1979.** Especies gemelas del género *Crepidula* (Gastropoda, Calyptraeidae) en la costa de Chile; una redescipición de *C. dilatata* Lamark y descripción de *C. fecunda* n.sp. *Stud. Neotr. Fauna Environ.* 14, 215 – 226.
- Gallardo, C. S. 1987.** Estrategias reproductivas en invertebrados marinos bentónicos, con especial referencia a moluscos; un enfoque global del problema y sus perspectivas. 2do. Congreso Latinoamericano sobre Ciencias del Mar 1987 II: 381 - 389.
- Gallardo, C. S. 1989.** Patrones de reproducción y ciclo vital en moluscos marinos bentónicos; Una aproximación ecológica evolutiva. *Medio Ambiente*. 10, 25 – 35.
- Hendler, G. & Franz, D. R. 1971.** Population dynamics and life history of *Crepidula convexa* Say (Gastropoda: Prosobranchia) in Delaware Bay. *Biol. Bull.* 141, 514 – 526.
- Hermosilla, C. 2004.** Variación morfológica y genética entre poblaciones del pulpo de Chilóe *Enteroctopus megalocyathus* (Cephalopoda, Octopoda) en el sur de Chile y Argentina. Tesis de Biol. Mar., Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. 96 pag.

- Highsmith, R. C. 1985.** Floating and algal rafting as potential dispersal mechanism in brooding invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 25, 169 - 179.
- Hoagland, E.K.1984.** Use of molecular genetics to distinguish species of the gastropods genus ***Crepidula*** (Prosobranchia: calyptraidae). *Malacol.* 25, 607 - 628.
- Holmes, S.P.; Dekker, R. & Williams, I.D. 2004.** Population dynamics and genetics differentiation in the bivalve mollusc ***Abra tenuis***: aplanic dispersal. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 268, 131 - 140.
- Hoskin, M. G. 1997.** Effects of contrasting modes of larval development on the genetics structure of populations of three species of prosobranch gastropods. *Mar. Biol.* 127, 647- 656.
- Hunt, A. 1993.** Effects of contrasting patterns of larval dispersal on the genetic connectedness of local populations of two intertidal starfish, ***Patiriella calcar*** and ***P. exigua***. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 92, 179 - 186.
- Johannesson, K. 1988.** The paradox of Rockall: why is a brooding gastropod ***Littorina saxatilis*** more widespread than one having a planktonic larval dispersal stage ***L. littorea*** ?. *Mar. Biol.* 99, 507 -513.
- Kruse, I.; Reusch, T. B. H. & Schneider, M. V. 2003.** Sibling species or poecilogony in the polychaete ***Scoloplos armiger*** ? *Mar. Biol.* 142, 937 –947
- Liu, Z. J. & Cordes, J. F. 2004.** DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture.* 238, 1 –37.
- Marshall, D. J. & Keough, M. J. 2003.** Variation in the dispersal potential of non - feeding invertebrate larvae: the desperate larva hypothesis and larval size. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 255: 145 - 153.

- Martel, A. & Chia, F. S. 1991.** Foot-raising behaviour and active participation during the initial phase of post-metamorphic drifting in the gastropod *Lacuna* spp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 72, 247 - 254.
- Mc. Dermott, J. M. & Mc. Donald, B. A. 1993.** Gen flow in plants pathosystems. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31, 353 - 373.
- Mileikovsky, S. A. 1971.** Types of larval development in marine bottom invertebrates, their distribution and ecological significance: a re- evaluation. *Mar. Biol.* 10, 193 - 213.
- Montiel, Y. 2002.** Alimentación en *Crepidula fecunda*: uso del sistema radular y branquial durante la ontogenia temprana. Tesis de Biol. Mar., Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. 29 pp.
- Nei, M. 1972.** Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106, 283 - 292.
- O' Foighil, D. 1989.** Planktotrophic larval development is associated with a restricted geographic range in *Lasaea*, a genus of brooding, hermaphroditic bivalves. *Mar. Biol.* 103, 349 - 358.
- Parker, P. G.; Snow, A. A.; Schug, M. D.; Booton, G. C. & Fuerst, P. A. 1998.** What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology.* 79, 361 - 382.
- Peakall, R. & Smouse, P.E. 2001.** GenAIEX V.5: Genetic analysis en Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia. [http:// www.anu.edu.au/BoZo/GeAIEX/](http://www.anu.edu.au/BoZo/GeAIEX/)

- Pechenik, J. A.; Hilbish, T. J.; Eyster, L. S. & Marshall, D. 1996.** Relationship between larval and juvenile growth rates in two marine gastropods, *Crepidula plana* and *Crepidula fornicata*. *Mar. Biol.* 125: 119 - 127.
- Pechenik, J. A. 1999.** On the advantages and disadvantages of larval stages in the benthic marine invertebrate life cycle. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 177: 269 - 297.
- Penchaszadeh, P. E.; Pastorino, G. & Cledon, M. 2002.** *Crepidula dilatata* (Lamarck, 1822) Truly living in the Southwestern Atlantic. *The Veliger.* 45, 172 – 174.
- Picken, G. B. 1980.** Reproductive adaptations of Antarctic benthic invertebrates. *Biol. J. Lin. Soc.* 14, 67 - 75.
- Rego, I.; Martinez, A.; Tizon- Gonzalez, A.; Vieites, J.; Leira, F & Mendez, J. 2002.** PCR technique for identification of mussel species. *J. Agri. Food. Chem.* 50, 1780 - 1786.
- Saavedra, C.; Zapata, C.; Guerra, A. & Alvarez, G. 1993.** Allozyme variation in European populations of the oyster *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.* 115, 85 - 95.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989.** Molecular cloning a laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. 1. 445 pp.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. 2001.** Molecular Cloning a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sands, Ch.; Jarman, S. N. & Jackson, G. D. 2003.** Genetic differentiation in the squid *Moroteuthis ingens* inferred from RAPD analysis. *Polar Biol.* 26,166 –170.

- Scheltema, R. S. 1971.** Larval dispersal as a means of genetic exchange between geographically separated populations of shallow - water benthic marine gastropods. *Biol. Bull.* 140: 284 - 322.
- Seed, R. 1992.** Systematics evolution and distribution of mussels belonging to the genus *Mytilus* - an overview. *Malacol. Bull.* 9, 123 – 137.
- Silva, N.; Calvete, C. & Sievers, H. 1998.** Masas de agua y circulación general para algunos canales australes entre Puerto Montt y Laguna San Rafael, Chile (Crucero CIMAR- FIORDO 1). *Cienc. Tecnol. Mar.* 21, 17 - 48.
- Soto, A. 2001.** Características velares y capacidad de alimentación en larvas encapsuladas de *Crepidula dilatata* y *Crepidula fecunda*. Tesis de Biol. Mar., Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. 48 pp.
- Slatkin, M. 1994.** Gene flow and population structure. In: Real, L (Ed.), *Ecological Genetics*. Princeton NJ, Princeton University Press, xv + 283.
- Strathmann, R. R. 1980.** Why does a larval swim so long? *Paleobiology* 6: 373 - 376.
- Strathmann, R. R. 1986.** What controls the type of larval development summary statement for the evolution session?. *Bull. Mar. Sci.* 39, 616 - 622.
- Thorson, G. 1950.** Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol. Rev.* 25, 1 - 45.
- Thouzeau, 1991.** Experimental collection of postlarvae of pecten-maximus (l) and other benthic macrofaunal species in the bay of saint-brieuc, france .1. settlement-patterns and biotic interactions among the species collected. *J.Exp. Mar. Biol. Ecol.* 148: 159 – 179. (http://www.marlin.ac.uk/species/reprod_Crepidulafornicata.htm)

- Toro, E. 1996.** Genetics differentiation of populations of the oyster *Ostrea chilensis* in southern Chile. *Aquat. Living Resour.* 9, 75 -78.
- Toro, E. 1998.** PCR-based nuclear and mt DNA markers and shell morphology as an approach to study the taxonomic status of the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Bivalvia). *Aquat. Living Resour.* 11, 347 – 353.
- Wares, J.P.; Gaines, S.; Clifford, W. & Cunningham, 2001.** A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary. *Evolution* 55: 295 - 306.
- Worcester, S. E. 1994.** Adult rafting versus larval swimming: dispersal and recruitment of a botryllid ascidian on eelgrass. *Mar. Biol.* 121, 309 - 317.
- Yeh, F.C.; Yang, R.C.; Boyle, T.J. B.; Ye, Z.H. & Mao, J.X. 1997.** POPGENE, the userfriendly shareware for population genetic analysis, version 1.31. Edmonton, Alberta: University of Alberta.
- Zacherl, D.; Gaines, S.D. & Lonhart, S.I. 2003.** The limits to biogeographical distributions: insights from the northward range extension of the marine snail, *Kelletia kelletii* (Forbes 1852). *J. Biogeogr.* 30, 913 - 924.

ANEXO FIGURAS

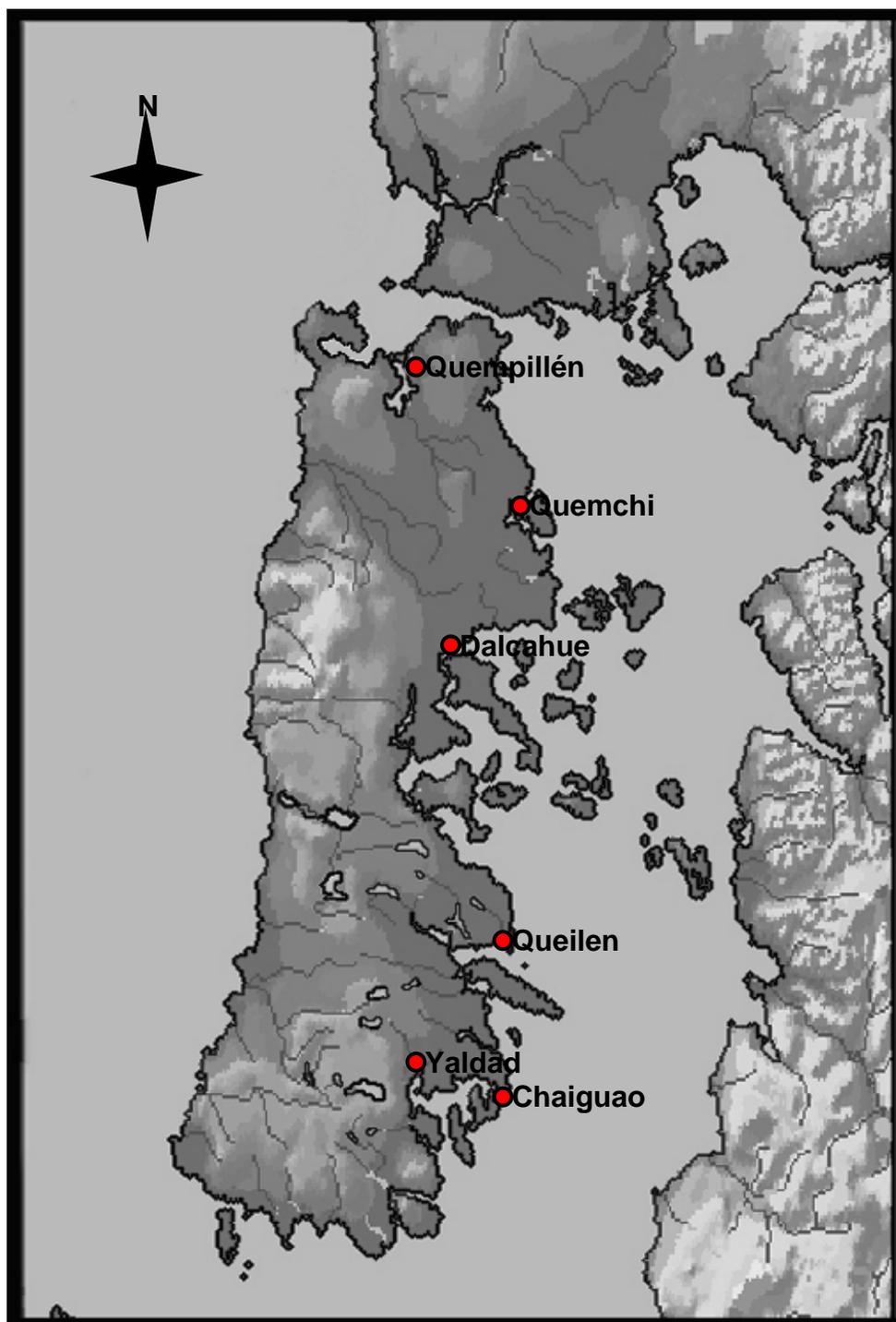


Figura 1. Mapa de la zona de muestreo, indicando cada una de las poblaciones de donde fueron recolectados especímenes de *C. fecunda* y *C. dilatata*.

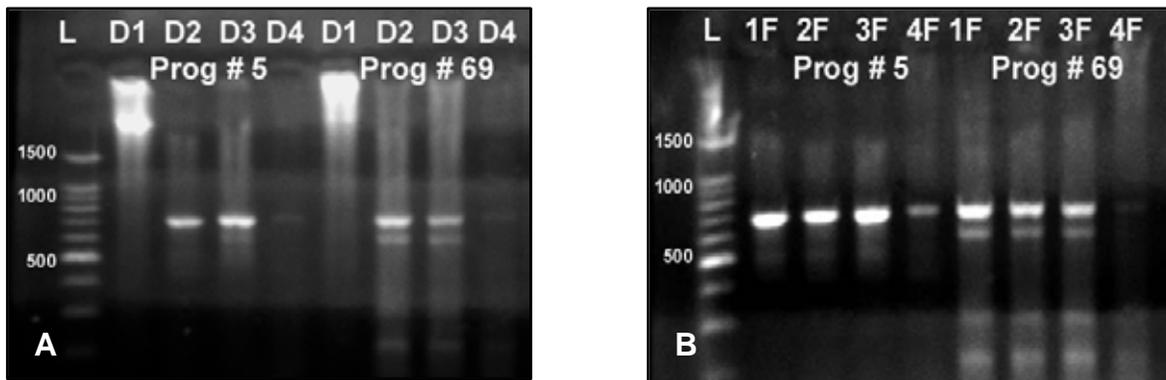


Figura. 2. Patrón de bandas resultantes de la amplificación del ADN por medio de partidor I- COI, en (A) *C. dilatata* y (B) *C. fecunda*, en dos programas del amplificación probados.

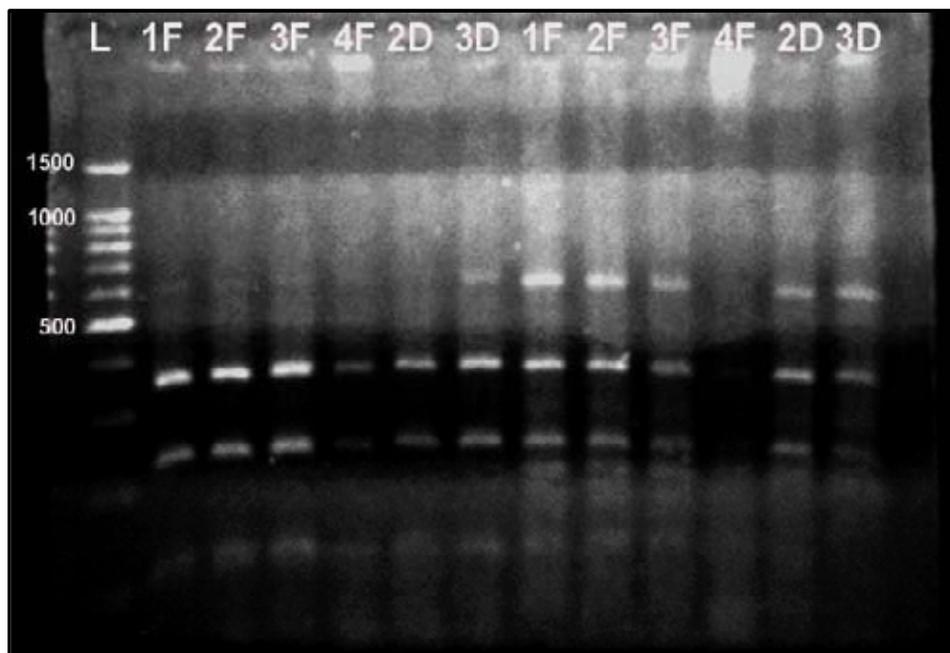


Figura 3. Patrón de bandas resultantes después de aplicar la enzima de restricción NLA- IV al producto amplificado.(F= *C. fecunda* ; D = *C. dilatata*; L= Ladder).

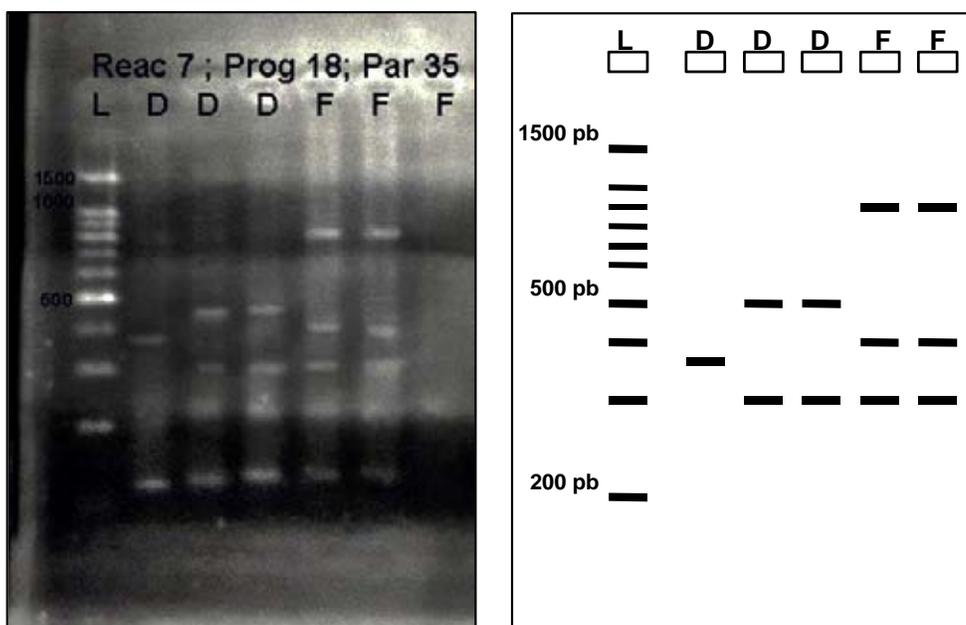


Figura 4. Patrón de bandas resultantes del partidor CRE 35, con el cual se realizó la identificación de especies **D = *C. dilatata***, **F = *C. fecunda*** y **L = Ladder**. La banda con un peso de 380 pb, refleja la existencia de individuos no identificables.

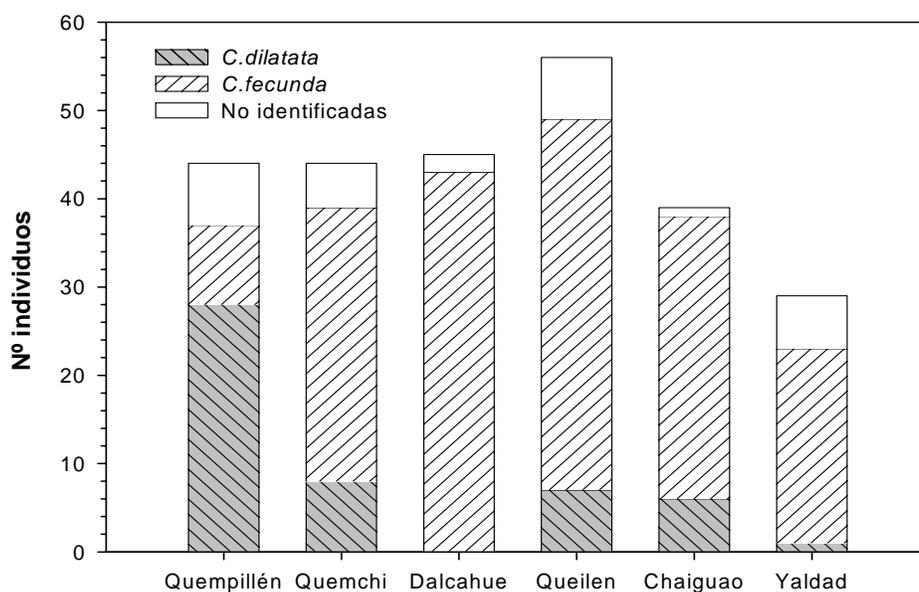


Figura 5. Número de especímenes de ***C. dilatata***, ***C. fecunda*** y ejemplares no identificados en los diferentes lugares muestreados en la Isla de Chiloé.

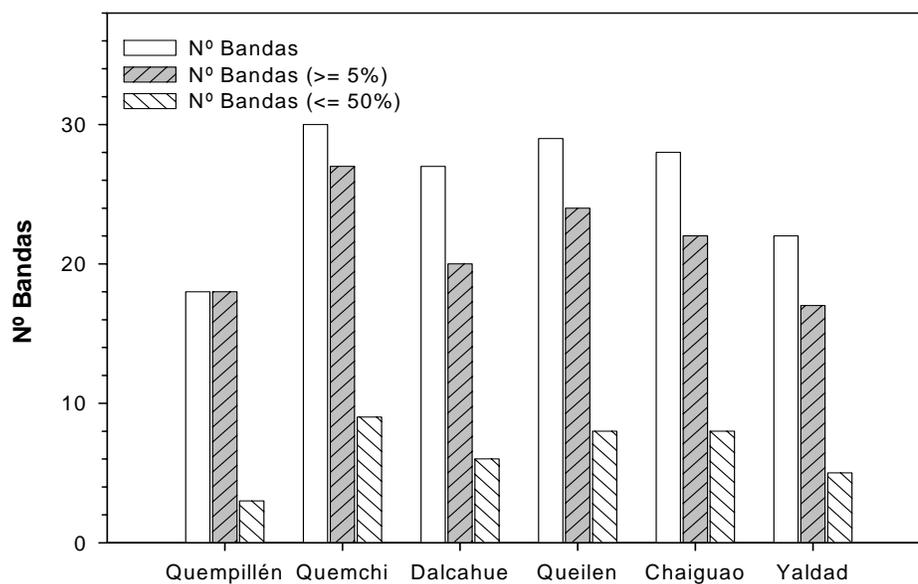


Figura 6. Porcentaje de bandas amplificadas, en cada una de las áreas de muestreo donde se encontraron ejemplares de *C. fecunda*.

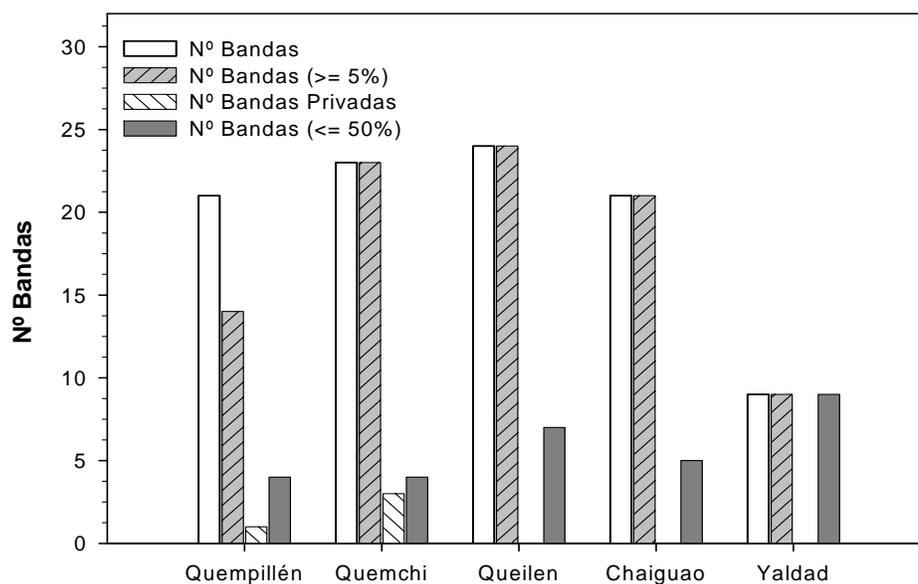


Figura 7. Numero de bandas en cada una de las poblaciones de *C. dilatata* y su distribución por frecuencia de aparición.

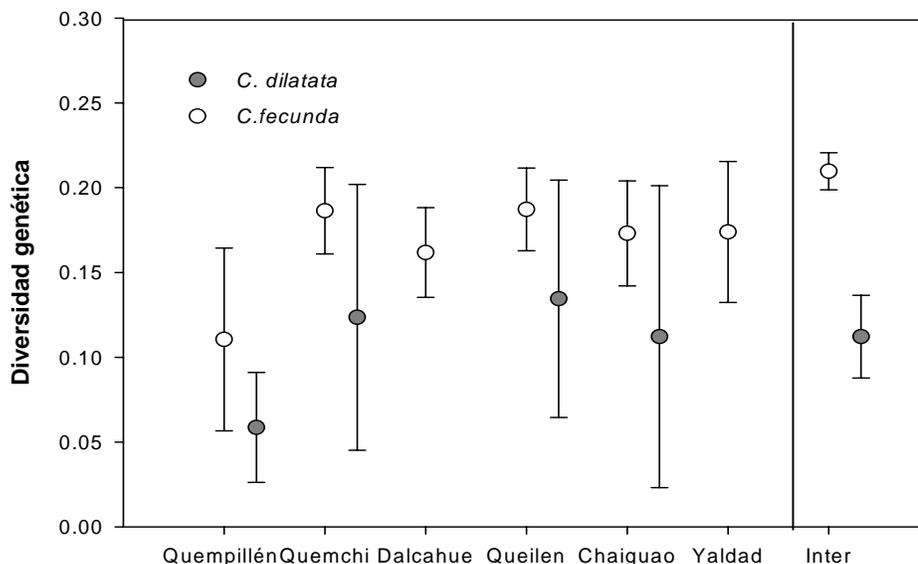


Figura 8. Diversidad génica intra e interpoblacional (error estándar) en *C. dilatata* y *C. fecunda* *Inter: Calculo interpoblacional (error estándar).

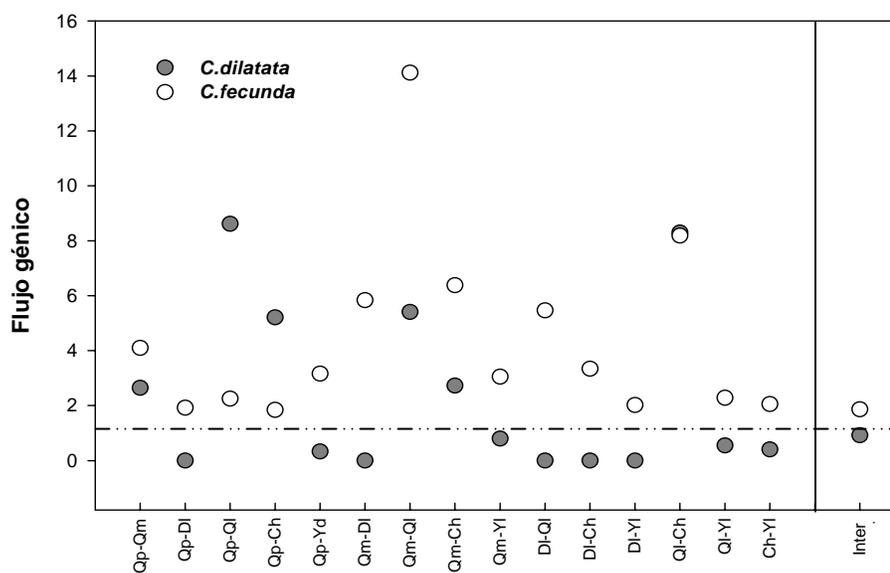


Figura 9. Flujo génico de *C. dilatata* y *C. fecunda*; para cada pareja de poblaciones estudiadas Qp = Quempillén, Qm = Quemchi, DI = Dalcahue, QI = Queilen, Ch = Chaiguao, Yd = Yaldad y Inter = Análisis interpoblacional por especies.

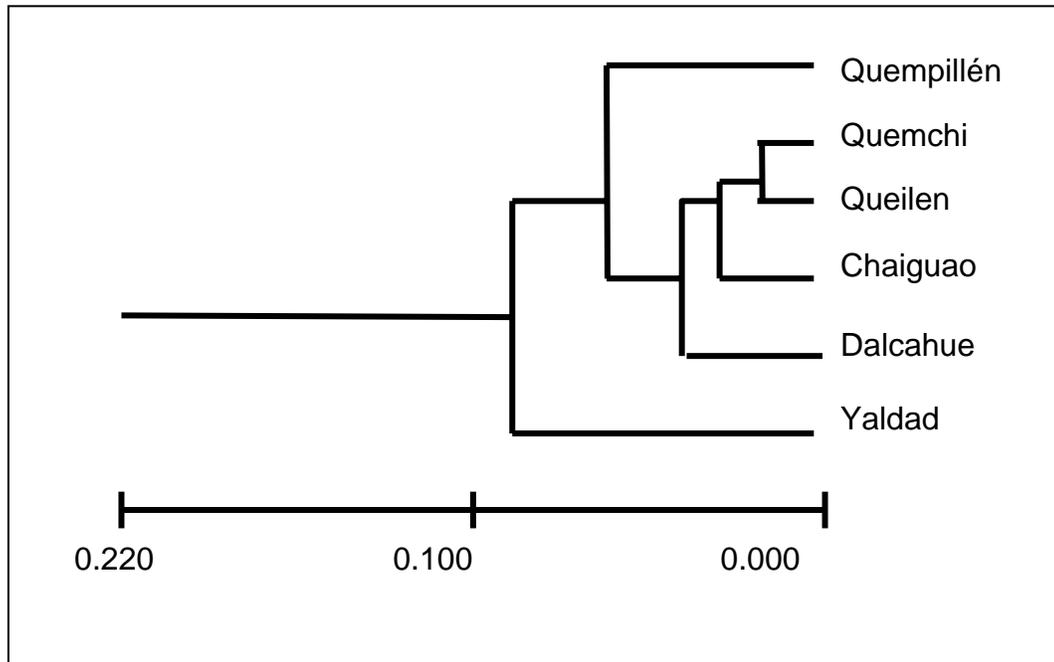


Figura 10. Dendrograma basado en UPGMA sobre las distancias génica de las muestras de *C. fecunda*.

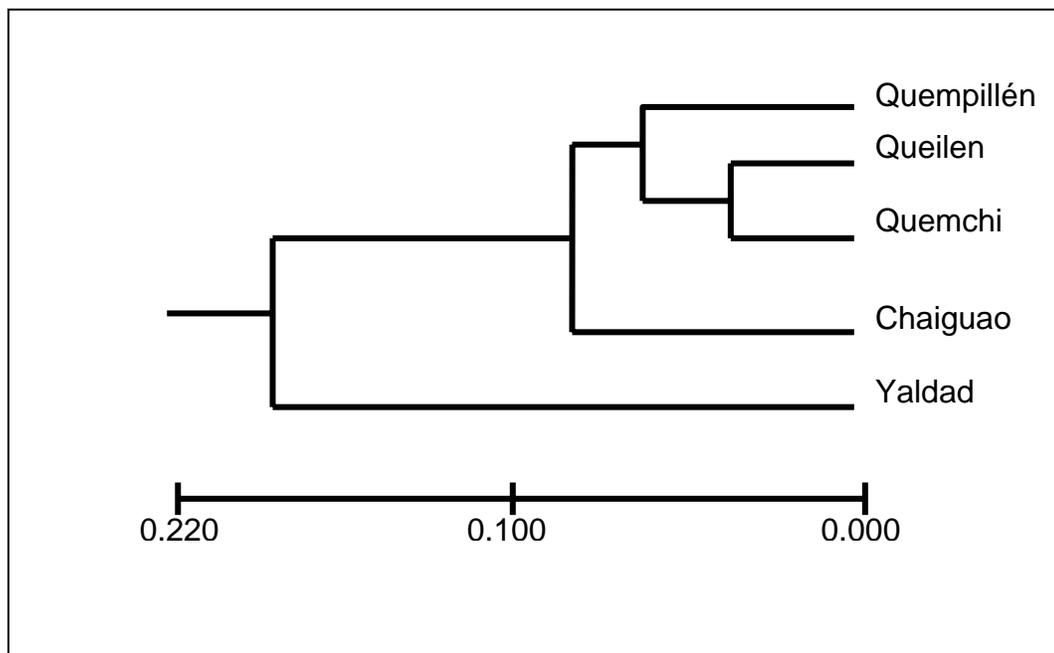


Figura 11. Dendrograma basado en UPGMA sobre las distancias génica de las muestras de *C. dilatata*.

ANEXO TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los partidores utilizados que amplificaron patrones de bandas polimórficas.

CRE 20	5'- TAGCCCGCTT - 3'
CRE 28	5' - GTGCGTCCTC - 3'
CRE 35	5'- ACGACGTAGG - 3'

Tabla 2. Número y porcentaje de loci polimórficos, para cada especie y en cada una de las poblaciones estudiadas.

	Quempillén	Quemchi	Dalcahue	Queilen	Chaiguao	Yaldad	Total
C. dilatata	20 58.82%	20 58.82%	----	22 64.71 %	19 55.88 %	----	29 85.2 %
C. fecunda	16 47.06 %	30 88.24 %	27 79.41 %	29 85.29 %	29 85.29 %	21 61.76 %	34 100%

Tabla 3. Distancia génica para *C. dilatata*, obtenida en base a los cálculos bajo de la diagonal (Nei, 1972) y sobre la diagonal (Nei, 1978). Valores subrayados indican las estimaciones extremas de las distancias génicas.

Población	Quempillén	Quemchi	Queilen	Chaiguao	Yaldad
Quempillén	****	0.0484	<u>0.0084</u>	0.0178	<u>0.1700</u>
Quemchi	0.0555	****	0.0216	0.0522	0.1004
Queilen	<u>0.0169</u>	0.0352	****	<u>0.0067</u>	0.1650
Chaiguao	0.0265	0.0660	<u>0.0219</u>	****	<u>0.2004</u>
Yaldad	0.1710	0.1064	<u>0.1725</u>	<u>0.2080</u>	****

Tabla 4. Distancia génica para *C. fecunda*, obtenida en base a los cálculos bajo de la diagonal (Nei, 1972) y sobre la diagonal (Nei, 1978). Valores subrayados indican las estimaciones extremas de las distancias génicas.

Población	Quempillén	Quemchi	Dalcahue	Queilen	Chaiguao	Yaldad
Quempillén	****	0.0369	0.0805	0.0747	0.0880	0.0734
Quemchi	0.0425	****	0.0336	<u>0.0131</u>	0.0314	0.06706
Dalcahue	0.0853	0.0367	****	0.0367	0.0593	<u>0.1018</u>
Queilen	0.0798	<u>0.0164</u>	0.0392	****	<u>0.0240</u>	0.0976
Chaiguao	0.0933	0.0349	0.0621	<u>0.0271</u>	****	<u>0.1042</u>
Yaldad	0.0796	0.0749	<u>0.1054</u>	0.1015	<u>0.1084</u>	****

Tabla 5. Heterozigocidad promedio, para cada especie en cada una de las poblaciones estudiadas.

Especies	Quempillén	Quemchi	Dalcahue	Queilen	Chaiguao	Yaldad
<i>C. dilatata</i>	0.09 ± 0.02	0.15 ± 0.03	----	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.03	----
<i>C. fecunda</i>	0.11 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.19 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.03

Tabla 6. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) para ***C. dilatata*** y ***C. fecunda***, mediante 999 permutaciones.

	Tratamiento	G.L	S. Cuadrados	C. Medios	% Varianza	P-Valor
<i>C. dilatata</i>	Interpoblacional	3	42.804	14.268	75.5 %	< 0.01
	Intrapoblacional	45	151.440	3.365	24.5%	
<i>C. fecunda</i>	Interpoblacional	5	207.714	41.543	73.9 %	< 0.01
	Intrapoblacional	171	638.433	3.734	26.1 %	

Tabla 7. Resumen de las distancias geográficas lineal de cada una de las poblaciones estudiadas.

Población	Quempillén	Quemchi	Dalcahue	Queilen	Chaiguao	Yaldad
Quempillén	***					
Quemchi	53.1 Km.	***				
Dalcahue	129 Km.	56.9 Km.	***			
Queilen	170 Km.	101 Km.	78.6 Km.	***		
Chaiguao	202 Km.	131 Km.	106 Km.	46.1 Km.	***	
Yaldad	228 Km.	162 Km.	141 Km.	70.8 Km.	39.1 Km.	***