



Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias

Profesor Patrocinante:
Dr. José Núñez N.
Instituto de Zoología
Facultad de Ciencias
Universidad Austral de Chile

Estructura y diversidad genética de poblaciones de *Crepipatella dilatata* (Lamarck, 1822) y *C. fecunda* (Gallardo, 1979) basadas en análisis de secuencias nucleotídicas de Citocromo Oxidasa I mitocondrial.

Tesis de Grado, presentada como parte de los requisitos para optar al grado de **Licenciado en Ciencias Biológicas**.

ANDRÉS RODRIGO VEJAR PARDO
VALDIVIA – CHILE
2007

*A mis padres, hermanos y de manera
muy especial a Verito, Ferni,
Andresito y Javi... los amo como a
nada en el mundo*

*“No hay que confundir nunca el conocimiento con la
sabiduría. El primero nos sirve para ganarnos la vida; la
sabiduría nos ayuda a vivir” (Carey).*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis más sinceros agradecimientos a mi profesor patrocinante y un gran formador y amigo, Dr. José Núñez N., por darme la oportunidad de realizar esta Tesis de Grado en el Laboratorio de Sistemática Molecular, brindándome sin restricciones su tiempo, dedicación y apoyo, además, de haber tenido la oportunidad de conocerlo como persona, lo que sin duda enriqueció mi formación durante mi estadía en el Instituto de Zoología.

A mis padres, que a pesar de los momentos difíciles, siempre me entregaron su amor, enseñanzas, exigencias y apoyo. Les debo en gran parte todo lo que soy.

De forma muy especial quiero agradecerle a mi esposa... Verito, gracias por el amor que día a día me entregas a pesar de la distancia, por tu gran comprensión y por apoyarme en todos los momentos difíciles, de ofuscación y frustración, pero por sobre todo, por compartir todas las alegrías y éxitos. A Fernandita y Andresito, por todo lo que solo las personas puras e inocentes pueden entregar.

Finalmente quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio, a Felipe y Benja con quienes tuve la suerte de afianzar una excelente amistad, por su incansable apoyo, crítica, traspaso de conocimiento y por haberme dado la posibilidad de conocerlos y compartir experiencias más allá de lo puramente académico.

Agradezco al Dr. Oscar Chaparro por haber facilitado gentilmente las muestras de la población de Quempillén.

Esta tesis fue financiada por el proyecto DID 200513 de la Dirección de Investigación de la Universidad Austral de Chile.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
1. RESUMEN	1
1.1 ABSTRACT	2
ABREVIATURAS	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1 OBJETIVOS GENERALES	9
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	9
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS	10
3.2 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	11
3.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	12
3.4 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE DNA	13
3.5 ANÁLISIS GENETICO POBLACIONAL	15
3.5.1 VARIABILIDAD GENÉTICA	15
3.5.2 DIFERENCIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA	17
4. RESULTADOS	19
4.1 AISLAMIENTO DE DNA GENOMICO	19
4.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	19
4.3 ALINEAMIENTO DE LAS SECUENCIAS	12

4.4 ANÁLISIS GENETICO POBLACIONAL	12
5. DISCUSIÓN	29
5.1 CONCLUSIONES	37
6. BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXO	48

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de las zonas de muestreo, indicando las poblaciones donde fueron recolectados los especímenes de *C. fecunda* (Aucho, Chiquihue y Metri) y *C. dilatata* (Quempillén, Punta Arenas y Coquimbo). 14
- Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% de DNA genómico de *C. dilatata* y *C. fecunda*. Carril 1: Estándar λ HindIII; Carril 2 – 3: DNA genómico de *C. dilatata*; Carril 4: DNA genómico de *C. fecunda*. 20
- Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de Producto de PCR del fragmento de COI. Carril 1: Estándar λ HindIII; Carril 2 – 3: Producto PCR purificado de *C. dilatata*; Carril 4, 5 y 6: Producto PCR purificado de *C. fecunda*. 21

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia y número de haplotipos de las poblaciones de <i>C. fecunda</i> y <i>C. dilatata</i> .	23
Tabla 2. Frecuencia y número de haplotipos compartidos de las poblaciones de <i>C. fecunda</i> y <i>C. dilatata</i> .	24
Tabla 3. Parámetros genéticos de diversidad para las poblaciones de <i>C. fecunda</i> y <i>C. dilatata</i> . <i>H</i> : índice de diversidad haplotípica; π_n : índice de diversidad nucleotídica; π : número promedio de diferencias de bases entre las secuencias.	25
Tabla 4. Distribución de la variación genética solo entre las poblaciones con desarrollo directo.	26
Tabla 5. Distribución de la variación genética entre las poblaciones con desarrollo indirecto.	27
Tabla 6. Distancia genética derivada de los valores de Φ_{st} para la comparación entre pares de poblaciones de <i>C. fecunda</i> (Metri, Chiquihue, Aucho) y <i>C. dilatata</i> (Quempillén, Coquimbo y P. Arenas).	28
Tabla 7. Tasa de migración derivada de los valores de Φ_{st} entre las poblaciones de <i>C. fecunda</i> , <i>C. dilatata</i> y las poblaciones de Punta Arenas.	28

ABREVIATURAS

COI:	citocromo oxidasa I
DNA:	ácido desoxirribonucleico
dNTP:	desoxinucleótidos trifosfato
EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
km	kilómetro
M:	molar
ml:	mililitro
µl:	microlitro
mM:	milimolar
mtDNA:	DNA mitocondrial
ng:	nanogramo
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa
rpm:	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
UV:	ultravioleta
V:	voltios

1. RESUMEN.

La estructura genética de las poblaciones de invertebrados marinos es el resultado de una compleja interacción entre procesos históricos, ecológicos, demográficos y conductuales que actúan tanto a nivel temporal como espacial, determinando principalmente tasas y patrones de dispersión de gametos, cigotos, larvas y adultos. En el presente Trabajo de Tesis se evalúa la diversidad y estructura genética de poblaciones de *Crepipatella dilatata* y *C. fecunda*, especies morfológicamente crípticas de gastrópodos presentes en las costas chilenas cuyos adultos están mayoritariamente en simpatría, son de hábitos sésiles y difieren en sus modos reproductivos (desarrollo directo e indirecto respectivamente). Este estudio involucró la amplificación y secuenciación de un fragmento de 610 pb de Citocromo Oxidasa I mitocondrial (COI). El análisis genético poblacional de estas secuencias nucleotídicas mostró que *C. fecunda* tiene una mayor diversidad genética y menor estructuramiento poblacional que *C. dilatata*, resultado que es concordante con lo que se esperaba según sus respectivos modos de desarrollo. Se discute acerca de la utilidad de estas dos especies como modelo biológico para estudiar las interacciones entre modos de desarrollo y diversidad genética.

1.1 ABSTRACT

Genetic structure of marine invertebrate populations is the result of complex interactions among historical, ecological, demographic, and behavioural processes that act as temporal and spacial level, determining mainly rates and patterns of dispersion of gametes, zygotes, larvae and adults. In this Thesis, I evaluate the genetic diversity of populations of *Crepidatella dilatata* and *C. fecunda*, two morphologically cryptic species of gastropods that occur in the intertidal Chilean coasts. These species occur mainly in sympatry, have sessile habits and differ in their developmental modes (direct and indirect development respectively). This study involves the amplification and sequencing of a 610 bp fragment of mitochondrial Cytochrome Oxidase, COI. The genetic analysis of the nucleotidic sequences showed that *C. fecunda* has higher genetic diversity and lower populational structuring than *C. dilatata*, results that are concordant with the hypothesis and their respective developmental modes. The utility of both species to study the interactions between development modes and genetic diversity is discussed.

2. INTRODUCCIÓN

En los ambientes marinos, la distribución geográfica de las especies generalmente es más extensa que la capacidad de dispersión de los individuos que la componen (Knowlton, 1993), de manera que en el tiempo las poblaciones se pueden diferenciar genéticamente a través de aislamiento por distancia: aquellas poblaciones más próximas resultarán más similares entre sí, que aquellas poblaciones más distantes (Bossart & Prowell, 1998; Poulin *et al.*, 2001).

Sin embargo, no hay una causa única y general que establezca los límites de distribución de las especies, razón por la que en la última década ha habido un interés creciente por conocer y definir los procesos ecológicos y evolutivos que afectan la distribución de estos grupos de animales. En la mayoría de estos estudios se han considerado tópicos tales como barreras geográficas (Carballo *et al.*, 1997; Boury-Esnault *et al.*, 1999), corrientes oceánicas (Billingham & Ayre, 1996), fragmentación de hábitats (King *et al.*, 1999; Pfenninger & Posada, 2002), dinámica de poblaciones locales (Toyohara *et al.*, 1999; Tarjuelo *et al.*, 2001) y diferencias en los modos de desarrollo (Todd *et al.*, 1998; Kyle & Boulding, 2000; Collin, 2001).

Con respecto a los modos de desarrollo y dado que en los ambientes marinos no hay barreras tan evidentes para la dispersión como en los ambientes terrestres, la norma esperada indica que especies con alto potencial de dispersión como aquellas con larva planctotrófica, tendrían una distribución más amplia y una estructura poblacional menos evidente que aquellas especies con bajo potencial de dispersión, como las especies con desarrollo directo, que tendrían una estructura poblacional

especialmente más marcada (De Wolf *et al.*, 1998; Meyer 2003). Ejemplo de la anterior son los estudios de Bahonak (1999) y Collin (2001) quienes indican una relación estadísticamente significativa entre la capacidad de dispersión larval y los niveles de subdivisión geográfica.

Sin embargo, un número considerable de estudios (Hellberg, 1996; Hoskin, 1997; Cunningham & Collins, 1998; Benzie, 1999, y referencias incluidas) no concuerdan con este modelo señalando que el potencial de dispersión tiene poca relación con los niveles de estructura poblacional y que por tanto no se puede extraer la conclusión general de que las diferencias en los modos de desarrollo resultan en diferencias en la distribución geográfica y estructura genética de las poblaciones.

Cabe señalar que en la mayoría de los estudios antes citados, la escasez de un modelo biológico adecuado es evidente, de hecho, se comparan principalmente especies que difieren considerablemente en su morfología, ecología y rangos de distribución; sin duda los elevados niveles de convergencias adaptativas hacen los resultados poco consistentes.

La presente Tesis tiene por objetivo examinar la diversidad genética de dos especies del género *Crepidatella*: *Crepidatella dilatata* (Lamarck 1822) y *C. fecunda* (Gallardo 1979), gastrópodos presentes en las costas chilenas cuyos adultos están mayoritariamente en simpatría, son de hábitos sésiles y difieren en sus modos reproductivos.

Desde el punto de vista morfológico, estas dos especies presentan un elevado grado de similitud, razón por la que por mucho tiempo fueron consideradas como una sola especie. Los argumentos que indican que se trata de especies crípticas fueron

discutidos por Gallardo (1977; 1979) y estuvieron basados en rasgos de la biología reproductiva de estas especies tales como tamaño de las hembras y machos, comportamiento sexual de los machos y especialmente diferencias claras en el patrón de desarrollo. En *C. fecunda* el tipo de desarrollo es planctotrófico (*sensu* Thorson, 1950), es decir, todos los huevos de la ovicápsula entran en desarrollo, no hay huevos nutricios y en la eclosión se liberan larvas de vida libre de tamaño aproximado 500 μm (Gallardo, 1979). *Crepipatella dilatata* presenta desarrollo intracapsular directo (*sensu* Thorson, 1950) del tipo lecitotrófico adelfofágico, donde sólo el 5-8 % de los huevos entran en desarrollo, siendo los restantes consumidos por los embriones como huevos nutricios (Gallardo, 1977). De la cápsula no eclosionan larvas, sino estados juveniles cuyas conchas miden entre 0,9 y 1,3 mm de longitud (Gallardo, 1979).

En Chile, el rango de distribución de *C. dilatata* se extiende desde los 21° 11`S (Bahía de San Marcos) hasta los 55°S (Tierra del Fuego) y el de *C. fecunda* se extiende desde los 36°40`S (Península de Tumbes) hasta los 45° 43`S (Fiordo de Quitrarco). En varias localidades de este rango de distribución *C. dilatata* y *C. fecunda* se encuentran en simpatria, situación en la que *C. dilatata* forma poblaciones menos abundantes (Gallardo, 1979). Ambas especies se encuentran en ambientes submareales e intermareales y son más frecuentes en playas con bolones y bloques, ambientes de origen glaciar, muy típicos de los canales y bahías interiores de los archipiélagos australes. En ambientes submareales de estos canales, *C. dilatata* es un epibionte común de *Austromegalobalanus psittacus* y *Aulacomya ater*. Por su parte *C. fecunda* es epibionte común de *A. ater* y *Choromytilus chorus* y con menor frecuencia de *A. psittacus*.

En el último tiempo, la necesidad y posibilidad de un estudio más directo del material genético, ha permitido incrementar cada vez más el uso de marcadores moleculares de DNA (Collin, 2003; Oines, 2005) dado que presentan un mayor poder de resolución y eficiencia para poder detectar las diferencias de variabilidad genética entre poblaciones o individuos (Avice, 1994; 2000). La mayoría de los análisis de variabilidad del material genético en poblaciones naturales se ha enfocado en el DNA mitocondrial (mtDNA), debido a que posee un genoma haploide, y es heredado generalmente por vía materna, sin que ocurra recombinación génica (Oines, 2005, Vietes, 2006) y por tanto puede ser tratado como un solo locus génico, lo que a su vez facilita la interpretación y el tratamiento estadístico de los datos (Rodríguez, 2004). Por otra parte, algunos genes del mtDNA poseen una alta tasa de evolución, que en los vertebrados, por ejemplo, es cuatro veces más rápida que la mayoría de los de genes nucleares (Birky *et al.*, 1983; Wilson *et al.*, 1985). El hecho de que algunos los genes mitocondriales evolucionen más rápido que la contraparte nuclear, permite la identificación de caracteres filogenéticos y genealógicos entre taxa de estrecha relación como las especies y poblaciones (Brown *et al.*, 1979; Rodríguez, 2004). La variabilidad del mtDNA ha sido utilizada para estudiar la estructura genética de las poblaciones de vertebrados e invertebrados marinos (Ovenden, 1990; Vietes, 2006), incluido gastrópodos de la familia Calyptraeidae (Collin, 2001).

La estructura genética de las poblaciones se ha estudiado en términos de estadísticos- F , desde que Wright (1978) propusiera medir la desviación de las frecuencias genotípicas mediante los parámetros F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} . Actualmente, la estimación de parámetros puede realizarse haciendo uso de la información molecular

presente en las poblaciones que forman la muestra con el método conocido como Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). Existen varios estimadores de la variabilidad genética que se emplean cuando se trabaja con secuencias de DNA, siendo las más frecuentes: Diversidad haplotípica y Diversidad Nucleotídica (π_n) (Fontdevila, 1999).

Sobre la base de los rasgos de modos de desarrollo, morfología, ecología y parentesco filogenético entre *C. dilatata* y *C. fecunda*, en este trabajo de tesis se propone la siguiente hipótesis.

Las poblaciones de *Crepipatella* que presentan desarrollo directo están estructuralmente más diferenciadas entre sí y poseen una diversidad genética menor que las poblaciones que poseen desarrollo indirecto.

En su contexto teórico, en este estudio se pretende evaluar a *C. dilatata* y *C. fecunda* como un modelo biológico para generar hipótesis acerca de cómo el modo de desarrollo puede ser un condicionador importante en la diferenciación y estructuración genética de sus poblaciones.

2.1 Objetivo General

- Examinar a través de secuencias nucleotídicas mitocondriales (Citocromo Oxidasa I, COI) la diversidad genética y el grado de diferenciación poblacional de *C. dilatata* y *C. fecunda*.

2.2 Objetivos específicos

- Obtener muestras de tejido de los individuos de poblaciones de *C. dilatata* y *C. fecunda*.
- Secuenciar la región correspondiente a COI (650 nucleótidos aprox.) de DNA genómico aislado poblaciones de *C. dilatata* y *C. fecunda*.
- Evaluar la varianza molecular intrapoblacional e interpoblacional de *C. dilatata* y *C. fecunda*.
- Estimar índices de diversidad genética para las poblaciones de *C. dilatata* y *C. fecunda*.
- Obtener estimaciones del flujo génico (N_m) entre las poblaciones de *C. dilatata* y *C. fecunda*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras Biológicas

Se analizaron 75 muestras de ejemplares de *Crepipatella dilatata* y *Crepipatella fecunda*, provenientes de seis localidades geográficas de Chile (Fig. 1); 15 ejemplares de Bahía de Chiquihue (41°36' S; 73°05' W), cuatro ejemplares de Bahía de Coquimbo (29°58' S; 71°21' W), 14 ejemplares de Bahía Metri (41°36' S; 72°41' W), 15 ejemplares de Quempillén (41°52' S; 73°46' W), 15 ejemplares de Aucho (42°04' S; 73°23' W) y 12 ejemplares de Punta Arenas (53°13' S; 70°57' W). Los individuos fueron trasladados vivos al laboratorio en donde se procedió a retirarlos con una espátula del sustrato en que se encontraban. Las especies se identificaron por el modo de desarrollo observado en la cápsula, según lo descrito por Gallardo (1979). Para obtener las muestras de tejido se cortaron aproximadamente 500 mg del músculo del pie del individuo y se almacenó en un tubo Ependorff con 1 ml de etanol 95%.

En el caso de la población de Punta Arenas, se clasificó *a priori* como *C. dilatata* ya que en su morfología y distribución geográfica concordaba con la descripción para esta especie. En un análisis de las cápsulas de los individuos de esta población se observó que presentaban un desarrollo intermedio (Comunicación personal Dr. Carlos Gallardo), pero al final de éste eclosionan juveniles, por lo que esta población fue considerada para efectos de análisis como una población con desarrollo directo.

3.2 Extracción de DNA genómico

El DNA se extrajo mediante el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989), al cual se le realizaron algunas modificaciones: Se extrajo aproximadamente 50 mg de muestra de tejido preservado en etanol 95% y se secó para eliminar el alcohol residual. Se depositó en un tubo Ependorff estéril de 1,5 ml. Al tubo se le agregaron 500 µl de buffer STE 1X (Tris-HCl 50 mM pH 8,5, EDTA 25 mM), 25 µl de SDS 20%, 15 µl de proteinasa K 20 mg/ml. Se incubó por dos horas a 55° C en un baño termostático, con agitación periódica de la muestra. Una vez terminada la incubación, se le agregó un volumen de fenol saturado (Invitrogen) y se agitó por vortex hasta obtener una emulsión. Esta emulsión se centrifugó a 10.000 r.p.m por cinco minutos a temperatura ambiente. Enseguida se recuperó la fase acuosa y se colocó en tubos nuevos estériles, posteriormente, se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y 40 µl de acetato de sodio 3 M pH 5,3. Se agitó suavemente y se dejó precipitar el DNA en un congelador a -20°C por un mínimo de 2 horas. El precipitado se recuperó centrifugando a 10.000 r.p.m por 10 minutos a 4° C. El sobrenadante se eliminó y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente por al menos una hora. Una vez seca la muestra se le agregó 100 µl de agua desionizada estéril y se almacenó a -20°C.

Para evaluar el producto de la extracción se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0,75%. Para la preparación del gel, se pesó 0,6 gr de agarosa (Invitrogen), y se agregó 80 ml de buffer SB (NaOH 10 mM ajustado a pH 8,5 con H₃BO₃) y 4 µl de bromuro de etidio (0,5 µg/ml). El gel se cargó con 10 µl de muestra (7 µl de producto de extracción y 3 µl de buffer de carga). La electroforesis se realizó por

30 minutos a 100 V. El gel se visualizó en un transluminador UV y se fotografió con una cámara digital.

3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y purificación de los productos de PCR.

Se amplificaron aproximadamente 650 nucleótidos de la región mitocondrial COI, a partir de 5,0 µl de DNA genómico con una concentración aproximada de 50 a 120 ng/ml; 5,0 µl de tampón de PCR 10x (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM KCl); 2µl de dNTP mix 10 mM; 1,5 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,5 µl de *Taq* polimerasa; 2,0 µl del partidor **LCO1490** (5'- gct caa atc ata aag ata ttg g - 3') y 2,0 µl del partidor **HCO 2198** (5'- taa act tca ggg tga cca aaa aat ca - 3'). Se completó a 50 µl con agua destilada desionizada estéril (Folmer et al., 1994; Collin, 2003). Las condiciones de amplificación fueron: denaturación inicial a 94° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación enzimática, constando cada ciclo de 45 segundos de denaturación a 92° C, 60 segundos de reasociación a 50 – 55° C y 45 segundos de extensión a 72° C. El producto PCR fue chequeado mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

El producto de PCR obtenido se purificó con el kit *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN) siguiendo el siguiente protocolo: El DNA amplificado se transfirió a una columna de purificación. Se le agregaron 500 µl de tampón QG. La mezcla se centrifugó por un minuto a 10.000 r.p.m. Se descartó el eluido del tubo colector y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Al tubo colector se le agregó 700 µl de tampón PE y se centrifugó por un minuto a 10.000 r.p.m. La columna de purificación se transfirió a un tubo Ependorff nuevo, limpio y estéril. Se eluyó con 50 µl de agua

destilada desionizada estéril calentada a 50° C, se dejó reposar por tres minutos. Transcurrido el tiempo se centrifugó por un minuto a 10.000 r.p.m. El eluido se guardó a - 20° C. El proceso de purificación se evaluó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Una vez terminada la electroforesis el gel de agarosa al 1% se fotografió y se procedió a calcular la concentración de la muestra utilizando el programa UN SCAN IT V4.1. Una vez evaluada las muestras y calculadas sus concentraciones, se enviaron a la empresa Macrogen Korea, para su secuenciación.

3.4 Análisis de las Secuencias

Para el análisis de las secuencias nucleotídicas de Citocromo Oxidasa I fue necesario construir una matriz en la cual se identificaron las poblaciones de la siguiente manera: Metri (Mt), Chiquihue (Ch), Quempillén (Qm), Punta Arenas (Pa), Aucho (Au) y Coquimbo (Cq). El alineamiento se realizó con el programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Para optimizar el resultado del alineamiento, se realizó en repetidas oportunidades evaluando los costos de apertura de *gap* desde 30 a 70, y en forma paralela se realizó un análisis visual de las matrices de alineamiento obtenidas, eliminando nucleótidos extremos que no tenían sentido dentro de la secuencia y que solo producían segmentos no informativos para el análisis. En algunos casos se realizaron modificaciones en la posición de los *gap*, privilegiando la homología de posición de los nucleótidos entre secuencias, así como también, se retiraron algunos *gap* según la lectura del cromatograma de la secuencia original.

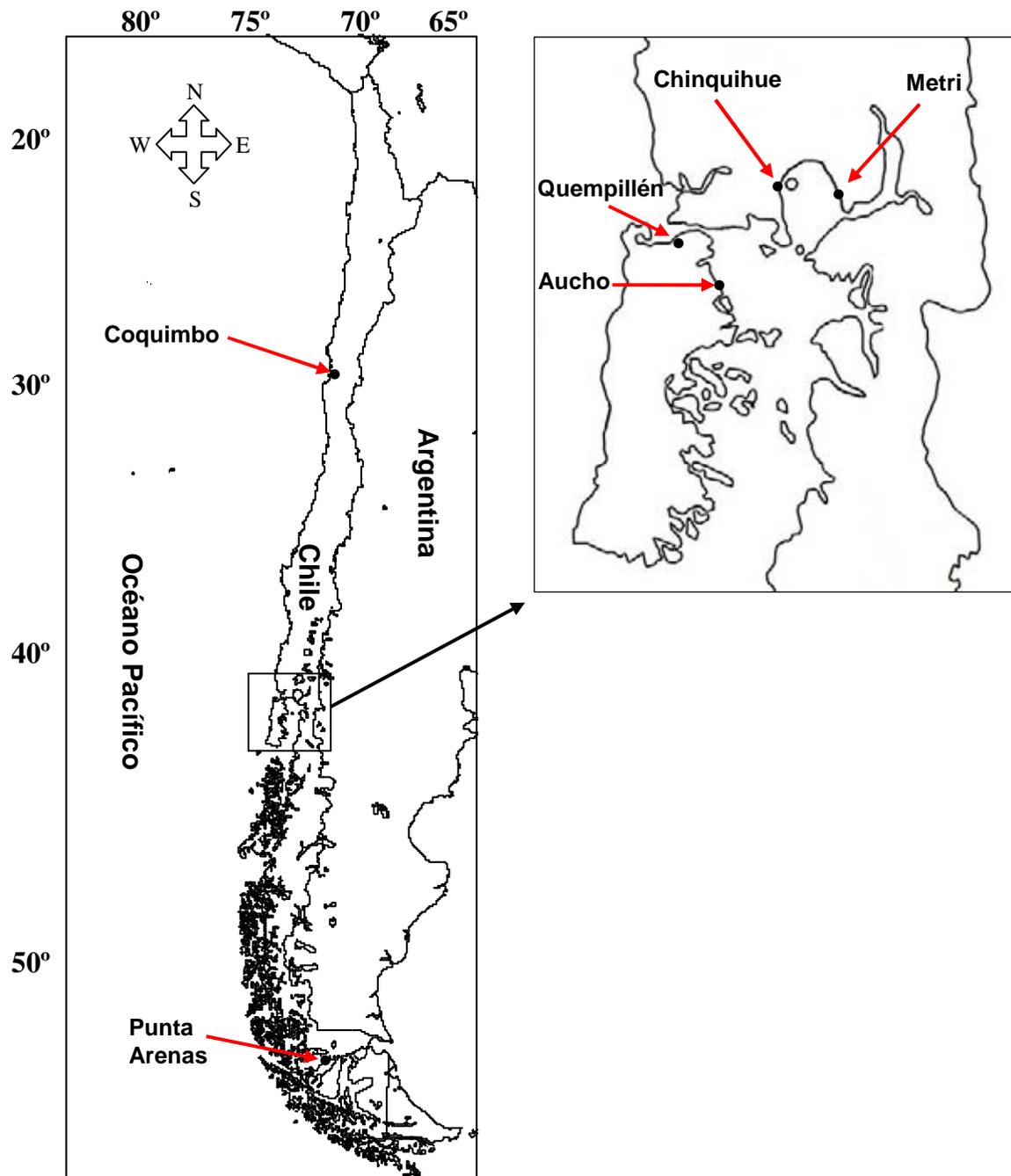


Figura 1. Mapa de las zonas de muestreo, indicando las poblaciones donde fueron recolectados los especímenes de *C. fecunda* (Aucho, Chinquihue y Metri) y *C. dilatata* (Quempillén, Punta Arenas y Coquimbo).

Para corroborar si las secuencias obtenidas producto del alineamiento tenían sentido biológico se procedió a realizar la traducción de la secuencia con el programa BioEdit v7.0.5.3 (Hall, 1999).

3.5 Análisis Genético Poblacional.

El análisis estadístico de la información genética de este locus, dentro y entre las poblaciones de *C. dilatata* y *C. fecunda*, fue inferido por la comparación entre las secuencias de los individuos de las poblaciones con desarrollo directo e indirecto independientemente, aplicando el programa Arlequin v3.1 (Schneider *et al.*, 2006).

3.5.1 Variabilidad genética

Índice de diversidad haplotípica (H)

Este índice es el equivalente a la heterocigosidad esperada para datos diploides y estima la variabilidad genética en términos del número de haplotipos presentes en la muestra y sus respectivas frecuencias (Nei, 1987). Este índice, es definido como la probabilidad de que dos haplotipos de la muestra, elegidos al azar, sean diferentes y se expresa por la fórmula:

$$H = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right)$$

donde n es el tamaño de la muestra, k es el número de haplotipos y p_i , es la frecuencia del haplotipo de la muestra (Nei, 1987).

Índice de diversidad nucleotídica (π_n)

Este índice determina la heterocigosidad o diversidad genética al nivel de nucleótidos, por medio de las diferencias entre secuencias de haplotipos, estimando la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos de posición escogidos al azar sean diferentes (Nei y Li, 1979; Nei y Tajima, 1981). Se obtiene valorando el número promedio de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias con la siguiente relación:

$$\pi_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j d_{ij}}{L}$$

donde p son las frecuencias de cada uno de los nucleótidos i , y j que son comparados, d la distancia genética entre nucleótidos, y L es el número de loci. La determinación del valor promedio se derivó del promedio de los valores de π para cada una de las poblaciones de *C. fecunda* y *C. dilatata*, mientras que el valor global se obtuvo agrupando solamente las secuencias.

Número promedio de diferencias de bases entre las secuencias

Es el número promedio de diferencias por sitio. Es decir, el número promedio de nucleótidos diferentes por sitio entre dos haplotipos (p). y se determina por la fórmula:

$$\hat{\pi} = \sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij}$$

donde d es estimado por el número de mutaciones que ha ocurrido desde la divergencia de los haplotipos i y j , k es el número de haplotipos y p es la frecuencia del

haplotipo *i*. Un análisis adicional aplicado, fue la corrección a los valores de distancia genética según el modelo de Kimura 2P (Kimura, 1980). Este estadístico toma en cuenta que no todas las sustituciones tienen la misma probabilidad de ocurrir y además corrige por las diferencias entre las tasas de sustitución transicionales y transversionales.

3.5.2 Diferenciación y estructura genética

Estructura genética de la población inferida por el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Para estimar la estructura genética de las poblaciones de *C. fecunda* y *C. dilatata* se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier, 1992), empleando el algoritmo de Arlequín v3.1. Este análisis es similar a otros que emplean la varianza de las frecuencias génicas, pero considera también el número de mutaciones que ocurren entre haplotipos empleando un análisis jerárquico para evaluar las diferencias dentro y entre individuos de una población y entre poblaciones, para definir los índices de fijación definidos por Wright (1978) en función de coeficientes de endogamia. Para este análisis se conformaron grupos de poblaciones. El criterio para separar las poblaciones en grupos, fue el modo de desarrollo que presentaba la población.

Comparaciones de los valores de Φ_{st} entre pares de poblaciones

A manera de medir distancias genéticas entre las poblaciones, se utilizó el valor de AMOVA, aplicando una ligera transformación al tiempo de divergencia de la población, para linealizar las distancias (Reynolds *et. al* 1983, Slatkin, 1995). Los

valores de las comparaciones por pares de poblaciones de la Φ_{st} son expresados en una matriz. La distribución nula de estos valores bajo la hipótesis de no diferencia, entre las poblaciones fue obtenida por permutaciones (bootstrapping) (Felsenstein, 1985) de los haplotipos entre todas las poblaciones.

Estimación del flujo génico entre poblaciones (Nm)

Los resultados del AMOVA fueron utilizados para cuantificar el flujo génico por vía materna (aproximación de la tasa de migrantes por generación), por la comparación entre pares de poblaciones. Para ello, se utilizó la relación:

$$N_e m = \frac{1}{2} (1 / \Phi_{ST} - 1)$$

donde N es el tamaño efectivo de la población y m es la tasa de migración (Nei & Tajima, 1981). Para este calculo se usó el parámetro Φ_{st} del AMOVA incluido en el programa Arlequín v3.1.

4. RESULTADOS

4.1 Aislamiento de DNA.

Se aisló DNA genómico de un total de 75 individuos. De las poblaciones de *C. fecunda* se obtuvieron 44 muestras de DNA, de las cuales, 15 corresponden a Bahía Chiquihue, 14 a Bahía Metri y 15 a Aucho. De *C. dilatata* se obtuvieron 31 muestras de DNA, cuatro provenientes de Bahía Coquimbo, 15 de Quempillén y 12 de DNA de Punta Arenas.

La concentración de DNA fluctuó entre 1,2 y 1,6 mg/ml. La integridad y pureza de una alícuota de ADN genómico de *C. dilatata* y *C. fecunda* se aprecia por el alto peso molecular sin muestras de degradación o contaminación en el gel de agarosa (Fig. 2).

4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación.

Con el resultado de aislamiento se aseguró un templado de buena calidad para la amplificación de secuencias del gen COI de las distintas poblaciones. Las secuencias del gen COI se obtuvieron por PCR con los partidores LCO1490 y HCO 2198 a partir de DNA genómico de las distintas poblaciones. Se obtuvo un fragmento de 650 pb aproximadamente, determinado por la migración en el gel con respecto a un estándar de tamaños moleculares. La ausencia de cualquier tipo de amplificación inespecífica (Figura 3) sugiere que éste fragmento corresponde a la secuencia COI específica. La concentración de DNA amplificado varió entre 43,34 y 150 ng/ml. Se obtuvieron 74 secuencias de 660 pb. Una muestra de la población de Punta Arenas no fue correctamente secuenciada, probablemente por un error en la reacción de amplificación.

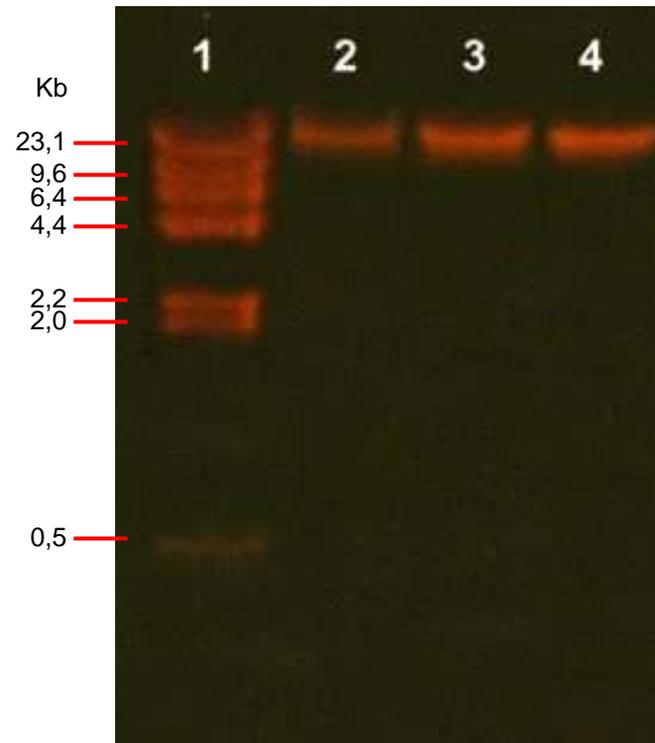


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% de DNA genómico de *C. dilatata* y *C. fecunda*. Carril 1: Estándar λ HindIII; Carril 2 – 3: DNA genómico de *C. dilatata*; Carril 4: DNA genómico de *C. fecunda*.

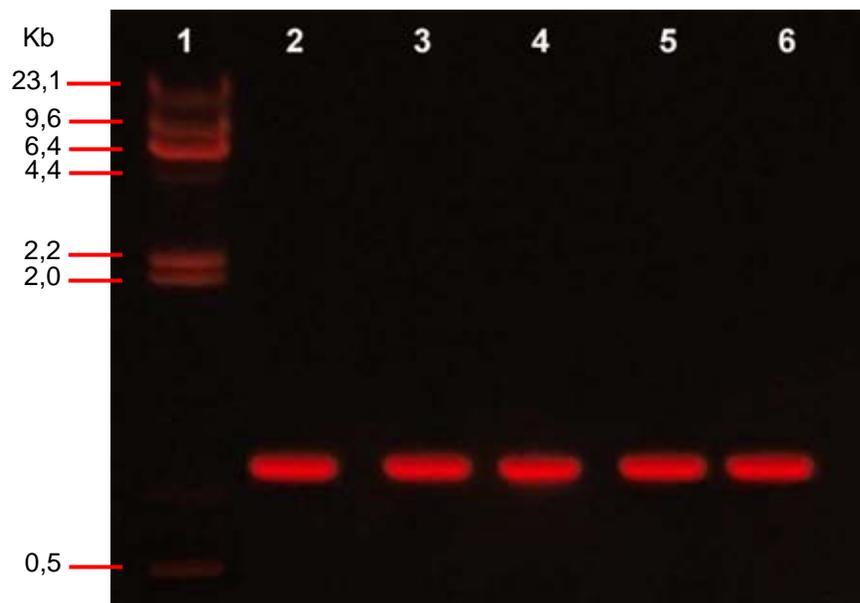


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de Producto de PCR del fragmento de COI. Carril 1: Estándar λ HindIII; Carril 2 – 3: Producto PCR purificado de *C. dilatata*; Carril 4, 5 y 6: Producto PCR purificado de *C. fecunda*.

4.3 Alineamiento de las secuencias

El alineamiento se realizó con el programa ClustalX (Thompson et al. 1997). Se obtuvo una matriz de 74 secuencias de una longitud de 610 pb. Tras la revisión de las secuencias en el alineamiento y la comparación con los cromatogramas pudieron ser removidos los *gaps* presentes en las secuencias de la matriz.

La traducción de las secuencias alineadas generó aminoácidos válidos para el código genético mitocondrial.

4.4 Análisis Genético Poblacional

Con la matriz obtenida en el alineamiento se realizó un análisis genético poblacional que arrojó los siguientes resultados:

De los 74 individuos analizados se encontraron 29 haplotipos (Tabla 1). Las poblaciones con desarrollo indirecto (Chinquihue, Aucho y Metri) comparten una mayor cantidad de haplotipos (Tabla 2). Los haplotipos que presentaron una frecuencia mayor entre las poblaciones con desarrollo indirecto fueron el 24 y el 29, encontrándose presente el haplotipo 24 en cinco veces en la población de Metri, tres veces en la población de Chinquihue y una vez en la población de Aucho, de la misma forma, el haplotipo 29 se encuentra compartido cuatro veces con Metri, seis veces con Chinquihue y nueve veces en la población de Aucho. En contraste, en las poblaciones con desarrollo directo (Quempillén, Coquimbo y P. Arenas) solo dos poblaciones comparten un haplotipo (Tabla 2).

En las poblaciones de *C. dilatata* los índices de diversidad haplotípica (H) fueron bajos (Tabla 3) lo que concuerda con la cantidad de haplotipos presentes en cada

población. En la población de Quempillén se presentaron tres haplotipos ($H= 0,361$), en Coquimbo se encontraron tres haplotipos ($H= 0,009$) y en la población de Punta Arenas solo se encontraron 2 haplotipos y el índice de diversidad genética fue de 0,181.

Tabla 1. Frecuencia y numero de haplotipos de las poblaciones de *C. fecunda* y *C. dilatata*.

Haplotipo	Desarrollo directo			Desarrollo indirecto		
	Quempillén	Coquimbo	P. Arenas	Metri	Chinquihue	Aucho
1	12					
2	2					
3	1					
4		2				
5		1				
6		1				
7			10			
8			1			
9				1		
10				1		
11				1		
12				1		
13				1		
14				4		
15				5		
16					3	
17					1	
18					6	
19					1	
20					1	
21					2	
22					1	
23						1
24						1
25						1
26						1
27						1
28						1
29						9
Total Individuos	15	4	11	14	15	15

Para las poblaciones de *C. fecunda* los índices de diversidad haplotípica fueron altos, así como también, en número de haplotipos por población. En Metri, Chiquihue y Aucho se presentaron siete haplotipos distintos y sus índices de diversidad genética fueron 0,824, 0,819 y 0,657 respectivamente.

Tabla 2. Frecuencia y número de haplotipos compartidos de las poblaciones de *C. fecunda* y *C. dilatata*.

Haplotipo	Desarrollo directo			Desarrollo indirecto		
	Quempillén	Coquimbo	P. Arenas	Metri	Chiquihue	Aucho
4	2	2				
24				5	3	1
25				1	1	1
27				1	1	1
28					2	1
29				4	6	9

La Tabla 3 resume los índices de diversidad molecular. Se observa que en las poblaciones de Quempillén, Metri, Chiquihue, Aucho, y Coquimbo el número de sitios polimórficos varía entre 8 y 11. En la población Punta Arenas solo se encuentra un sitio polimórfico (Anexo I). Solo se observaron mutaciones puntuales siendo las más frecuentes las transiciones que variaron entre siete y 10 por población, a excepción de Punta Arenas que no se observó ninguna. Las tranversiones fueron poco frecuentes, presentándose solo dos en las Poblaciones de Metri y Coquimbo y una en la población de Punta Arenas.

La razón Ts/Tv (Tabla 3) tuvo un valor de infinito en las poblaciones Quempillén, Chiquihue y Aucho. En la población de Punta Arenas tuvo un valor de cero. En Metri tuvo un valor de 3,5 y en Coquimbo de 4,5.

El Índice de diversidad nucleotídica para las poblaciones con desarrollo directo varió entre $2,98 \times 10^{-4}$ y $9,12 \times 10^{-4}$. Este índice fue mayor en las poblaciones con desarrollo indirecto fluctuando entre $2,41 \times 10^{-3}$ y $2,94 \times 10^{-3}$.

La población que obtuvo el mayor promedio de diferencias de bases entre pares de secuencias fue Coquimbo con 5,567 nucleótidos, y el valor más bajo se observó en Chiquihue que fue de 1,472 nucleótidos por pares de secuencia.

Tabla 3. Parámetros genéticos de diversidad para las poblaciones de *C. fecunda* y *C. dilatata*. *H*: índice de diversidad haplotípica; π_n : índice de diversidad nucleotídica; π : número promedio de diferencias de bases entre las secuencias.

	Desarrollo directo			Desarrollo indirecto		
	Quempillén	Coquimbo	P. Arenas	Metri	Chiquihue	Aucho
Tamaño de la Muestra	15	4	11	14	15	15
Nº de Nucleótidos	610	610	610	610	610	610
Nº de Haplotipos	3	3	2	7	7	7
Nº de Sitios Polimorficos	10	11	1	9	8	9
Nº de Transiciones (Ts)	10	9	0	7	8	9
Nº de Tranversiones (Tv)	0	2	1	2	0	0
Razón Ts/Tv	∞	4,5	0	3,5	∞	∞
<i>H</i>	0,361	0,833	0,181	0,824	0,819	0,657
π_n	$3,92 \times 10^{-4}$	$9,12 \times 10^{-4}$	$2,98 \times 10^{-4}$	$2,94 \times 10^{-3}$	$2,41 \times 10^{-3}$	$2,54 \times 10^{-3}$
π	2,396	5,567	0,182	1,798	1,472	1,55

Se realizaron dos análisis de AMOVA. En el primer análisis se incluyeron a las poblaciones con desarrollo directo. El primer grupo estuvo conformado por las poblaciones de Quempillén y Coquimbo, y el segundo grupo lo conformó la población de Punta Arenas. El porcentaje de variación entre los grupos fue de un 78,86%, entre poblaciones dentro de grupos fue de un 5,88% y dentro de las poblaciones fue de 15,27%. El valor de Φ_{st} para este análisis fue de 0,847 con un valor de P de cero, por lo que grado de diferenciación entre poblaciones es significativo (Tabla 4).

En el segundo análisis incluyó a las poblaciones con desarrollo indirecto. El primer grupo estuvo conformado por las poblaciones de Metri y Chiquihue y el segundo grupo lo conformó la población de Aucho. El porcentaje de variación entre grupos fue de un 1,38%, entre las poblaciones dentro de los grupos fue de un -1,34% y dentro de las poblaciones fue de un 99,96%. El valor de Φ_{st} fue de 0,00036 con un valor de P de $0,499 \pm 0,008$. El grado de diferenciación entre estas poblaciones no fue significativo (Tabla 5).

Tabla 4. Distribución de la variación genética solo entre las poblaciones con desarrollo directo.

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	76,112	5,076	78,86
Entre poblaciones dentro de grupos	1	3,372	0,378	5,88
Dentro de poblaciones	27	26,539	0,982	15,27
Total	29	106,023	6,437	$\Phi_{st} = 0,847$ $0,000 \pm 0,000$

Tabla 5. Distribución de la variación genética entre las poblaciones con desarrollo indirecto.

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	0,866	0,011	1,38
Entre poblaciones dentro de grupos	1	0,649	-0,018	-1,34
Dentro de poblaciones	41	33,066	0,806	99,96
Total	43	34,581	0,806	$\Phi_{st} = 0,00036$ $0,499 \pm 0,008$

Las diferencias de los valores de Φ_{st} por pares de poblaciones, basada en distancias entre haplotipos (Kimura 2P), derivó en los valores de la Tabla 6. De este análisis se concluyó que existen diferencias significativas de los valores de Φ_{st} entre las poblaciones con desarrollo directo e indirecto.

Se estimó el estimo el flujo génico (Nm) entre las distintas poblaciones (Tabla 7). No se observó flujo génico entre las poblaciones de las distintas especies. Los valores Nm entre las poblaciones con desarrollo indirecto fluctuaron desde 15,762 hasta infinito. Para las poblaciones con desarrollo directo el valor de Nm fluctuó entre 0,068 y 2,53

Tabla 6. Distancia genética derivada de los valores de Φ_{st} para la comparación entre pares de poblaciones de *C. fecunda* (Metri, Chiquihue, Aucho) y *C. dilatata* (Quempillén, Coquimbo y P. Arenas).

	Desarrollo directo			Desarrollo indirecto		
	Quempillén	Coquimbo	P. Arenas	Metri	Chiquihue	Aucho
Quempillén	-					
Coquimbo	0,166 0.109 ± 0.008	-				
P. Arenas	0,879 0,000 ± 0,000	0,876 0,000 ± 0,000	-			
Metri	0,786 0,000 ± 0,001	0,759 0,000 ± 0,000	0,847 0,000 ± 0,000	-		
Chiquihue	0,798 0,000 ± 0,002	0,781 0,000 ± 0,000	0,871 0,000 ± 0,000	-0,014 0.645 ± 0.013	-	
Aucho	0,788 0,000 ± 0,003	0,769 0,000 ± 0,000	0,867 0,000 ± 0,000	0,03 0.131 ± 0.012	-0,032 0.960 ± 0.006	-

Tabla 7. Tasa de migración derivada de los valores de Φ_{st} entre las poblaciones de *C. fecunda*, *C. dilatata* y las poblaciones de Punta Arenas.

	Desarrollo directo			Desarrollo indirecto		
	Quempillén	Coquimbo	P. Arenas	Metri	Chiquihue	Aucho
Quempillén	-					
Coquimbo	2,503	-				
P. Arenas	0,068	0,07	-			
Metri	0,135	0,158	0,09	-		
Chiquihue	0,126	0,139	0,073	∞	-	
Aucho	0,133	0,149	0,076	15,762	∞	-

5. DISCUSIÓN

Los individuos pertenecientes a las distintas localidades geográficas (sección 3.1), en su gran mayoría pudieron ser identificados de forma clara a través de la observación de la ovcápsulas. Los individuos de las localidades de Metri, Chiquihue y Aucho, mostraron los patrones de desarrollo descritos por Gallardo (1977) para la especie *C. fecunda*. De la misma manera los individuos de las localidades de Coquimbo y Quempillén pudieron ser clasificados como *C. dilatata*. En un análisis preliminar los individuos provenientes de la población de Punta Arenas fueron clasificadas como *C. dilatata*, por el rango de distribución geográfico. En el análisis de las ovcápsulas se observó que los individuos de esta población presentaban un desarrollo intermedio (Comunicación personal Dr. Carlos Gallardo), similar al descrito por Veliz (2003) para una población de Coquimbo. En este modo de desarrollo todos los ovocitos de la cápsula son fecundados, pero solo el 6% de ellos termina el desarrollo, eclosionando de la cápsula juveniles (Veliz, 2003). Bajo este argumento la población de Punta Arenas se consideró como perteneciente al grupo de las poblaciones con desarrollo directo.

Diversidad Genética

Los índices de diversidad molecular (Tabla 2) muestran que las poblaciones con desarrollo directo poseen una diversidad genética menor que aquellas poblaciones con desarrollo indirecto. Estos valores se correlacionan con las frecuencias haplotípicas presentadas en la Tabla 1. Cabe destacar que las poblaciones con desarrollo directo poseen una diversidad genética muy baja y esto se puede observar por la presencia de un solo haplotipo compartido (Tabla 1). En la población de Coquimbo el número de

haplotipos es mayor si se toma en cuenta el número total de individuos que es solo cuatro (Tabla 3). Si se pudiera obtener una mayor cantidad de individuos se esperaría que aparezcan más haplotipos dentro de esta población. La diferencia es evidente si se compara las poblaciones con desarrollo directo versus las poblaciones con desarrollo indirecto, las cuales comparten un número considerable de haplotipos entre las poblaciones y en algunos casos con altas frecuencias (Tabla 2). Estos resultados son comparables con el trabajo realizado por Kyle & Boulding (2000), en donde compara especies de gastrópodos del género *Littorina* con distintos modos de desarrollo y encuentra un número elevado de haplotipos por población en aquellas con desarrollo indirecto y una baja cantidad de haplotipos en poblaciones con desarrollo directo.

Las frecuencias haplotípicas concuerdan con los índices de diversidad Haplotípica (H) (Tabla 2). Este índice es bajo en la población de Quempillén (desarrollo directo) si lo comparamos con las poblaciones de desarrollo indirecto. El valor de H en la población de Coquimbo es elevado, casi igual que las poblaciones con desarrollo directo, esto se debe a la alta cantidad de haplotipos y una baja cantidad de individuos, estas dos variables son fundamentales para el cálculo de este índice. Se esperaría que este valor alcanzara valores similares que a los de la población de Quempillén y Punta Arenas, si se aumentara en número de individuos en el análisis. El valor más bajo de este índice es el que presenta la población de Punta Arenas, debido a que presenta un número de haplotipos menor con respecto a las otras poblaciones. Los valores obtenidos para este índice son comparables con los valores de heterocigosidad promedio obtenidos por Schmidt (2005), las diferencias entre estos valores, entre las

poblaciones con desarrollo directo e indirecto, son considerablemente menores que los obtenidos en este estudio.

Los valores de diversidad nucleotídica π_n se comportan de forma similar que los valores de H , el valor de π_n es menor en las poblaciones con desarrollo directo que en las poblaciones con desarrollo indirecto, valores que nos dan más fundamentos para inferir que el modo de desarrollo tendría participación en el modelamiento de la diversidad genética de una población.

Al comparar el número de sitios polimórficos entre las poblaciones se observa que las mutaciones son puntuales, no se observan inserciones ni deleciones en las secuencias (Anexo 1). Las transiciones fueron más frecuentes que las transversiones. En la población de Punta Arenas su diversidad genética es tan baja que solo se observó una transversión (Anexo 1).

Estructura Genética de las poblaciones.

Desarrollo directo

Las poblaciones con desarrollo directo presentaron una estructura poblacional mayor que las poblaciones con desarrollo indirecto (Tabla 4 y 5). Los resultados de este trabajo son similares a los entregados en estudios realizados con isoenzimas (Hoagland, 1984), con secuencias de mtDNA en especies del género *Crepidula* (Collin, 2001) y con RADPs en *C. fecunda* y *C. dilatata* (Schmidt, 2005). En el trabajo de Collin (2001) los valores de porcentaje de variación entre las poblaciones con desarrollo directo varían entre un 54,3 y un 87,2% y dentro de las poblaciones 12,8 a un 45,7%.

Schmidt (2005), para las poblaciones de *C.dilatata*, obtiene un porcentaje de variación interpoblacional de 75.5% e intrapoblacional de 24.5%.

En este estudio los porcentajes de diferenciación obtenidos fueron de 78,86% entre las poblaciones y de 15,27% dentro de las poblaciones con valores de Φ_{st} significativos (Tabla 4). Este grado de diferenciación se ve reflejado en las distancias genéticas (Tabla 6). La distancia entre las poblaciones de Qm/Cq fue de 0,16, similar a la obtenida por Schmidt (2005) para esta misma especie y mayor que las obtenidas por Hoagland (1984) y por Kyle & Boulding (2000) para especies con desarrollo directo del género *Crepidula* y *Littorina* respectivamente. Cabe destacar que los valores de distancia genética más elevados fueron entre las poblaciones de Quempillén/P. Arenas y Coquimbo/P.arenas que fue de 0,87, la gran distancia que existe entre las poblaciones de *C. dilatata* (Quempillén y Coquimbo) y la población de Punta Arenas concuerda también con las diferencias en el modo de desarrollo que éstas presentan.

Dentro de los factores que explican en gran medida la diferenciación entre estas poblaciones, está el flujo génico, lo que conlleva, a divergencia por deriva génica debido a selección local (Slatkin, 1995). Los valores de flujo génico para estas poblaciones fueron bajos, especialmente entre la población de Quempillén/P. Arenas y Coquimbo/P. Arenas (Tabla 7). El aislamiento geográfico presentado por la población de Punta Arenas puede explicar el bajo nivel de flujo génico, ya que las poblaciones que viven en estuarios y canales tienen una menor probabilidad de recibir migrantes que las poblaciones que viven en costas abiertas (Hoskin, 1997). Además el nivel de flujo génico se ve afectado por la capacidad de dispersión a grandes distancias (Hellberg et

al., 2002). En poblaciones con este modo de desarrollo la dispersión puede estar favorecida por el arrastre de juveniles recién eclosionados por las corrientes marinas (drifting) (Martel & Chia, 1991), o bien, por el uso de estructuras flotantes como medio de dispersión (rafting) (Picken, 1980; Highsmith, 1985; Johannesson, 1988; Martel & Chia, 1991; Worcester, 1994).

De hecho, aunque los análisis de secuencias de mtDNA demuestran que los niveles de estructura poblacional y diferenciación poblacional están fuertemente correlacionados con el modo de desarrollo, estos patrones no han podido ser demostrados para muchos gastrópodos marinos. Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Kyle & Boulding (2000) en especies del género *Littorina* que presentan modo de desarrollo directo, en estas no se observó una estructura poblacional notoria. Estos autores atribuyen este fenómeno a que los huevos por no estar encapsulados son arrastrados por las corrientes marinas, logrando así una mayor capacidad de dispersión.

Otro argumento que podría explicar las diferencias en los niveles de estructura poblacional de las poblaciones con modo de desarrollo directo, es la diferencia en los tiempos de generación; en efecto, el tiempo de generación de una especie se puede ver afectado por las condiciones ecológicas en las que se encuentra el individuo (Rolán – Alvarez *et al.*, 1995). Por ejemplo, en el caso de las poblaciones de *C. dilatata* y la población de Punta Arenas, las condiciones ecológicas son distintas en el canal de Chacao como en la costa del Pacífico, así como también, en el Estrecho de Magallanes por lo que los tiempos de generación podrían ser completamente distintos dentro de esta misma especie.

Desarrollo Indirecto

La regla general nos indica que las especies que presentan desarrollo larval, poseen un bajo nivel de estructura y diferenciación poblacional debido a que poseen una mejor capacidad de dispersión (Burton, 1983; Hedgecock, 1986; Ayre, 1990; Palumbi, 1994,1995; Hilbish, 1996; Cunningham & Collin, 1998; Ruckelshaus, 1998, Collin, 2001).

Las poblaciones de *Crepidatella* con desarrollo indirecto muestran una baja estructura y diferenciación poblacional, lo que concuerda con la regla general para especies con desarrollo larval libre. Esto se ve reflejado en los valores de porcentaje de variación, el que entre las poblaciones es de -1,34% y dentro de la población 99,96% y un valor de Φ_{st} no significativo, lo que se ve reflejado en la baja distancia genética entre las poblaciones (Tabla 5). Estos resultados concuerdan con los reportados por Hoskin (1997) para *Morula marginalva*, Kyle & Boulding (2000) para *Littorina scutulata* y Collin (2001) para las especies *Crepidula fornicata* y *C. depressa*. Sin embargo nuestros valores no concuerdan con los valores entregados por Schmidt (2005) para poblaciones de *C. fecunda*. Las diferencias en los valores pueden estar determinadas por la sensibilidad del marcador utilizado por este autor. El análisis de polimorfismos de fragmentos amplificados al azar (RADPs), es una técnica muy conveniente pero imprecisa si la comparamos con las secuencias de DNA, ya que los fragmentos amplificados poseen una herencia dominante y no son detectados los alelos codominantes (Sunnucks, 2000).

Los bajos valores de estructura y diferenciación poblacional pueden ser explicados por los elevados valores de flujo génico entre las poblaciones (15,762 Metri/Aucho; ∞ Metri/Chinquihue y Chinquihue/Aucho). Estos valores de flujo génico podría ser explicado por la presencia de la larva pelágica con una duración en la columna de agua de aproximadamente 15 días (Soto, 2001; Chaparro *et al*, 2005) y por la presencia de corrientes superficiales (Silva, 1998). De esto se desprende que estas poblaciones se estarían comportando como una sola, dada la cercanía geográfica que estas presentan. Cunningham *et al* (1998) argumenta que el papel que juegan las larvas, en general en el nivel de dispersión, solo sería efectivo a cortas distancias debido al tiempo que dura ésta, sin embargo, el desplazamiento de los juveniles o adultos a través de *rafting* sería el mecanismo más importante en la dispersión.

A pesar de que los resultados obtenidos en este trabajo, siguen la regla general, existen ejemplos en que la regla no se cumple (Reeb & Avise, 1990; Avise, 1992; Briggs, 1995; Hellberg, 1996, Kyle & Boulding, 2000). Los resultados de estos estudios son explicados por factores bióticos, como el tiempo de estadio larval, y por factores abióticos, como las corrientes marinas, la temperatura y salinidad. Estos factores no serían relevantes en caso de *C. fecunda* dado que los niveles de flujo génico son altos, de tal manera que puede inferirse con cierto grado de certeza que el modo de desarrollo está modelando la estructura y diversidad genética de sus poblaciones.

Si bien los resultados obtenidos en el presente trabajo, concuerdan con las reglas generales de los modos de desarrollo *versus* estructura y diversidad poblacional, en el caso de las poblaciones con desarrollo indirecto, no se puede extraer una

conclusión general de la completa distribución de la especie, debido a que las poblaciones estudiadas, representan una fracción reducida de la distribución de la especie (Seno de Reloncaví y el noreste de la Isla de Chiloé). Lo contrario ocurre en el caso de las poblaciones con desarrollo directo, en donde las poblaciones estudiadas, se encuentran aisladas geográficamente por más de 1.000 km de distancia. En este caso, no se pudo evaluar si el modo de desarrollo presente en las poblaciones tendría una directa influencia en la estructura y diversidad genética de las poblaciones que se encuentran separadas por una menor distancia.

5.1 CONCLUSIONES

- Las secuencias de citocromo oxidasa I poseen una variabilidad adecuada, para estimar niveles de diversidad y estructura poblacional en *C. dilatata* y *C. fecunda*
- Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten establecer una correlación entre la estructura y diversidad genética con los patrones de desarrollo de *C. dilatata* y *C. fecunda*.
- Para relacionar con mayor certeza el modo de desarrollo con el nivel de estructura poblacional, es necesario obtener una mayor cantidad de poblaciones para así poder tener un panorama completo de la genética poblacional de estas especies.
- Los valores de flujo génico y distancias genéticas, entre la población de Punta Arenas y las demás poblaciones, hacen necesario realizar estudios posteriores tendientes a establecer el *status* taxonómico de esta población.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Avise, J.C. (1992) Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos*, 63: 62 - 76.
- Avise, J.C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, 551pp.
- Avise, J.C. (2000) *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, 447pp.
- Ayre, D.J. (1990) Population subdivisions in Australian temperate marine invertebrates: Larval connection versus historical factors. *Australian Journal of Ecology*, 15: 403 - 411.
- Bahonak, A. J. (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *Quaternary Review of Biology*, 74: 21 - 45.
- Benzie, J. A. (1999) Genetic structure of coral reef organism: Ghosts of dispersal past. *American Zoologists*, 39: 131 - 145.
- Billingham, M. & Ayre, D.J. (1996) Genetic subdivision in the subtidal, clonal sea anemone *Anthothoe albocincta*. *Marine Biology*, 125: 153 - 163.
- Birky, C.W., Maruyama, T. & Fuerst, P. (1983) An approach to population genetic and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*, 103: 513 - 527.
- Bossart, J. L. & Prowell, D. P. (1998) Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 202 - 206.

- Boury-Esnault, N., Efremova, S., Bézac C., & Vacelet, J. (1999) Reproduction of a hexactinellid sponge: First description of gastrulation by cellular delamination in the Porifera. *Invertebrate Reproduction and Development*, 35: 187 - 201.
- Briggs, J.C. (1995) *Global Biogeography*. Elsevier Science, Amsterdam. 452 pp.
- Brown, W.M., George, M. Jr. & Wilson, A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA in fish genetics and fishery management. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 1967 - 1971.
- Burton, R.S. (1983) Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate population. *Marine Biology Letters*, 4: 193 - 206
- Carballo, J.L., Naranjo, S.A., Hernández-Zanuy, A. & Kukurtzü, B. (1997) Estudio de la población de *Ecteinascidia turbinata* Herdman 1880 (Ascidiacea: Perophoridae) en la Isla de Formentera (Mar Mediterráneo. España): Distribución, densidad y crecimiento. *Ciencias del Mar UAS*, 15: 7 - 15.
- Chaparro, O. R., Saldivia, C.L., Pereda, S.V., Segura, C. J., Montiel Y. A. & Collin, R. (2005) The reproductive cycle and development of *Crepidatella fecunda* (Gastropoda: Calyptraeidae) from southern Chile. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85: 157-161.
- Collin, R. (2001) The effects of mode of development on phylogeography and population structure of North Atlantic *Crepidula* (Gastropoda: Calyptraeidae). *Molecular Ecology*, 10: 2249 - 2262.

- Collin, R. (2003) Phylogenetic relationships among Calyptraeid gastropods and their implication for the biogeography of marine speciation. *Systematic Biology*, 52: 618 - 640.
- Cunningham, C. W. & Collins, T. M. (1998) Beyond area relationships: Extinction and Recolonization in Molecular Marine Biogeography. In *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*, R. De Salle and B. Schierwater, (eds). Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 297 - 321.
- De Wolf, H., Backeljau, T. & Verhagen, R. (1998) Congruence between allozyme and RAPD data in assessing macrogeographical genetic variation in the periwinkle *Littorina striata* (Mollusca, Gastropoda). *Heredity*, 81: 486 - 492.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2): 479 - 491.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294 - 299.
- Fontdevila, A. & Moya, A. (1999) *Introducción a la Genética de Poblaciones*. Ed. Síntesis S.A. Madrid, 349pp.

- Gallardo, C. S. (1976) Historia natural y reproducción de *Crepidula dilatata* (Gastropoda, Calyotraeidae) en una población de la Bahía Mehuín (Prov. Valdivia, Chile). Medio Ambiente , 2(1); 44 - 50.
- Gallardo, C. S. (1977) *Crepidula philippiana* n. sp. nuevo gastrópodo Calyptraeidae de Chile con especial referencia al patrón de desarrollo. Studies on Neotropical Fauna and Environment, 12: 177 - 18.
- Gallardo, C. 1979. Especies gemelas del genero *Crepidula* (Gastropoda, Calyptraeidae) en la costa de Chile; una redescipción de *C. dilatata* Lamarck y descripción de *C. fecunda* n. sp. Studies on the Neotropical Fauna and Environment, 14:215-226.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95 - 98.
- Hedgecock, D. (1986) Is gene flow pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrate. Bulletin of Marine Science, 39: 550 - 554.
- Hellberg, M. E. (1996) Dependence of gene flow on geographic distance in two solitary corals with different larval dispersal capabilities. Evolution, 28: 1167-1175.
- Hellberg, M. E. & Taylor, M. S. (2002) Genetic analysis of sexual reproduction in the dendrophylliid coral *Balanophyllia elegans*. Marine Biology, 141: 629 - 637.
- Highsmith, R. C. (1985). Floating and algal rafting as potential dispersal mechanism in brooding invertebrates. Marine Ecology Progress Series, 25: 169 – 179

- Hilbish, T.J. (1985) Population genetics of marine species. The interaction of natural selection and historically differentiated population. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200: 67 - 83.
- Hoagland, E.K. (1984) Use of molecular genetics to distinguish species of the gastropods genus *Crepidula* (Prosobranchia: Calyptraidae). *Malacology*, 25: 607 - 628.
- Hoskin, M. G. (1997) Effect of contrasting patterns of larval dispersal on the genetic structure of three species of prosobranch gastropods. *Marine Biology*, 127: 647 - 656.
- 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*? *Marine Biology*, 99: 507 - 513.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular of Evolution*, 16: 111 - 120.
- King J.M., Tharme, R.E. & Brown, C.A. (1999) Definition and implementation of instream flows. Thematic Report for the World Commission on Dams. Southern Waters Ecological Research and Consulting, Cape Town, South Africa. 63 pp.
- Knowlton, N. (1993) Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 189 - 216.
- Kyle, C. & E.G. Boulding. (2000) Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal. *Marine Biology*, 137: 835 - 845.

- Martel, A. & Chia, F-S. (1991) Drifting and dispersal of small bivalves and gastropods with direct development. *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 150: 131 - 147.
- Meyer, C. P. (2003) Molecular systematics of cowies (Gastropoda: Cypraeidae) and diversification patterns in the tropics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 401 - 459.
- Nei, M. & Li. W. H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 5269 - 5273.
- Nei, M. & Tajima F, (1981) DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*, 97:145 - 163
- Nei, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. USA.
- Oines, O. & Heuch, P. A. (2005) Identification of sea louse species of genus *Caligus* using mtDNA. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85: 73 - 79.
- Ovenden, J. (1990) Mitochondrial DNA and marine stock assesment: a review. *Australian Journal of Marine Freshwater Research*, 41: 835 - 853.
- Palumbi, S. R. (1994) Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review Ecology and Systematics*, 25: 547 - 572.
- Palumbi, S. R. (1995) Using genetics as an indirect estimator of larval dispersal. In *Ecology of Marine Invertebrate Larvae*, L. McEdward (ed), pp. 369-387. CRC Press, New York.

Picken, G. B. (1980). Reproductive adaptations of Antarctic benthic invertebrates.

Biological Journal of the Linnean Society, 14: 67 - 75.

Pfenninger, M. & Posada, D. (2002) Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Poiret 1801) (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration and secondary contact. *Evolution*, 56: 1776 -1788.

Poulin, E., Boletzky, S.V & Féral, J.P (2001) Combined ecological factors permit classification of developmental patterns in benthic marine invertebrates: a discussion note. *Journal of Experimental Biology and Ecology*, 257: 109 - 115.

Reeb, C.A. & Avise, J.C. (1990) A genetic discontinuity in a continuously distributed species: Mitochondrial DNA in the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics*, 124: 397 - 406.

Reynolds, J., Weir, B.S., & Cockerham, C.C. (1983) Estimation for the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105: 767 - 779.

Rodriguez, S. (2004) Marcadores moleculares de ADN y su aplicación en el análisis de la estructura genética de las poblaciones de Choro Zapato (*Choromitylus chorus*) (Molina, 1792) (Bivalvia: Mytilidae). Tesis. Universidad Austral de Chile. 80pp.

Rolán-Alvarez, E., Zapata, C. & Álvarez, G. (1995) Distinct genetic subdivision in sympatric and sibling species of the genus *Littorina* (Gastropoda: Littorinidae). *Heredity*, 74: 1 - 9.

Ruckelshaus, M. (1998) Spatial scale of genetic structure and an indirect estimate of gene flow in eelgrass, *Zostera narina*. *Evolution*, 52: 330 - 343

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbour Laboratory, NY.
- Schimdt, A. (2005) Patrones reproductivos y su influencia en la estructura genético poblacional en dos especies simpátricas del género *Crepidula* (Gastropoda: Caliptraeidae) en la costa interior de la isla de Chiloé. Tesis de Biología Marina, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. 47 pp.
- Schneider, S., Kueffer, J-M., Roessli, D. & Excoffier, L. (2006). Arlequin: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Suiza. <http://anthropologie.unige.ch/arlequin>.
- 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). *Ciencia y Tecnología Marina*, 21: 17 - 48.
- Slatkin, M. (1991) Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetic Research of Cambridge*, 58: 167 - 175.
- Slatkin, M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Soto, A. (2001) Características velares y capacidad de alimentación en larvas encapsuladas de *Crepidula dilatata* y *Crepidula fecunda*. Tesis de Biología Marina, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. 48 pp.
- Sunnucks, P. (2000) Efficient genetic marker for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 199-203.

- Tarjuelo, I., Crandall, K. A., Pascual, M. & Turon, X. (2001) Cryptic species of *Clavelina* (Ascidiacea) in two different habitats: harbours and rocky littoral zones in the northwestern Mediterranean. *Marine Biology*, 139: 455 - 462.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876 - 4882.
- Thorson, G. (1950) Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biological Reviews*, 25: 1 - 45.
- Todd, C.D., Lambert, W.J. & Thorpe, J.P. (1998) The genetic structure of intertidal populations of two species of nudibranch molluscs with planktrophic and pelagic lecithotrophic larval stages: Are pelagic larvae for dispersal? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 228:1 - 28.
- Toyohara, T., Nakaoka, M. & Aioi, K. (1999). Population dynamics and reproductive traits of phytal gastropods in seagrass bed in Otsuchi Bay, northeastern Japan. *P.S.Z.N. Marine Ecology*, 20: 273 - 289.
- Vieites, D., Chiari, Y., Vences, M., Andreone, F., Rabemananjara, F., Bora, P., Nieto - Román, S., & Meyer, A. (2006) Mitochondrial evidence for distinct phylogeographic units in the endangered Malagasy poison frog *Mantella bernhardi*. *Molecular Ecology*, 15, 1617 - 1625.
- Véliz, D., Winkler, F., Guisado, C. (2003) Developmental and genetic evidence for the existence of three morphologically cryptic species of *Crepidula* in northern Chile. *Marine Biology*, 143: 131 - 142.

- Wilson, A.C., Cann, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D., & Stoneking, M. (1985). Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 26: 375 - 400.
- Wright, S. (1978) *Variability within and among Natural Populations*. Vol. 4. The University of Chicago Press, Chicago.
- Worcester, S. E. 1994. Adult rafting versus larval swimming: dispersal and recruitment of a botryllid ascidian on eelgrass. *Marine Biology*, 121: 309 - 317.

ANEXO

ANEXO I. Diferencias nucleotídicas de las secuencias de citocromo oxidasa I entre los haplotipos de las poblaciones de *C. dilatata* y *C. fecunda*.

Haplotipo	1	2	11	16	17	18	19	26	32	38	44	51	56	59	74	107	110	113	125	131	134	
1	T	A	T	T	A	G	G	C	C	T	C	C	T	C	A	A	G	A	G	A	T	
2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
6	*	*	*	*	C	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	C	*	*	*	*	G	*	G	*	*
8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	C	*	*	*	*	G	*	G	*	*
9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	G	*	*
10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
11	*	*	*	C	*	T	T	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
13	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
14	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	G	*	*
16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	G	*	*
17	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
18	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
20	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	G	*	*
21	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
23	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	G	*	*
25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	G	*	*
26	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
27	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
28	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*
29	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*

ANEXO I. Diferencias nucleotídicas de las secuencias de citocromo oxidasa I entre los haplotipos de las poblaciones de *C. dilatata* y *C. fecunda*

Haplotipo	470	483	485	488	498	503	509	521	522	524	536	542	545	548	554	563	572	573	587	594	610	
1	A	A	G	C	T	C	T	T	T	A	T	T	G	C	T	A	A	G	T	C	G	
2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
5	*	*	*	*	*	*	C	C	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*
7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	T
8	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
10	*	C	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
11	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
13	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
14	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
17	*	C	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
18	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
20	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
21	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
23	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
24	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
25	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
26	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
27	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
28	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*
29	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	*