



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Ciencias

PROFESOR PATROCINANTE
DR. JORGE TORO YAGUI
INSTITUTO BIOLOGÍA MARINA
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

PROFESOR CO-PATROCINANTE
DR. ROBERT STEAD FAILLE
Y CENTRO DE INVESTIGACIÓN I-MAR
UNIVERSIDAD DE LOS LAGOS

**“BASES GÉNETICAS Y FISIOLÓGICAS QUE AFECTAN LA TASA DE
CRECIMIENTO DE *MYTILUS CHILENSIS*”**

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

BLANCA MARCELA VERA MALDONADO
VALDIVIA-CHILE
2007

*" A ti, oh Dios de mis padres, te doy gracias y te alabo,
porque me has dado sabiduría y fuerza."*

Daniel 2:23

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Antes que a nadie le agradezco a Dios que ha estado siempre conmigo.

A mi profesor patrocinante Dr. Jorge Toro Yagui por su ayuda brindada, constante apoyo y sobre todo su paciencia y comprensión, gracias profe.

Al Dr. Robert Stead F. quien me ayudó durante mi estadía en Puerto Montt con los análisis fisiológicos y por sus comentarios en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Roberto Jaramillo S. por su apoyo brindado y aceptar hacer la revisión de esta tesis.

A las personas de I-mar que me apoyaron en todo momento gracias por su acogida y ayuda desinteresada, en forma especial a Marcos, Florencia y Alfonso.

A Grace que me dio dedicación y apoyo durante el periodo que estuve en el laboratorio, gracias por compartir tus conocimientos.

Al profesor Oscar Chaparro y a Gina que tuvieron la disposición de enseñarme lo esencial de la fisiología de invertebrados gracias por su ayuda.

A mi familia (padres, hermano, abuelos y tíos) que a lo largo de la carrera siempre me apoyaron, me brindaron todo lo que estuvo a su alcance de una u otra manera todos estuvieron conmigo ya sea en la cercanía de mi hogar o a la distancia siempre estuvieron ahí.

A mi amiga Loreto y su familia. A Gladys y Marcela. En fin, tantos amigos y conocidos que estuvieron allí para darme un consejo.

Esta tesis fue financiada gracias al proyecto FONDECYT 1050341.

INDICE DE CONTENIDOS

		Páginas
	AGRADECIMIENTOS.....	iv
	INDICE DE TABLAS.....	vii
	INDICE DE FIGURAS.....	ix
	ABREVIATURAS.....	xi
1.	RESUMEN.....	1
1.1	ABSTRACT.....	2
2.	INTRODUCCIÓN.....	3
2.1	Generalidades de la especie en estudio.....	8
2.2	Hipótesis.....	10
2.3	Objetivos.....	10
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1	Área de estudio.....	11
3.2	Muestreo y marcaje individual de los ejemplares	11
3.3	Aclimatación de animales.....	14
3.4	Diseño experimental para las determinaciones fisiológicas.....	15
	3.4.1 Determinación tasa de consumo de oxígeno.....	15
	3.4.2 Determinación de la tasa de excreción.....	17
	3.4.3 Estandarización y transformación de tasas fisiológicas.....	19
3.5	Análisis genético.....	20
	3.5.1 Tratamiento de las muestras.....	21

3.5.2	Análisis electroforético	22
3.5.3	Sistemas enzimáticos.....	23
3.5.4	Análisis datos obtenidos.....	23
4.	RESULTADOS.....	26
4.1	Variables fisiológicas.....	26
4.1.1	Consumo de oxígeno.....	26
4.1.1	Tasa de excreción.....	27
4.2	Análisis genéticos.....	31
4.2.1	Heterocigosidad multi-locus.....	34
5.	DISCUSIÓN.....	40
5.1	Conclusiones.....	46
6.	LITERATURA CITADA	48

ÍNDICE DE TABLAS

	Páginas
<p>TABLA 1. <i>Mytilus chilensis</i>. Regresiones entre las tasas fisiológicas y el peso Seco (g). La ecuación de regresión se expresa como $Y = bX+a$. Donde Y representa la tasa respectiva, X al peso seco, b al coeficiente de regresión y a la constante. Se da el valor del coeficiente de determinación (r^2) y su probabilidad estadística (P), * $P < 0.05$; NS no significativo. N=91</p>	27
<p>TABLA 2. <i>Mytilus chilensis</i>. Descripción de las enzimas analizadas. El buffer utilizado, el número de locis visualizados y el carácter polimórfico de cada enzima (Buffers: TBE, Tris-Edta-ác. Bórico; TME, Tris-Edta-ác. Maleico).....</p>	31
<p>TABLA 3. <i>Mytilus chilensis</i>. Descripción de 3 locis polimórficos analizados con buffer TME. Se dan las frecuencias alélicas $f(a)$, $N(obs)$ y $N(esp)$ corresponden al número de individuos observados y esperados bajo el equilibrio de H-W. Se da el valor de X^2, su probabilidad estadística (P) *** muy significativo $P > 0.0001$..</p>	32
<p>TABLA 4. <i>Mytilus chilensis</i>. Descripción de 3 locis polimórficos analizados con buffer TBE. Se dan las frecuencias alélicas $f(a)$, $N(obs)$ y $N(esp)$ corresponden al número de individuos observados y esperados bajo el equilibrio de H-W. Se da el valor de X^2, su probabilidad estadística (P) *** muy significativo $P > 0.0001$.</p>	33
<p>Tabla 5. <i>Mytilus chilensis</i>. Distribución de la heterocigosidad de los 5 loci enzimáticos. H_o y H_e corresponden a la heterocigosidad observada y esperada respectivamente; D Índice relativo de desviación heterocigotos del valor esperado...</p>	34

TABLA 6. *Mytilus chilensis*. Regresiones de las diferentes variables fisiológicas estandarizadas y la heterocigosidad multilocus medida por individuo. La ecuación de regresión se expresa como $Y = a + bx$, donde **Y** es la variable fisiológica y **X** el número de loci para los cuales el individuo es heterocigoto (HML), **b** el coeficiente de regresión y **a** la constante. Se da el valor de r^2 para la relación y la significancia estadística P, NS no significativo. Además se describe la relación entre el peso seco (g) y la HML. N=91..... 35

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Mytilus chilensis</i>. Área de estudio. a) Mapa de Chiloé, b) Balsas de cultivo de <i>Mytilus chilensis</i> en la Bahía de Yaldad.....	12
Figura 2. <i>Mytilus chilensis</i>. a) Fotografía que muestra el proceso de adhesión de la marca a la valva. b) Fotografía que muestra en detalle las marcas puestas en los individuos.....	13
Figura 3. <i>Mytilus chilensis</i>. Fotografía de acuario de 30 litros con los ejemplares N=100. b) Cultivo de <i>Isochysis galbana</i>	14
Figura 4. <i>Mytilus chilensis</i>. a) Fotografía que muestra cámaras cerradas herméticamente en el baño de mantenimiento. b) Fotografía mostrando medición de la tensión de oxígeno en la cámara.....	17
Figura 5. <i>Mytilus chilensis</i>. a) Fotografía mostrando test colorimétrico de Solórzano b) Fotografía mostrando en detalle Curva de Calibración.....	18
Figura 6. <i>Mytilus chilensis</i>. Fotografía mostrando individuos que fueron utilizados para la curva de peso seco carne / longitud valvar.....	20
Figura 7. <i>Mytilus chilensis</i>. a) Sembrado de las muestras en el gel de almidón 12%.b) Corrida electroforética (4°C) una vez finalizada.....	23
Figura 8. a) Enzima Isocitrato (ICD), monomórfica. b) Enzima (PGM), polimórfica	24
Figura 9. <i>Mytilus chilensis</i>. Relaciones entre las variables fisiológicas 15°C-20 psu y el tamaño corporal expresado en peso seco (g), a) Tasa de Excreción ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$), b) Consumo de Oxígeno ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$) N = 91.....	28
Figura 10. <i>Mytilus chilensis</i>. Relaciones entre las variables fisiológicas 15°C-	

25 psu y el tamaño corporal expresado en peso seco carne (g). a) Tasa de excreción ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$), b) Consumo de Oxígeno ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$) N=91.....	29
Figura 11. <i>Mytilus chilensis</i>. Relaciones entre las variables fisiológicas 20°C-30 psu y el tamaño corporal expresado en peso seco carne (g). a) Tasa de excreción ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$), b) Consumo de Oxígeno ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$) N=91.....	30
Figura 12. <i>Mytilus chilensis</i>. Regresión entre el Peso Seco (g) y la heterocigosidad multi-locus (HML). Las líneas verticales corresponden al error estándar.....	36
Figura 13. <i>Mytilus chilensis</i>. Regresión entre las variables fisiológicas (20 psu-15°C) y la heterocigosidad multi-locus (HML). a) Tasa de Excreción ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$), b) Consumo de Oxígeno ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$). Las líneas verticales corresponden al error estándar.....	37
Figura 14. <i>Mytilus chilensis</i>. Relaciones entre las variables fisiológicas (25 psu-15°C) y la Heterocigosidad Multi-locus (HML). a) Tasa de Excreción ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$), b) Consumo de Oxígeno ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$). Las líneas verticales corresponden al error estándar.....	38
Figura 15. <i>Mytilus chilensis</i>. Relaciones entre las variables fisiológicas (30 psu-20°C) y la Heterocigosidad Multi-locus (HML). a) Tasa de Excreción ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$), b) Consumo de Oxígeno ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$). Las líneas verticales corresponden al error estándar.....	39

ABREVIATURAS

cél: células

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

et al.: y colaboradores

g: gramos

HML: heterocigosidad multi-locus

h: horas

hPa: hectopascales

l: litros

m: metros

µm: micrometros

µl: microlitros

µg: microgramos

mg: miligramos

ml: mililitros

mm: milímetros

mA: miliampere

nm: nanometros

psu: Unidades Prácticas de Salinidad

rpm: revoluciones por minuto

TRIS: trishydroxymethylaminomethane

V: volt

1. RESUMEN

Se investigó el efecto del grado de heterocigosidad multi locus (HML) en la respuesta fisiológica frente a cambios ambientales que generan ciertos grados de estrés en una cohorte de ejemplares adultos del bivalvo filtrador *Mytilus chilensis* (Hupé 1854). En cada ejemplar experimental se estimaron las variables fisiológicas; tasa de excreción y consumo de oxígeno y posteriormente se les determinó el grado de HML por medio de análisis de electroforesis de isoenzimas.

Las relaciones entre variables fisiológicas y tamaño corporal fueron positivas en su mayoría, sin embargo no significativas ($P > 0.05$), con la excepción de la tasa de consumo de oxígeno a 30 psu y 20 °C, donde se observó una pendiente positiva con valores de significancia $P = 0.018$. El análisis basado en 5 loci polimórficos reveló un promedio de alelos por locus de 4.2 y una heterocigosidad promedio observada de $H_o = 39\%$ (32.9-42.8%), lo cual se considera un valor alto, ya que las poblaciones de invertebrados en general muestran un déficit de heterocigotos.

En este estudio la deficiencia de heterocigotos fue de un valor $D = -0.436$ (-0.353 a -0.536). Las regresiones entre la HML y las tasas fisiológicas fueron positivas, sin embargo, no significativas ($P > 0.05$), excepto en el ensayo de consumo de oxígeno bajo condiciones estresantes a 30 psu y 20°C ($P = 0.02$). Estos resultados se suman a varios reportes en los que no se ha encontrado una relación positiva entre heterocigosidad y tamaño corporal, sin embargo esta ausencia de relación puede deberse a la edad de los individuos experimentales, los cuales en su etapa adulta destinan gran parte de la energía disponible a reproducción, a diferencia de los estados juveniles en que gran parte de la energía es destinada a crecimiento somático.

1.1 ABSTRACT

A cohort of adult mussels (*Mytilus chilensis*, Hupé 1854) was analyzed to investigate the degree on which the individual multilocus heterozygosity (MLH) affect the physiological response to changing environmental conditions. Each experimental mussel was analyzed physiologically (excretion rate, respiration rate) and electrophoretically (MLH, using allozyme analysis).

Most physiological variables where positively correlated with body size, with the exception of respiration rate at 30 psu and 20°C, where a positive slope was observed with $p=0.018$. The genetic analysis based on five polymorphic loci showed an allele average per locus of 4.2 with a mean observed heterozygosity of 39% (32.9-42.8%), which is considered a high value for invertebrate populations which normally shows a deficiency of heterozygotes.

In the present study the deficiency of heterozygotes showed a value of $D=-0.436$ (-0.353 to -0.536). Most regressions between physiological rates and MLH showed a positive slope, however, were non significant ($P>0.05$), with the exception of respiration rate under stressed conditions (30 psu and 20°C). These results are in accordance with other studies which failed to detect a positive correlation between MLH and growth rate, however, this lack of correlation could be due to the age of the experimental individuals. In most cases, among sexually immature individuals a positive correlation between growth rate and MLH can be found, while in adults the higher energy allocation for reproduction precludes the detection of this relationship.

2. INTRODUCCIÓN

Los cultivos marinos han presentado un progresivo desarrollo a nivel mundial a partir de las dos últimas décadas (Nash, 1988; New, 1997; FAO, 1999-2001). En Chile, la actividad de acuicultura ha incrementado desde un 1.8 % en 1992 a un 18 % en 2005 con respecto al desembarque total de recursos pesqueros (SERNAPESCA, 2006).

El *Mytilus chilensis* (chorito chileno) es un recurso de gran importancia económica en el sur de Chile pero, actualmente esta especie se encuentra sobre explotada, aunque es uno de los moluscos más cultivados en nuestro país. El desarrollo del cultivo de mitílidos se inició en 1943, con la creación de la mitilicultura de Quellón; y con fines comerciales en 1965 (Navarro, J. M. y Gutiérrez, A. 1990).

En Chile existen 1049 centros de moluscos de los cuales 509 corresponden al cultivo de choritos en la décima región en Chiloé, Calbuco y alrededores de Puerto Montt (SERNAPESCA, 2005), zona que presenta condiciones favorables para el desarrollo de la mitilicultura debido a la escasa contaminación ambiental de estas zonas (Recart, 1993). El desembarque de choritos ha tenido un gran aumento en los últimos 10 años, tanto así que en 1995 se desembarcaron 10.723 toneladas lo que aumentó a 87.736 toneladas en el 2005 correspondiente al 100 % del desembarque de este último de la décima región, de un total de 109.440 toneladas de moluscos.

Los cultivos marinos han sido una alternativa de desarrollo económico y social de un amplio sector productivo nacional e internacional, razón por la cual se deben realizar estudios para seguir mejorando la productividad de estos, con el fin de explotar el

potencial biológico de la especie y mejorar la calidad del producto (Soto, 1992; Toro et al., 2004).

La geografía del sur de Chile es muy apropiada para el desarrollo de la acuicultura de moluscos (Winter et al., 1984; Barton, 1997; Sánchez, 2002; Toro et al., 2004), debido principalmente a sus numerosos estuarios y bahías protegidas alejadas de la industrialización y por ende con menos contaminación ambiental.

Hasta el momento, el explosivo incremento de la acuicultura se debe principalmente a un aumento en el número de concesiones y no a un aumento de la productividad de los cultivos (Barton, 1997). El éxito de la acuicultura no sólo se basa en el número de concesiones, si no que también es importante considerar todos los aspectos relacionados con la biología incluyendo los componentes genéticos de las especies involucradas (Newkirk, 1980; Beaumont y Hoare, 2003). Para mejorar la eficiencia en la productividad, es necesario explotar todo el potencial biológico de las especies actualmente en cultivo y aquellas potencialmente cultivables, lo cual puede realizarse por medio del mejoramiento genético (Newkirk, 1980, 1983; Toro y Newkirk, 1990; Beaumont y Hoare, 2003).

Desde el punto de vista de la biología de *Mytilus chilensis*, esta especie se alimenta filtrando plancton y detritus del agua (Navarro, 1983; Recart, 1993) por lo que su crecimiento depende en gran parte de la concentración de partículas de alimento en el agua (concentración de microalgas, variable ambiental biótica) las que le proporcionan la energía al organismo la cual puede ser destinada para mantención de las funciones vitales, crecimiento y reproducción; dependiendo de la etapa del ciclo de vida del organismo.

No sólo la oferta alimentaria influye en el crecimiento sino también otras variables ambientales como salinidad, temperatura y pH entre otras, las cuales afectan las tasas fisiológicas (Bautista, 1989) que inciden en su crecimiento al aumentar los requerimientos energéticos de mantención por ejemplo; la respiración. Existen diversas variables ambientales que provocan respuestas desfavorables en términos energéticos, causando una situación de “estrés fisiológico” al organismo. Ello ocurre, cuando estas variables presentan valores por sobre o bajo los rangos normales a lo cual habitualmente se ve expuesto el individuo. Las poblaciones naturales de choritos en la zona intermareal pueden verse expuestos a temperaturas que bordean los 30 °C en verano y bajo 0°C en invierno presentando gran resistencia a cambios ambientales abióticos como son la temperatura y salinidad (Clasing et al., 1998). El rango de tolerancia de salinidad del chorito va entre 15 y 32 psu; sin embargo, se ha descrito que su crecimiento es positivo solo en salinidades que van entre los 27 y 31 psu.

En la literatura existen estudios, abocados a estimar los efectos de la variable salinidad en bivalvos (Navarro, 1988), que han demostrado que frente a una baja salinidad los bivalvos responden reduciendo su actividad de alimentación ya que cierran sus valvas y disminuyendo la tasa de filtración; por consiguiente, su balance energético se hace negativo (Bautista, 1989, Hutchinson y Hawkins, 1992). Resultados similares se han registrado en *Ostrea chilensis*, en los que una baja en la salinidad (< 20 psu) ha afectado la tasa de crecimiento (Toro et. al., 1995); por su parte Hutchinson y Hawkins (1992) en *O. edulis* observaron una reducción en el consumo de oxígeno producto del cierre de las valvas frente a una baja en la salinidad. En *Choromytilus chorus* (Navarro,

1988); también observó que a salinidades cercanas a 15 psu estos bivalvos permanecen con sus valvas parcialmente cerradas.

La temperatura es otra variable estresante para los bivalvos, ya que al aumentar afecta la tasa de consumo de oxígeno, la cual sufre un incremento que conlleva a un mayor gasto de energía, haciendo que su balance energético sea negativo. Del mismo modo la temperatura afecta directamente la tasa de excreción, incrementándola con temperaturas sobre 10 °C en *O. edulis*, efecto que se ve disminuido ante una reducción de salinidad (< 19 psu) (Hutchinson y Hawkins, 1992).

La constitución genética también afecta el crecimiento del individuo; ya que existe evidencia en la literatura científica que indica que el genotipo puede afectar el metabolismo energético, relacionando parámetros fisiológicos con la heterocigosidad del individuo (Hawkins et al., 1986; Rodhouse y Gaffney, 1984). En varios estudios se ha descrito la existencia de una correlación positiva entre caracteres que guardan relación con la aptitud biológica y el grado de heterocigosidad en una serie de loci (Zouros, 1988). Se ha descrito correlaciones positivas entre heterocigosidad multi locus (HML) y la tasa de crecimiento (Gentili y Beaumont, 1988), tanto en organismos marinos como terrestres (Mitton y Pierce, 1982; Mitton, 1993). Entre los invertebrados marinos en los que se ha descrito esta correlación positiva está *Ostrea chilensis* (Toro et al., 1996), *Mulinia lateralis* (Garton et al., 1984) y *Mytilus edulis* (Koehn y Gaffney, 1984) entre otros. En todos estos casos se ha demostrado que los organismos con mayor grado de HML poseen una mayor eficiencia metabólica, lo cual se debe a una reducción de los costos metabólicos, es decir aquellos individuos más heterocigotos presentan una tasa de consumo de oxígeno menor que los organismos más homocigotos;

acentuándose esta condición en individuos sometidos a estrés (Koehn y Shumway, 1982).

Existen también estudios en los cuales no se ha detectado una correlación entre la tasa de crecimiento y la HML, es así que en individuos producidos en laboratorio (Hatcheries) no se ha detectado esta relación (Beaumont et al., 1983, Adamkewicz et al., 1984). Entre las causas probables por la no detección de esta correlación positiva, está el limitado número de genoma parental usado por el cruce dirigido para los individuos producidos en hatchery, la homogeneidad ambiental en el laboratorio y la ausencia de condiciones de estrés (Gentili y Beaumont, 1988). Otra explicación para la no detección de esta correlación hace referencia a la edad de los individuos experimentales (Mitton y Grant, 1984, Rodhouse et al., 1986) ya que a diferentes edades son también distintos los requerimientos y destinos de la energía; los individuos adultos destinan energía para la reproducción, mientras que los juveniles sólo para crecimiento.

En base a la evidencia de la literatura en la cual se ha detectado una correlación positiva entre HML y tasa de crecimiento solo en poblaciones naturales y no en individuos producidos en hatcheries, el presente trabajo se plantea trabajar con una cohorte proveniente de la población natural de la Bahía de Yaldad, realizando estimaciones de las variables fisiológicas bajo distintas condiciones ambientales abióticas (salinidad y temperatura), incluyendo condiciones normales y de estrés.

En todos los estudios antes mencionados se ha determinado la heterocigosidad por medio del uso de electroforesis enzimática, la que ha demostrado la existencia de un alto grado de polimorfismo en estos organismos. La electroforesis es una técnica de

separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica, consistiendo en que cada proteína migre a través de los poros del gel, dependiendo de su carga eléctrica y tamaño molecular, se localizaran en un lugar diferente sobre el gel. Las proteínas constituyen un producto directo de la acción génica, por lo que la variabilidad proteica debe ser el reflejo de la variabilidad genética, debido a que cada proteína específica es codificada por un solo gen.

2.1 Generalidades de la especie en estudio

Mytilus chilensis (Hupé, 1854) “chorito”, “quilmahue” o “dayes” perteneciente a la familia Mytilidae presenta una amplia distribución en Chile, encontrándose desde la desembocadura del río Tirúa (IX Región) hasta el Estrecho de Magallanes (XII Región), (Bahamondes-Rojas y Muñoz, 1998) pero otros estudios indican que se distribuye a lo largo de la costa chilena (Lancellotti y Vásquez, 2000) abarcando tanto la costa continental e insular; habitando desde el intermareal hasta 20-25 m de profundidad, siendo común encontrarlo en playas expuestas, estuarios y fiordos formando densos bancos sobre substratos duros prefiriendo zonas expuestas a marcadas variaciones de salinidad.

Los mitílidos presentan sexos separados, siendo la coloración de la gónada de los machos un color crema amarillento y el de las hembras un anaranjado (Clasing et al., 1998, Bahamondes-Rojas y Muñoz, 1998). En cuanto a la reproducción esta ocurre entre los meses de Noviembre-Enero en Chile, en casos excepcionales puede extenderse este período dependiendo de la cantidad de luz (Recart, 1993). La fecundación es externa siendo liberados al medio los gametos, ocurrida la fecundación

se desarrolla el embrión dentro del huevo, el cual una vez desarrollado eclosiona como una larva que pasa por diversos estadios hasta formarse la larva pedivelífera la cual puede pasar 3-4 semanas en el plancton antes de fijarse (Toro et al., 2004) a un sustrato firme; esto le permite conseguir un amplio rango de dispersión espacial. Al fijarse pasará de la forma de una larva con velo a un juvenil con valvas que poseen estrías concéntricas de crecimiento, las que son de un color pardo-negrusco a violáceo por el periostraco que los recubre (Clasing et al., 1998, Bahamondes-Rojas y Muñoz, 1998).

Es de suma importancia realizar estudios que involucren los componentes genéticos de las especies en cultivo y el conocimiento de las respuestas fisiológicas, en relación con cambios ambientales, para así determinar áreas con condiciones ambientales favorables que permitan potenciar un buen crecimiento mediante el mejoramiento genético y así desarrollar aún mas la acuicultura en Chile, en especial abordando zonas geográficas de nuestro país donde la extracción de recursos del mar constituye la base económica para un porcentaje importante de la población. Para este propósito se ha tomado como modelo de estudio al bivalvo filtrador *Mytilus chilensis* que habita la bahía de Yaldad, Chiloé donde forma bancos naturales intermareales y además es cultivado en forma masiva en sistemas suspendidos.

2.2 Hipótesis

En base a los antecedentes antes mencionados en el presente estudio se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

La tasa de crecimiento en una cohorte de *Mytilus chilensis* está determinada por el grado de heterocigosidad multi locus (HML), que incide sobre el balance energético.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Determinar el grado de la heterocigosidad multi locus (HML) y tasas fisiológicas que se traducen en pérdida de energía tales como; consumo de oxígeno y tasa de excreción y sus posibles efectos sobre el crecimiento en una cohorte de *M. chilensis*.

2.3.2 Objetivos específicos

- Determinar las tasas fisiológicas consumo de oxígeno y excreción de amonio en una cohorte de *M. chilensis* de Yaldad bajo condiciones normales y de estrés.
- Determinar la HML a una cohorte de *M. chilensis* mediante análisis electroforético de isoenzimas.
- Relacionar las variables fisiológicas con el grado de HML a fin de conocer el efecto genético sobre el metabolismo basal.
- Relacionar la tasa de crecimiento con parámetros genéticos a una cohorte de *M. chilensis* para estimar en que grado el crecimiento está influenciado por la HML.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La determinación de las variables fisiológicas se realizó en el laboratorio del Centro de investigación I-mar de la Universidad de los Lagos en Puerto Montt y los análisis genéticos en el laboratorio de genética aplicada del Instituto de Biología Marina de la Universidad Austral de Chile.

3.1 Área de estudio.

En el presente estudio se utilizaron ejemplares de una cohorte de *Mytilus chilensis* captados en forma natural en la mitilicultura de la bahía de Yaldad, isla de Chiloé (43°08' S; 73°44' O) (Figura 1a y 1 b). El cuerpo de agua en esa localidad presenta un rango de temperatura entre los 10 °C en invierno y los 16 °C durante el mes de enero, mientras que la salinidad se mantiene relativamente estable con valores entre los 27 y 31 psu (Toro et al., 1995 a).

3.2 Muestreo y marcaje individual de los ejemplares.

Durante Octubre del 2005 se recolectaron aproximadamente 500 individuos juveniles de una cohorte de 9 meses de edad de *Mytilus chilensis* en Yaldad. Los animales fueron transportados vivos al Centro de Investigación I-mar. En el laboratorio se tomó al azar 100 ejemplares y se procedió a marcarlos individualmente para su posterior identificación en las mediciones. Para el marcaje se utilizaron marcas numeradas de fondo verde y números blancos, con el fin de hacer notar la numeración

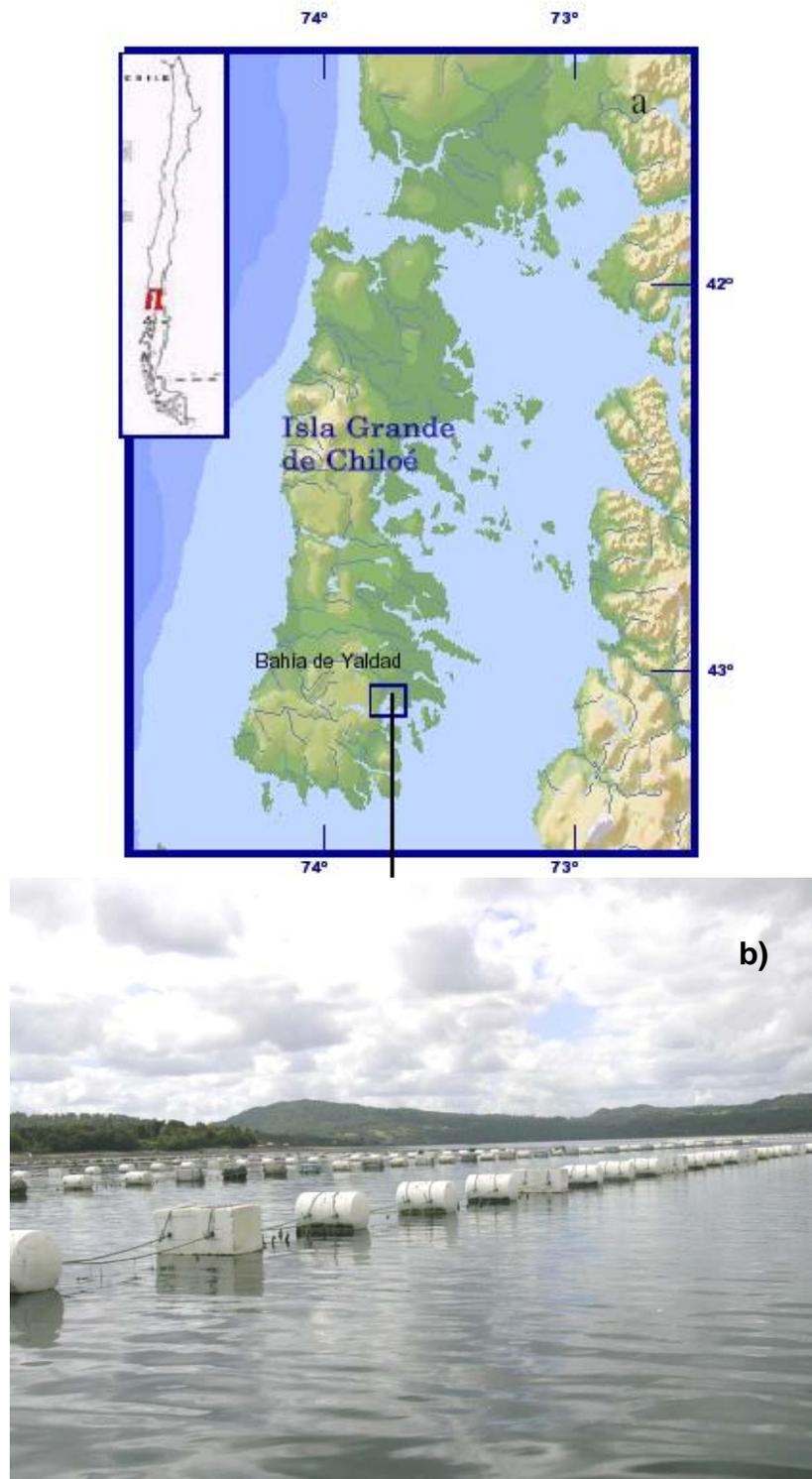


Figura 1. Área de estudio. a) Mapa de Chiloé, b) Balsas de cultivo de *Mytilus chilensis* en la Bahía de Yaldad.

sobre la superficie de la valva oscura del chorito. Para la fijación de la marca en una de las valvas, se utilizó el adhesivo “Superbond Loctite 495” (Figura 2 a y b). Durante todo el transcurso del estudio se cuantificó una mortalidad del 30% por lo que los ejemplares muertos fueron reemplazados a fin de mantener el N=100. Los individuos utilizados para el reemplazo fueron obtenidos a partir del grupo traído en un inicio siendo estos también elegidos al azar y marcados. Previo a realizarles cualquier medición fueron aclimatados durante una semana a las condiciones de laboratorio.

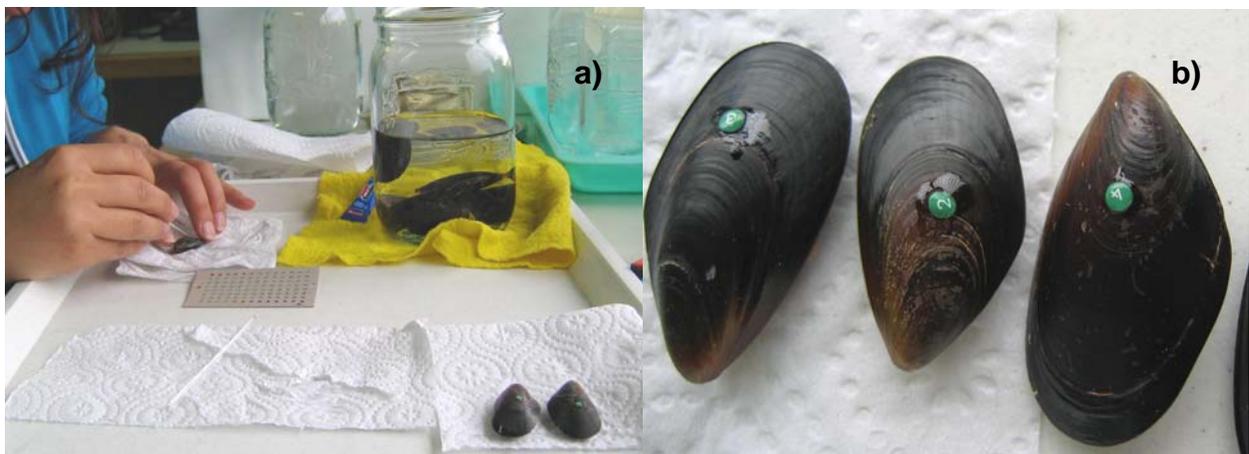


Figura 2. *Mytilus chilensis*. a) Fotografía que muestra el proceso de pegado de la marca a la valva. b) Fotografía que muestra en detalle las marcas puestas en los individuos.

3.3 Aclimatación de animales.

Los especímenes fueron aclimatados a las condiciones de laboratorio por un período de 5 meses antes de ser usados en los experimentos. Para ello fueron mantenidos en acuarios de 30 litros y alimentados principalmente con seston natural (Noviembre-Marzo), al cual posteriormente se le adicionó la microalga *Isochrysis galbana* a una concentración de 6000 cel/ml (0.5 litro microalgas/día). El agua de los acuarios era renovada diariamente y mantenida a 14 ± 1 °C y a una salinidad cercana a 30 psu que corresponden a los valores promedios medidos en la bahía de Yaldad (Navarro, 1983) (Figura 3). En forma paralela fue necesario realizar un monocultivo de la microalga *Isochrysis galbana*, bajo luz artificial las 24 horas del día en una cámara de mantención (P-Selecta, modelo Hot cold–GL) a 14 °C y a una salinidad aprox. de 29 psu en el medio de cultivo f/2 (Guillard, 1975).

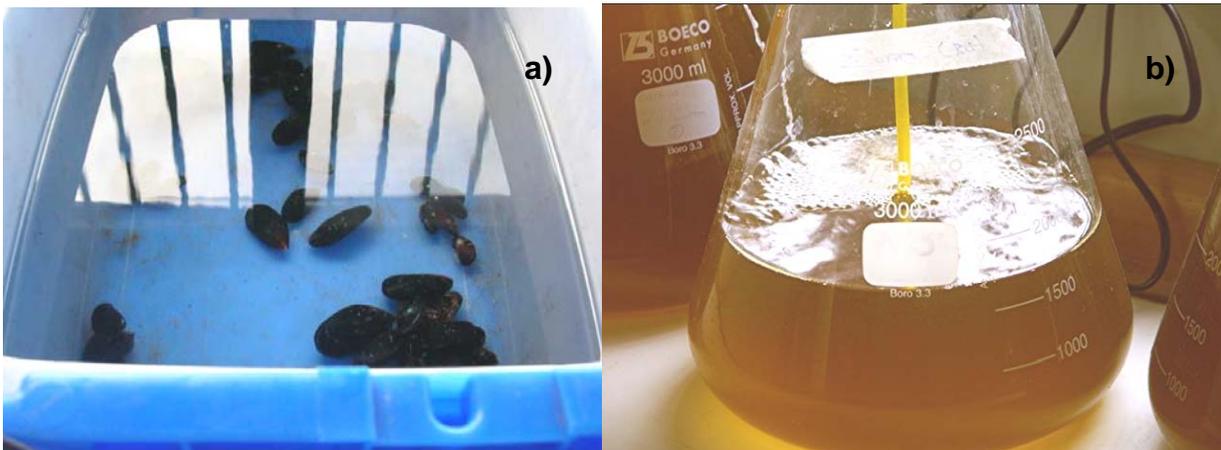


Figura 3. *Mytilus chilensis*. a) Fotografía de acuario de 30 litros con los ejemplares N=100. b) Cultivo de *Isochrysis galbana*.

3.4 Diseño experimental para las determinaciones fisiológicas

Las determinaciones fisiológicas se realizaron durante un período de 2 meses (Abril- Mayo) con ejemplares que tenían 15 meses de edad y una longitud valvar promedio de 37.415 ± 6.156 mm y peso vivo promedio de 5.14 ± 2.38 g.

La cuantificación de las tasas fisiológicas se llevaron a cabo a dos temperaturas 15°C y 20°C , para lo cual los ejemplares experimentales se aclimataron a dichas temperaturas durante una semana previa a la medición de cada tasa fisiológica. La aclimatación se realizó en un baño termoregulado marca VWR, apropiado para sistemas de circulación externa; el cual se mantuvo por una semana a la temperatura de aclimatación (15°C ó 20°C). También se trabajó con 3 salinidades 20, 25 y 30 psu, utilizándose agua dulce para diluir el agua de mar filtrada ($0.45 \mu\text{m}$). Las mediciones de salinidad fueron realizadas con un salinómetro WTW, modelo LF 320.

3.4.1 Determinación tasa de consumo de oxígeno

Los ejemplares para determinar el metabolismo estándar se mantuvieron sin alimentar en el transcurso de la medición (Navarro, 1983) colocándose en forma individual en cámaras de vidrio (0,5 l) previamente lavadas con una solución de ácido clorhídrico (HCl) al 25%. Las cámaras fueron llenadas con agua de mar filtrada ($0.45 \mu\text{m}$), sin material particulado (seston) (Hutchinson y Hawkins, 1992) y con una saturación de oxígeno cercano al 100%. Las cámaras fueron cerradas herméticamente y se realizó una incubación de 3 a 5 horas, dependiendo del consumo de oxígeno registrado; para no sobrepasar el 30% de consumo (esto a fin de evitar una respuesta

oxiconforme) en cada una de las temperaturas utilizadas (15 °C y 20 °C) de acuerdo al ensayo realizado y previa medición de la saturación de oxígeno inicial (Figura 4 a, b).

El porcentaje de saturación de oxígeno se midió con un microsensar Presens, modelo Fibox –3, usando el método optoelectrónico descrito por Klimant et al., (1995). Este instrumento capta la baja de tensión de oxígeno del agua de mar en las cámaras experimentales, amplificando la señal la cual es registrada automáticamente. Con el fin de asegurar la precisión, aproximadamente cada 3 días se procedió a calibrar el instrumento con una solución de Sulfito de Sodio (Na_2SO_3) para obtener el 0% del aire saturado, mientras que el 100% se obtenía midiendo agua de mar filtrada saturada de oxígeno mediante un aireador que funcionó 30 minutos antes de proceder a calibrar el microsensar. Además, se consideró las condiciones climáticas, específicamente de la presión atmosférica, la cual era registrada diariamente; realizándose todas las estimaciones de la tasa de consumo de oxígeno en un rango de 1010-1020 hPa.

Para la obtención del VO_2 consumido se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{VO}_2 = \frac{[(\%O_2 t_0 - \%O_2 t_1) \times C \times 0.01 \times (V_c - V_a) \times 1]}{(t_f - t_i)}$$

Donde: VO_2 es el oxígeno consumido en $\text{ml O}_2\text{h}^{-1}$; $\%O_2$ es el porcentaje de oxígeno saturado en la cámara t_0 al comienzo del ensayo y t_1 al final de este; C es la constante de disolución de oxígeno de acuerdo a la temperatura y salinidad del ensayo calculado de acuerdo a Weiss (1970); V_c es el volumen de la cámara experimental en litros y V_a es el volumen estimado para el individuo en litros; t_f corresponde al tiempo final del ensayo y t_i al tiempo inicial ambos en horas.

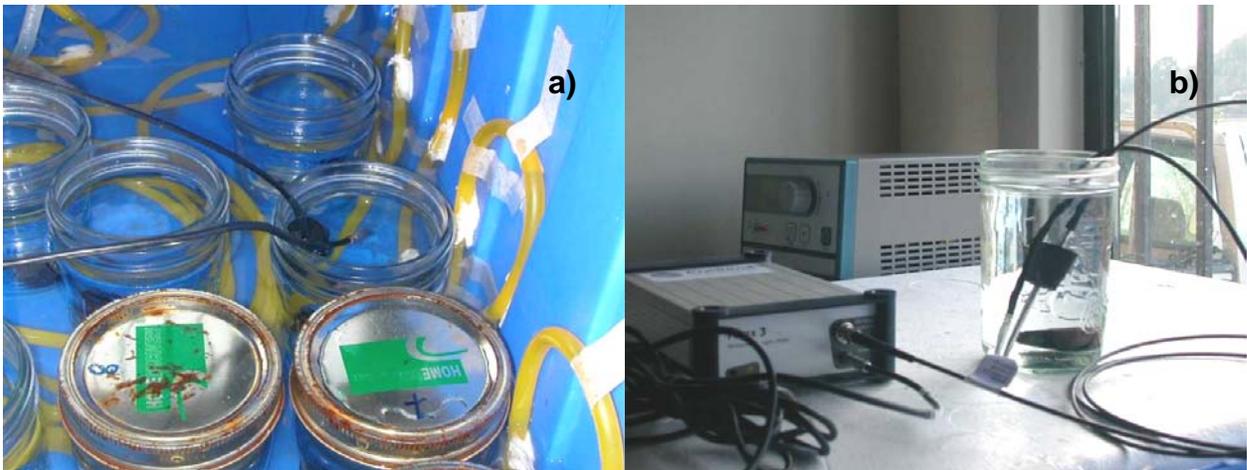


Figura 4. *Mytilus chilensis*. a) Fotografía que muestra cámaras cerradas herméticamente en el baño de mantenimiento. b) Fotografía mostrando medición de la tensión de oxígeno en la cámara.

3.4.2 Determinación de la tasa de excreción

Esta variable representa la producción de desechos nitrogenados producto del catabolismo de las proteínas. Como el amonio-nitrógeno ($\text{NH}_4\text{-N}$) es el principal producto de excreción de los moluscos, para su determinación se empleó el método colorimétrico de Solórzano (1969), extrayendo 3 muestras de agua de cada cámara experimental con el fin de estimar la tasa de excreción con 3 réplicas. A cada muestra de agua (5 ml) se añadió una solución fenol (0,2 ml: 10g fenol en 100 ml etanol 95%), una solución de nitroprusiato de sodio 0,5% (0,2 ml) y una solución oxidante 4:1 (0,5 ml: solución citrato alcalina + hipoclorito de sodio). Las muestras se mantuvieron en oscuridad por un período de 2 a 24 horas tras lo cual se leyeron sus absorvancias a 640 nm mediante el uso de un espectrofotómetro (P-General, TU 1800 uv-vis) (Figura 5, a).

Previa a cada determinación, se calibró una curva de concentración de amonio empleando los mismos reactivos y procedimientos mencionados para las muestras, pero en lugar de estas, se emplearon soluciones de Sulfato de Amonio de concentraciones conocidas (Figura 5, b). Las concentraciones de las muestras se despejaron de la ecuación de regresión lineal obtenida con la curva de calibración y las tasas de excreción se determinaron a partir de la siguiente ecuación:

$$T.E = \frac{28 \times C \times V}{T} \mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$$

Donde: **T.E.** es la tasa de excreción en $\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$, **C** es la lectura en μM desde la curva de calibración, **V** es el volumen de la cámara utilizada en el experimento y **T** es el tiempo en horas.

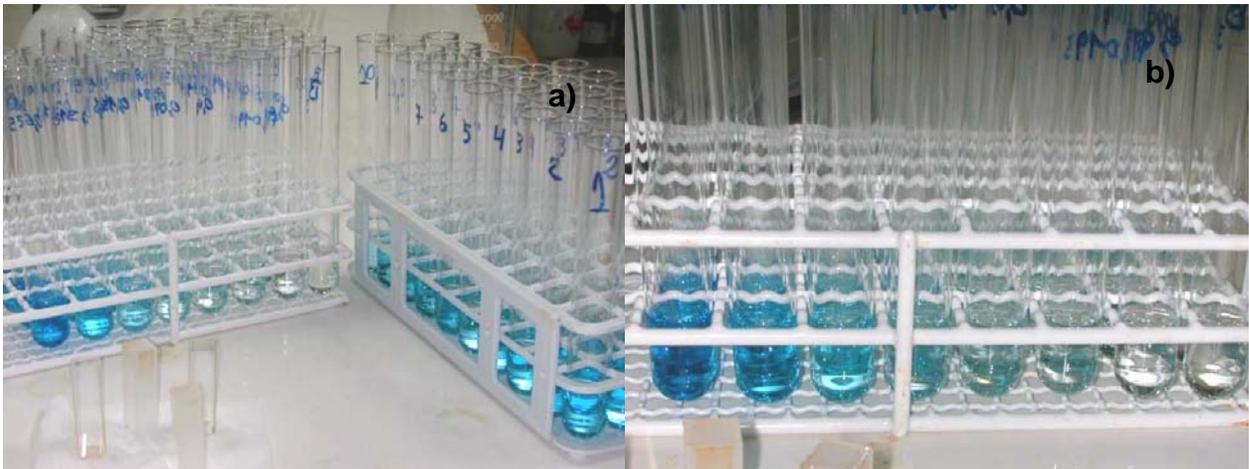


Figura 5. *Mytilus chilensis*. a) Fotografía mostrando test colorimétrico de Solórzano b) Fotografía mostrando en detalle Curva de Calibración.

3.4.3 Estandarización y transformación de tasas fisiológicas

Con el fin de corregir los valores de las tasas fisiológicas debido a diferencias en la masa seca de tejido se llevó a cabo una estandarización de éstas a 1 g de peso seco. Para ello debido a que no se pudo obtener los valores del total del peso seco de la carne por los tejidos fijados para los análisis genéticos, se construyó una curva peso seco / longitud valvar según Vergara et al., (1992), con otro grupo de ejemplares de la cohorte, 60 individuos fueron disecados (Fig. 6), extrayéndoles el tejido blando el cual fue secado a 60 °C por 48 h en una estufa Binder. Posteriormente fueron pesados individualmente hasta obtener un peso constante, estimándose finalmente el peso seco de los individuos experimentales en base a la longitud valvar: $P. \text{ seco carne} = (0,0094 \times \text{long. valvar}) - 0,173$ ($r^2=0,7744$, $P<0.001$), con el fin de correlacionar las tasa fisiológicas con el peso seco y eliminar el peso diferencial de choritos sobre cada tasa fisiológica y cuantificar sólo el efecto genético (Toro et al., 1996). Las muestras fueron posteriormente quemadas en una mufla a 450 °C por 6 h, a fin de obtener el peso de la materia inorgánica. Además, se midió la longitud de la valva (ancho, alto y largo) y se obtuvo el peso vivo, de cada ejemplar.

Finalmente se estandarizó a 1 g de peso seco de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Y_s = (W_s/W_e)^b Y_e$$

Donde: Y_s es la tasa fisiológica de acuerdo al tamaño (peso) del individuo, W_s equivale a peso estandarizado (1 gramo), W_e es el peso del individuo experimental, Y_e es la tasa fisiológica no corregida (Toro y Vergara, 1998) y $b= 0.75$ para la tasa de consumo de

oxígeno (Bayne y Newell, 1983) y 0.72 para la tasa de excreción de amonio (Hawkins et al., 1985).

Los resultados obtenidos de la tasa de consumo de oxígeno fueron expresados en $\text{ml O}_2 \times \text{hora}^{-1} \text{g}^{-1}$ peso seco. Mientras que los resultados obtenidos a partir de la tasa de excreción se expresó en $\mu\text{g de NH}_4\text{-N} \times \text{hora}^{-1} \text{g}^{-1}$ peso seco.



Figura 6. *Mytilus chilensis*. Fotografía mostrando individuos que fueron utilizados para la curva de peso seco carne / longitud valvar.

3.5 Análisis genético

Los animales (N=91) fueron transportados en frío al laboratorio de Genética Aplicada del Instituto de Biología Marina de la Universidad Austral de Chile, con el fin de evitar alteraciones bioquímicas a nivel celular, debido a que los procesos degradativos reducen la utilidad y confiabilidad de cualquier muestra para análisis alozímicos (Koehn

et al., 1988). En el laboratorio fueron disectados removiéndose los tejidos blandos, se extrajo el músculo aductor y la gónada los que se almacenaron por separado en tubos eppendorf (1.5 ml) con el rótulo correspondiente al número del individuo y el tipo de tejido guardándose en un ultra freezer Rowsen modelo ZKU-L200 a -80 °C hasta que se realizaran los ensayos correspondientes.

Se realizaron pruebas con 12 loci enzimáticos, para lo cual se utilizaron 2 tipos de buffer, Tris - ác. Maleico - EDTA a pH 7.4 y Tris - ác. Bórico - EDTA a pH 9.

En base a las pruebas preliminares y la resolución obtenida se seleccionaron 8 loci enzimáticos para las corridas definitivas, que fueron realizadas en geles horizontales de almidón.

3.5.1. Tratamiento de las muestras

A fin de obtener las muestras para los análisis genéticos, se utilizó tejido del músculo aductor y la gónada, los cuales fueron macerados y homogeneizados en 100-150 µl de buffer Tris – Ác. Maleico – EDTA, pH 7.4 dependiendo de su tamaño y luego centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 5 °C, en una centrífuga International Equipment Company modelo Micromax RF. Una vez centrifugado se extrajo el sobrenadante correspondiente a las enzimas con trozos de papel filtro Whatman N° 3 (4 x 10 mm) los que eran sembrados en una incisión en el gel de almidón (Figura 7 a) en el extremo del polo negativo.

Para la preparación de gel de almidón al 12% de 250 ml, se utilizó 32 g de almidón Sigma (Sigma Chemical Co.), 25 ml de buffer Tris – Ác. Maleico – EDTA, pH 7.4 ó 25 ml de buffer Tris- Ác. Bórico – EDTA, pH 9 y 210 ml de agua destilada. Todo

esto se vierte en un matraz y es primero calentado y mezclado con un agitador magnético hasta que pasa al estado de gel, para luego seguir calentándolo en un microondas hasta ebullición, agitándose cada 10 segundos. Hecho esto se le extraían con una bomba al vacío las burbujas que pudiesen haber quedado para luego ser vertido en una placa de vidrio con un marco y dejar enfriar para finalmente cubrir con parafilm plástico y guardar en el refrigerador hasta su uso.

3.5.2 Análisis electroforético

Previo al análisis electroforético el gel fue cargado con 18 muestras y corrido en un ambiente de 4 °C, utilizando una fuente de poder con un flujo de corriente de 151 V y 80 mA para las corridas con TME durante 6 horas y a 166 Volts y 12 mA en TBE por 14 horas (figura 7 a y b). Los buffer de electrodos usados fueron TME Tris 0.1 M, Ác. Maleico 0.1 M, EDTA 0.01 M, MgCl₂ 0.01 M, pH 7,4 y TBE Tris 0.086 M, Ác. Bórico 0.086 M, EDTA 0.001 M, pH 9. Una vez terminado el tiempo de corrida, el sistema se desconectó y el gel se cortó en dos o tres láminas de 2 mm de ancho aproximadamente de forma que cada lámina obtenida era sometida a una tinción específica de acuerdo al sistema enzimático a visualizar.

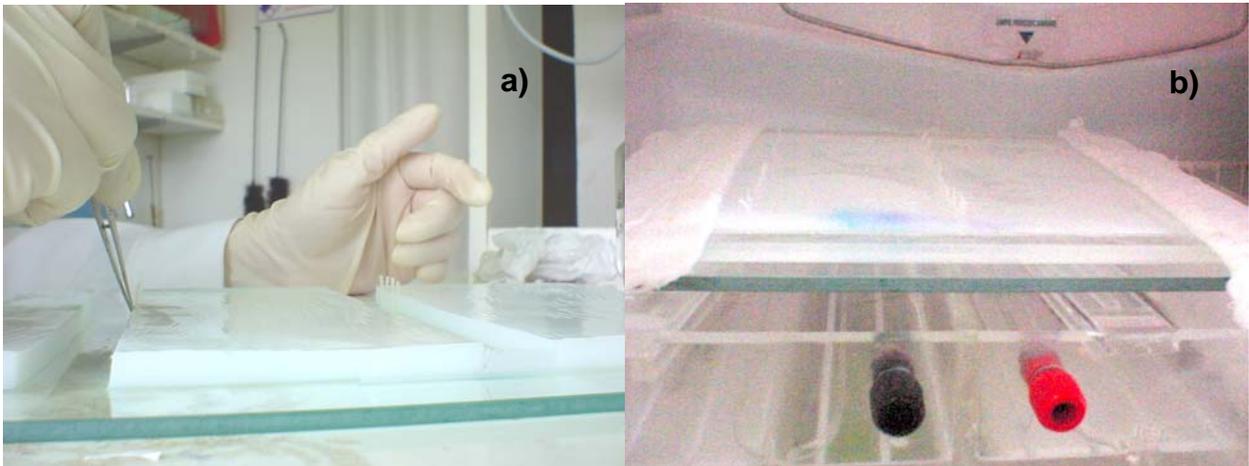


Figura 7. *Mytilus chilensis*. a) Sembrado de las muestras en el gel de almidón 12%. b) Corrida electroforética (4 °C) una vez finalizada.

3.5.3 Sistemas enzimáticos

Se procedió a determinar la heterocigosidad utilizando 8 loci polimórficos: Fosfoglucomutasa (PGM, EC 2.7.5.1), Leucina aminopeptidasa (LAP, EC 3.4.11.1), Peptidasa (PEP, EC 3.4.11.13), Enzima málica (ME, EC 1.1.1.40), Glucosafosfato isomerasa (GPI, EC 5.3.1.9), Malato deshidrogenasa (MDH, EC 1.1.1.37), , Isocitrato deshidrogenasa (ICD, EC 1.1.1.42), , Xantina deshidrogenasa (XDH, EC 1.2.1.37), siendo teñidos los geles de almidón de acuerdo a Harris y Hopkinson (1978), Beaumont y Toro (1996).

3.5.4 Análisis de datos obtenidos

Mediante la visualización directa de los geles (zigogramas, figura 8 a y b) se determinaron las diferencias alélicas, esto debido a las distintas velocidades de

migración que presentaron las proteínas; asignándoseles así a los diferentes alelos una letra (A, B, C) desde el origen. Considerándose un locus polimórfico cuando la frecuencia alélica del alelo más común era ≥ 0.95 (criterio del 95%).

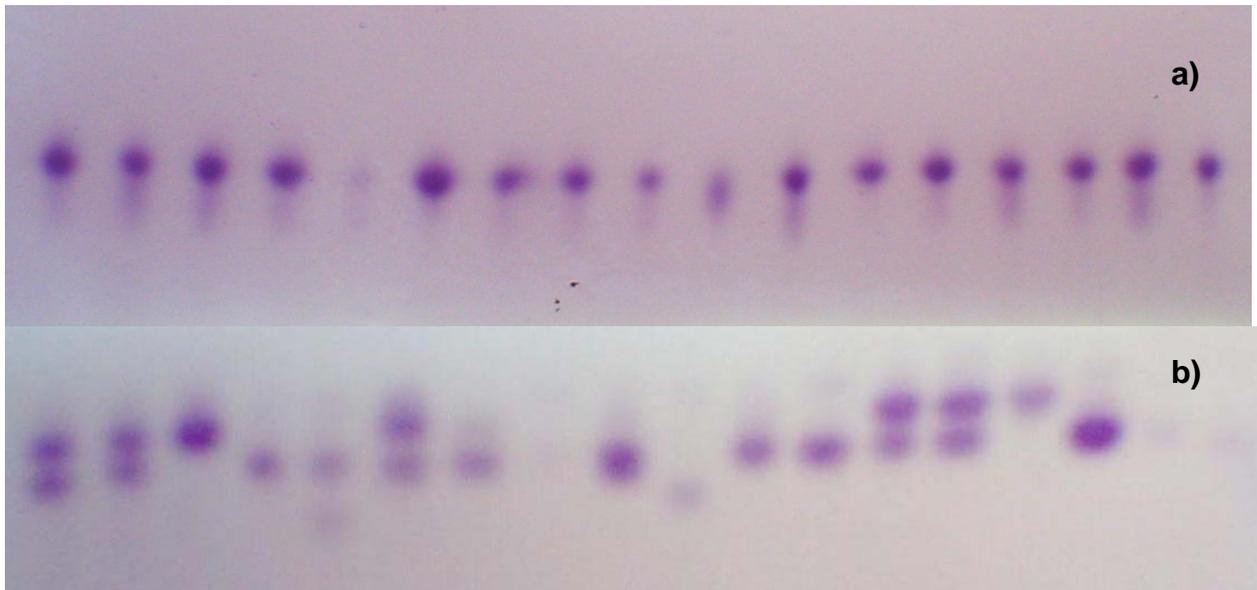


Figura 8. a) Enzima Isocitrato (ICD), monomórfica. b) Enzima (PGM), polimórfica.

Para analizar los datos se procedió a comparar la distribuciones genotípicas observadas con las esperadas de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg (Sokal y Rohlf, 1995). Además las deficiencias del heterocigoto (D) fueron expresadas como:

$$D = (H_o - H_e) / H_e$$

Donde: H_o es la frecuencia observada de heterocigotos y H_e la frecuencia esperada. Para esto los datos fueron analizados usando el programa computacional POPGENE 32 (Yeh y Boyle, 1999).

La heterocigosidad se obtuvo a través de la frecuencia de heterocigotos por loci, así $H = (\sum \text{frec.het} / n^{\circ} \text{ loci})$. Para estimar la distribución observada de la heterocigosidad multi locus y correlacionarla con el peso seco y las variables fisiológicas, se establecieron las siguientes categorías de heterocigosidad de acuerdo al número de loci que resultaron heterocigotos: Categoría **0**= 0 loci heterocigotos, **1**=1 loci heterocigoto, **2**= 2 loci heterocigotos o más. Así se pudieron realizar regresiones entre la heterocigosidad multi locus individual y las variables fisiológicas, de acuerdo a la expresión:

$$Y_s = (HML \times b) + a$$

Donde: **Y_s** es la variable fisiológicas estandarizada, **HML** es la heterocigosidad multi locus (0,1,2 o más), **b** coeficiente de regresión y **a** es la constante de regresión.

Los análisis estadísticos como las regresiones fueron llevado a cabo con el programa SYSTAT 11. Los gráficos se confeccionaron utilizando el programa SIGMAPLOT 10.0

4. RESULTADOS

4.1. Variables fisiológicas

Las tasas fisiológicas fueron relacionadas con el tamaño corporal expresado como peso seco carne por medio de regresiones lineales. La ecuación de regresión se expresó como $Y = bX + a$; donde Y es la variable fisiológica, X es el peso seco (g), a es el intercepto y b es la pendiente.

4.1.1 Consumo de oxígeno

El valor máximo se alcanzó en el ensayo a 20 psu - 15 °C correspondiente a 1.668 ml/h⁻¹ y un promedio de 0.499±0.428 ml/h⁻¹, con una correlación no significativa (P = 0.423). En los demás ensayos decreció el consumo de oxígeno registrándose valores máximos de 1.257 ml/h⁻¹ en el tratamiento con 25 psu y 15 °C y de 0.943 ml/h⁻¹ en el ensayo a 30 psu y 20 °C. Se determinó un leve aumento del consumo de oxígeno a medida que se redujo la salinidad (Tabla 1, figuras 9, 10 y 11). Sólo en el tratamiento a 30 psu y 20 °C se detectó una correlación positiva y significativa (P = 0.018), mientras que en el ensayo a 25 psu -15 °C se observó una pendiente negativa que indicaría la independencia del consumo de oxígeno del tamaño corporal con un valor de significancia de P = 0.154, lo que podría deberse a la poca dispersión entre los tamaños, tomando en cuenta que se trata solo de una cohorte.

4.1.2 Tasa de excreción

La tasa de excreción al contrario a la del consumo de oxígeno incrementó a medida que se aumentó la salinidad. Registrándose la mayor tasa de excreción en el ensayo a 30 psu y 20 °C con un promedio de $41.872 \pm 10.151 \mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$ y un máximo de $78.531 \mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$, presentando una pendiente negativa no significativa. Estos valores sin embargo pudieron estar influenciados por el alza de temperatura. En los demás tratamientos en cambio, la correlación no mostró relación significativa con el tamaño corporal; sin embargo, registró una pendiente positiva, con valores máximos de $22.81 \mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$ para el tratamiento a 20 psu y 15 °C ($P = 0.108$) y de $55.823 \mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$ en el ensayo a 25 psu y 15 °C y ($P = 0.176$) (Tabla 1 y figs. 9, 10 y 11).

TABLA 1. *Mytilus chilensis*. Regresiones entre las tasas fisiológicas y el peso seco (g). Se da el valor del coeficiente de determinación (r^2) y su probabilidad estadística (P),

* $P < 0.05$; **NS** no significativo. $N=91$

VARIABLES FISIOLÓGICAS	a	b	r^2	P
Consumo oxígeno 20 psu – 15 °C (ml O_2/h^{-1})	0,390	0.623	0,007	NS
Consumo oxígeno 25 psu – 15 °C (ml O_2/h^{-1})	0,726	-0,638	0,023	NS
Consumo oxígeno 30 psu – 20 °C (ml O_2/h^{-1})	0,341	0,487	0,062	*
Tasa excreción 20 psu – 15 °C ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$)	6.365	15.499	0,032	NS
Tasa excreción 25 psu – 15 °C ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$)	18.174	31.893	0,021	NS
Tasa excreción 30 psu – 20 °C ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$)	45.455	-17.828	0,01	NS

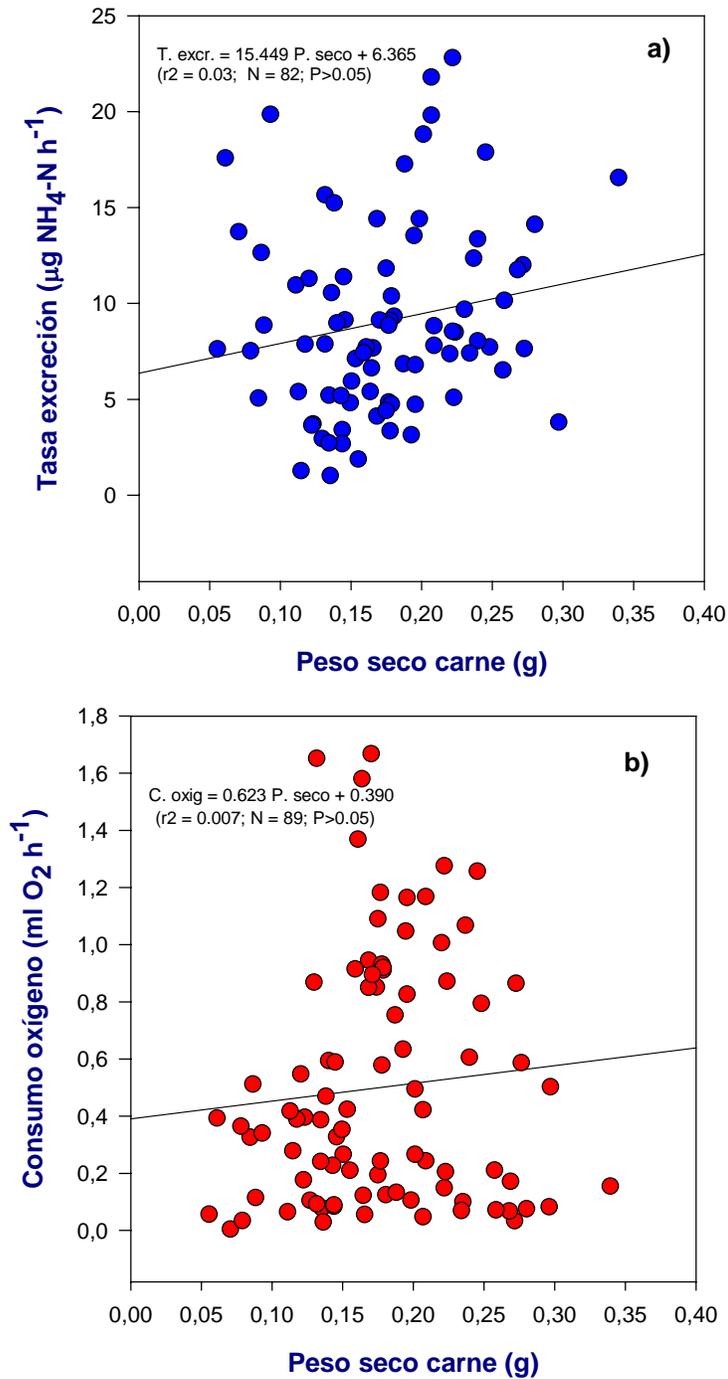


Figura 9. *Mytilus chilensis*. Relaciones entre las variables fisiológicas determinadas a 20 psu y 15 °C y el tamaño corporal expresado en peso seco estandarizado (g), a) tasa de excreción ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$), b) consumo de oxígeno ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$).

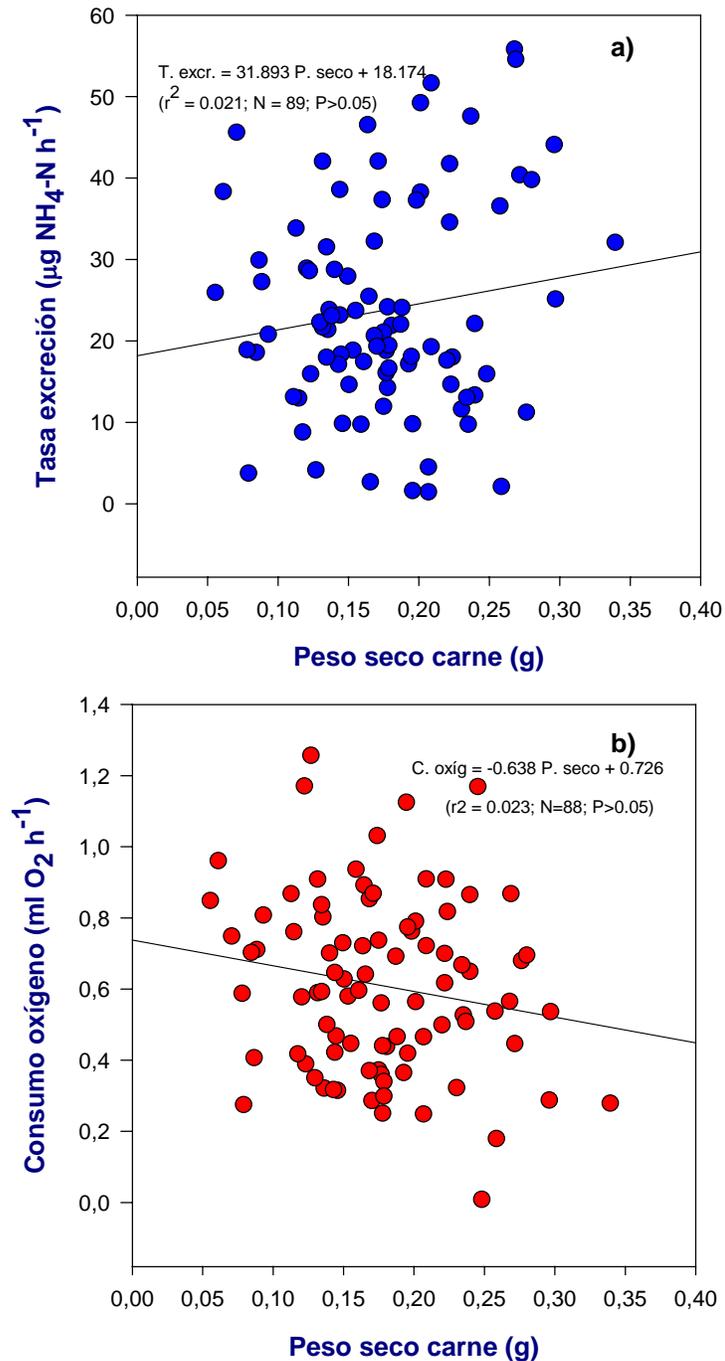


Figura 10. *Mytilus chilensis*. Relaciones entre las variables fisiológicas determinadas a 25 psu y 15 °C y el tamaño corporal expresado en peso seco estandarizado (g), a) tasa de excreción ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$), b) consumo de oxígeno ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$).

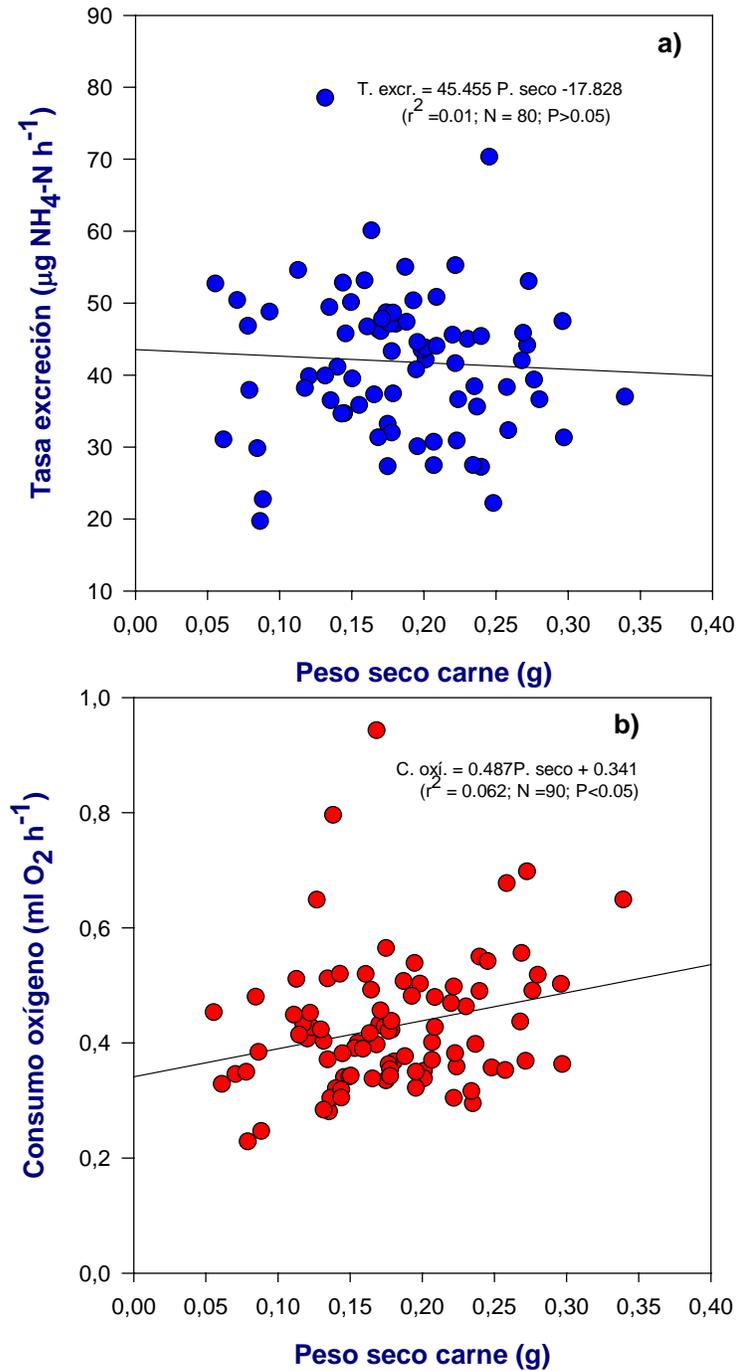


Figura 11. *Mytilus chilensis*. Relaciones entre las variables fisiológicas determinadas a 30 psu y 20 °C y el tamaño corporal expresado en peso seco estandarizado (g), a) tasa de excreción ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$), b) consumo de oxígeno ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$).

4.2 Análisis genéticos

Se identificaron 5 loci polimórficos de los 8 analizados, observándose un 62.5% de polimorfismo en la cohorte estudiada (Tabla 2). Se observó un máximo de 5 alelos en el locus ME y un mínimo de 4 alelos en los demás loci. Las Tablas 3 y 4 resumen las frecuencias alélicas y genotípicas esperadas, siendo el alelo B el más común en PGM con una frecuencia de 0.383 y en GPI con una frecuencia de 0.313. En los demás loci el alelo C fue el más frecuente, registrándose en LAP la mayor frecuencia con 0.483 y la menor en PEP con valor de 0.283 (Tabla 4). El número de individuos observados se desvían significativamente de los esperados en todos los loci analizados ($P < 0.001$), por lo tanto, la muestra no está bajo equilibrio Hardy-Weinberg.

TABLA 2. *Mytilus chilensis*. Descripción de las enzimas analizadas. El buffer utilizado, el número de loci visualizados y el carácter polimórfico de cada enzima. (Buffers: TBE, Tris-EDTA-Ác. Bórico; TME, Tris-EDTA-Ác. Maleico).

ENZIMA	ABREV.	CODIGO	Nº LOCI	BUFFER	POLIMORFISMO
Enzima málica	ME	1.1.1.40	2	TBE; pH 9	SI
Fosfoglucomutasa	PGM	2.7.5.1	1	TME; pH 7,4	SI
Leucina aminopeptidasa	LAP	3.4.11.1	1	TME; pH 7,4	SI
Peptidasa	PEP	3.4.11.13	4	TBE; pH 9	SI
Glucosafosfato isomerasa	GPI	5.3.1.9	1	TME; pH 7,4	SI

TABLA 3. *Mytilus chilensis*. Descripción de 3 loci polimórficos analizados con buffer TME. Se dan las frecuencias alélicas **f(a)** y genotípicas esperadas **f(g)**, el **N(obs)** y **N(esp)** corresponden al número de individuos observados y esperados bajo el equilibrio de H-W. Se da el valor de χ^2 , su probabilidad estadística (**P**) *** P>0.0001

ENZIMA	ALELOS	f(a)	GENOTIPOS	f(g)	N (Obs)	N (Esp)	χ^2	g.l	p (x)
PGM	A	0,1444	AA	0.0209	6	1,8156	45,409	6	***
	B	0,3833	BA	0.1107	9	10,0223			
	C	0,3500	BB	0.1469	23	13,1061			
	D	0,1222	CA	0.1011	5	9,1508			
			CB	0.2683	10	24,2849			
			CC	0.1225	19	10,9106			
			DA	0.0353	0	3,1955			
			DB	0.0937	4	8,4804			
			DC	0.0855	10	7,7430			
			DD	0.0149	4	1,2905			
GPI	A	0,1758	AA	0.0309	10	2,7403	81,9505	6	***
	B	0,3132	BA	0.1101	12	10,0773			
	C	0,3022	BB	0.0981	18	8,8177			
	D	0,2088	CA	0.1063	0	9,7238			
			CB	0.1893	9	17,3204			
			CC	0.0913	15	8,2044			
			DA	0.0734	0	6,7182			
			DB	0.1308	0	11,9669			
			DC	0.1262	16	11,5470			
			DD	0.0436	11	3,8840			
LAP	A	0,0714	AA	0.0051	0	0,4309	50,9843	6	***
	B	0,2253	BA	0.0322	5	2,9448			
	C	0,4835	BB	0.0508	13	4,5304			
	D	0,2198	CA	0.0690	8	6,3204			
			CB	0.2179	10	19,9337			
			CC	0.2338	27	21,1492			
			DA	0.0314	0	2,8729			
			DB	0.0990	0	9,0608			
			DC	0.2125	16	19,4475			
			DD	0.0483	12	4,3094			

TABLA 4. *Mytilus chilensis*. Descripción de 2 loci polimórficos analizados con buffer TBE. Se dan las frecuencias alélicas $f(a)$ y genotípicas esperadas $f(g)$ el $N(obs)$ y $N(esp)$ corresponden al número de individuos observados y esperados bajo el equilibrio de H-W. Se da el valor de X^2 , su probabilidad estadística (P) *** $P > 0.0001$

ENZIMA	ALELOS	$f(a)$	GENOTIPOS	$f(g)$	$N(Obs)$	$N(Esp)$	X^2	g.l	p(x)
ME	A	0,0909	AA	0.0082	2	0.6857	109,8888	10	***
	B	0,1989	BA	0.0361	7	3,2000			
	C	0,4545	BB	0.0395	10	3.4000			
	D	0,1648	CA	0.0826	3	7.3143			
	E	0,0909	CB	0.1808	6	16.0000			
			CC	0.2065	32	18.0571			
			DA	0.0299	0	2.6514			
			DB	0.0655	1	5.8000			
			DC	0.1498	6	13.2571			
			DD	0.0271	10	2,3200			
			EA	0.0165	2	1.4629			
			EB	0.0361	1	3.2000			
			EC	0.0826	1	7.3143			
			ED	0.0299	2	2.6514			
EE	0.082	5	0.6857						
PEP	A	0,2778	AA	0.0771	18	6,8436	60,5278	6	***
	B	0,2333	BA	0.1296	2	11,7318			
	C	0,2833	BB	0.0544	11	4,8101			
	D	0,2056	CA	0.1574	7	14,2458			
			CB	0.1321	9	11,9665			
			CC	0.0802	15	7,1229			
			DA	0.1142	5	10,3352			
			DB	0.0959	9	8,6816			
			DC	0.1164	5	10,5419			
			DD	0.0422	9	3,7207			

En cuanto al grado de heterocigosidad observada el valor poblacional promedio fue de $H = 0.395$, y un promedio de frecuencia de heterocigosidad (H_o) = 0.399 con un valor de $D = -0.436$ lo que implica un déficit de heterocigotos en la cohorte estudiada. En cuanto a los loci estudiados el que presentó el mayor déficit fue el ME con un valor de $D = -0.536$ (Tabla 5).

TABLA 5. *Mytilus chilensis*. Distribución de la heterocigosidad en los 5 loci enzimáticos. ***H_o*** y ***H_e*** corresponden a la heterocigosidad observada y esperada respectivamente; ***D*** Índice relativo de desviación de heterocigotos del valor esperado, * $P < 0.05$.

LOCUS	N	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>D</i>
PGM	180	0,4222	0,6948	-0,392 *
GPI	182	0,4066	0,7361	-0,448 *
ME	176	0,3295	0,7102	-0,536 *
LAP	182	0,4286	0,6621	-0,353 *
PEP	180	0,4111	0,7459	-0,449 *
Means	180	0,3996	0,7098	-0,436

4.2.1 Heterocigosidad multi locus (HML)

Los valores de HML que variaron entre 0 y 5 tuvieron un valor promedio de 1.978 alelos por locus (N=91). En la Tabla 6 se muestra el grado de correlación existente entre el peso seco, las variables fisiológicas y la heterocigosidad multi locus. Para una mejor visualización de las tendencias encontradas se graficaron los promedios \pm el error

estándar del peso seco y de las variables fisiológicas según el grado de heterocigosidad (Fig. 12, 13,14 y 15).

TABLA 6. *Mytilus chilensis*. Regresiones de las diferentes variables fisiológicas estandarizadas y la heterocigosidad multi locus medida por individuo. La ecuación de regresión se expresa como $Y = a + bx$, donde Y es la variable fisiológica y X el número de loci para los cuales el individuo es heterocigoto (HML), b el coeficiente de regresión y a la constante. Se da el valor de r^2 para la relación y la significancia estadística P , * $P < 0.05$, **NS** no significativo. Además se describe la relación entre el peso seco (g) y la HML. N=91

VARIABLES FISIOLÓGICAS	a	b	r^2	P
Consumo oxígeno 20 psu – 15 °C (ml O ₂ /h ⁻¹)	0,436	0,054	0,02	NS
Consumo oxígeno 25 psu – 15 °C (ml O ₂ /h ⁻¹)	0,547	0,037	0,035	NS
Consumo oxígeno 30 psu – 20 °C (ml O ₂ /h ⁻¹)	0,385	0,026	0,06	*
Tasa excreción 20 psu – 15 °C (µg NH ₄ -N h ⁻¹)	10,532	0,502	0,005	NS
Tasa excreción 25 psu – 15 °C (µg NH ₄ -N h ⁻¹)	22,371	1,035	0,01	NS
Tasa excreción 30 psu – 20 °C (µg NH ₄ -N h ⁻¹)	49,488	3,532	0,016	NS
Peso seco (g)	0,167	0,005	0,013	NS

La relación entre el peso seco y la HML se encontró una pendiente positiva no significativamente distinta de cero (Fig. 12). En la tasa de excreción tampoco se observó una correlación significativa (Fig. 13 tabla 5), observándose una pendiente

positiva ($P < 0.05$) en el tratamiento a 30 psu -20 °C. En la tasa de consumo de oxígeno se vio una pendiente positiva y significativa ($P = 0.02$) en el ensayo a 30 psu y 20 °C (Fig. 15). En los demás tratamientos se observó una relación positiva pero no significativa.

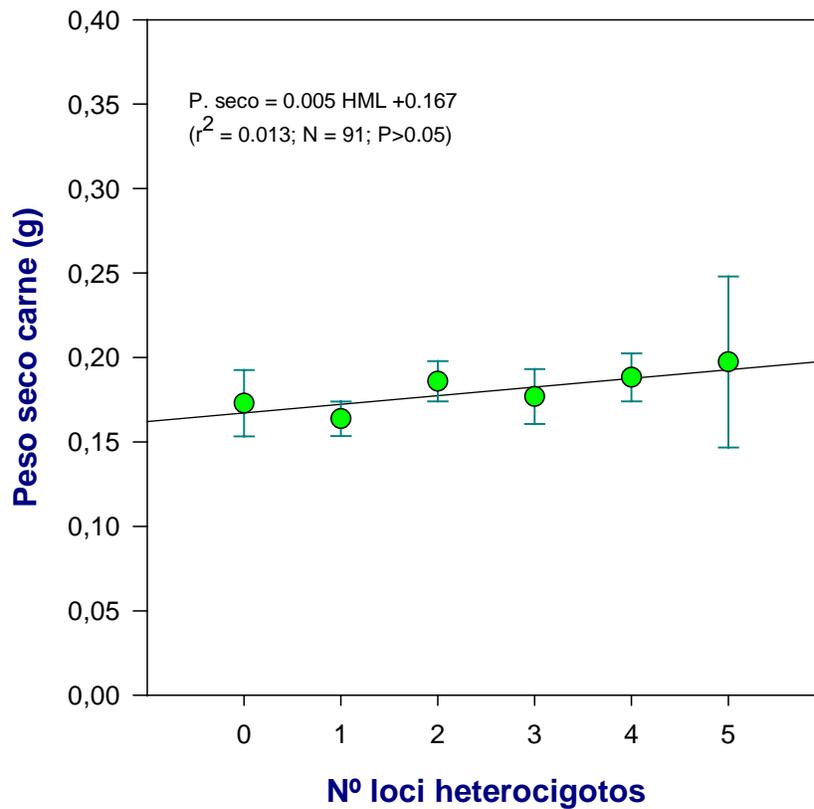


Figura 12. *Mytilus chilensis*. Regresión entre el Peso Seco (g) y la heterocigosidad multi locus (HML). Las líneas verticales corresponden al error estándar.

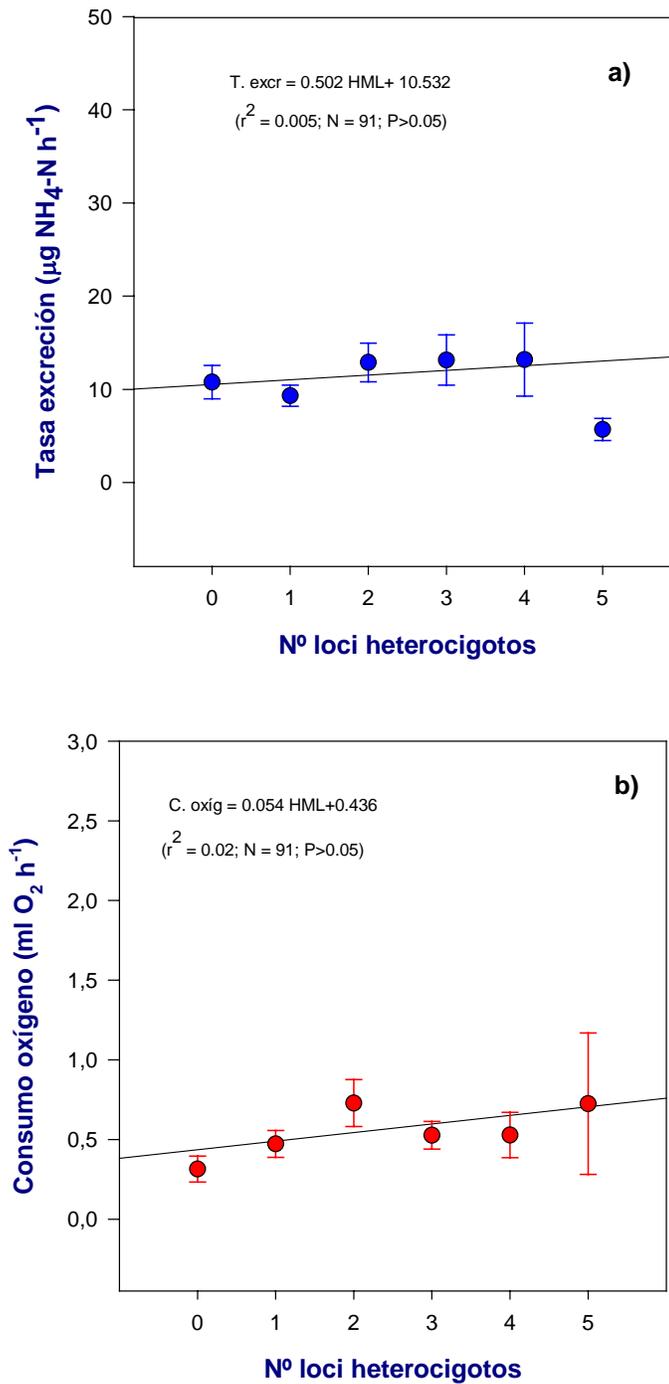


Figura 13. *Mytilus chilensis*. Regresión entre las variables fisiológicas (20 psu y 15 °C) y la heterocigosidad multi locus (HML). a) tasa de excreción ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$), b) consumo de oxígeno ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$). Las líneas verticales corresponden al error estándar.

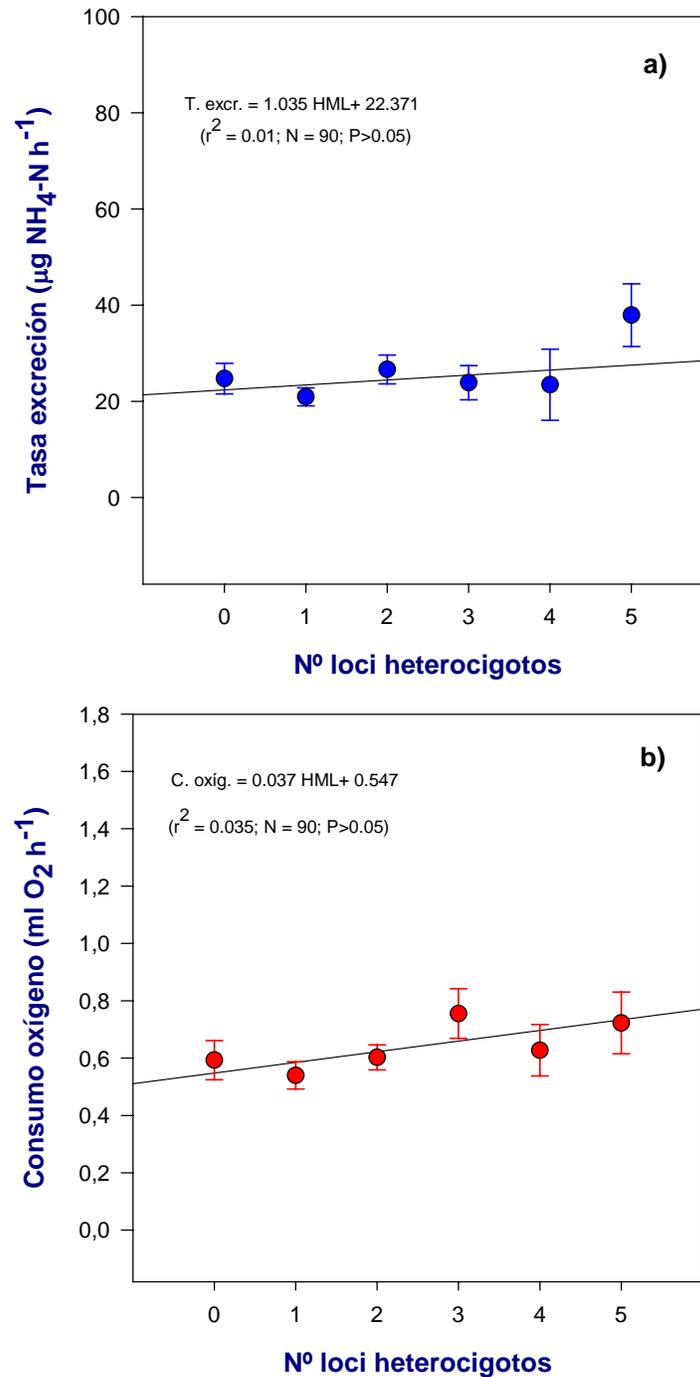


Figura 14. *Mytilus chilensis*. Regresión entre las variables fisiológicas (25 psu y 15 °C) y la heterocigosidad multi locus (HML). a) tasa de excreción ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$), b) consumo de oxígeno ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$). Las líneas verticales corresponden al error estándar.

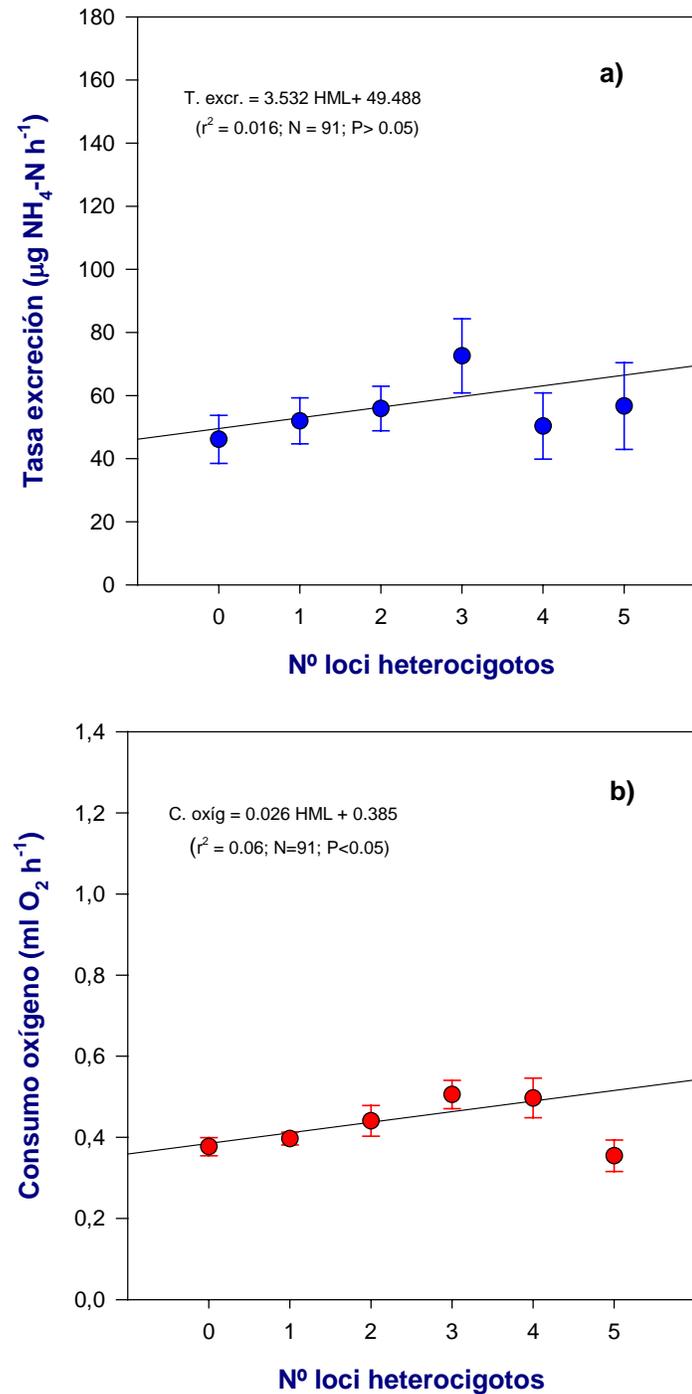


Figura 15. *Mytilus chilensis*. Regresión entre las variables fisiológicas (30 psu y 20 °C) y la heterocigosidad multi locus (HML). a) tasa de excreción ($\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$), b) consumo de oxígeno ($\text{ml O}_2 \text{ h}^{-1}$). Las líneas verticales corresponden al error estándar.

5. DISCUSIÓN

En relación con el análisis electroforético, es necesario destacar la alta variabilidad genética observada en la cohorte, el valor de polimorfismo (62.5%) fue alto comparado con el obtenido por Toro et al., (2006) con un valor de 40.8% para la misma especie. Ello podría deberse al menor número de loci analizados inicialmente en este estudio. La heterocigosidad promedio de la población con un valor de 0.399 fue similar a la observada en el trabajo de Toro et al., (2006) donde se observó un promedio $H_o = 0.342$ para los 5 loci analizados. En cuanto a la deficiencia de heterocigotos en el presente estudio se observó un D promedio igual a -0.436 lo que es mayor a lo reportado en trabajo antes mencionado, en el que obtuvo valor $D = -0.24$ para igual cantidad de loci analizados en choritos de la localidad de Yaldad ($N = 148$). Esta deficiencia de heterocigotos es una observación común en la literatura de bivalvos, la cual ha sido reportada por Toro et al., (1995 b), Toro y Vergara, (1998).

La desviación a lo esperado de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg, es algo que se ha reportado en moluscos bivalvos, este fenómeno se ha observado en poblaciones silvestres de *Mytilus edulis* (Gosling y McGrath, 1990), *Ostrea chilensis* (Toro y Vergara, 1995 c), *Crassostrea virginica* (Zouros et al., 1980). En el presente estudio todos los loci se desviaron significativamente de lo esperado según el equilibrio de Hardy-Weinberg. Ante esto se han planteado diversas hipótesis que explicarían el hecho de esta carencia de individuos heterocigotos. Es así, que entre las causas probables está la existencia de una selección a individuos heterocigotos, por endogamia o efecto Wahlund (Toro et al., 1995 b y c; Hansson y Westerberg, 2002). En ostras la

explicación más probable es que existiría una selección a través de una mortalidad diferencial entre homocigotos y heterocigotos en estadios tempranos, lo que causa una deficiencia de heterocigotos en la etapa adulta (Toro et al., 1995 b). Las hipótesis que involucran procesos selectivos son las explicaciones más acertadas para moluscos bivalvos, ya que por sus desoves masivos, fertilización externa y dispersión larval sería descartable la endogamia y el efecto Wahlund.

Existe en la literatura científica una considerable cantidad de estudios en moluscos bivalvos que abordan el tema tan controversial de si existe o no una relación positiva entre la HML y ciertos parámetros de aptitud biológica como son el crecimiento y la reproducción. Correlaciones positivas han sido observadas pero no se presentan en forma generalizada. Es así, que se ha observado correlación positiva entre la tasa de crecimiento y la HML en *Mytilus edulis* (Koehn y Gaffney, 1984), *Mulinia lateralis* (Koehn et al., 1988), *Ostrea chilensis* (Toro et al., 1996; Toro y Vergara, 1998) entre otros.

Una mayor eficiencia metabólica se reflejaría en mayores tasas de crecimiento, esperándose una relación entre el grado de HML y la fisiología energética que influye en la tasa de crecimiento. El incremento de la eficiencia metabólica puede deberse a una reducción de costos o bien a un incremento de la absorción de energía (Toro et al., 1996). Esta relación podría verse enmascarada por la edad ó madurez reproductiva en que se encuentre el individuo. Debido a ello se han llevado a cabo estudios de laboratorio a fin de evaluar el efecto de variables como la salinidad, temperatura y concentración de alimento sobre el balance energético, determinando las ganancias y pérdidas de energía en especies de moluscos bivalvos (Navarro, 1988; Hutchinson y Hawkins, 1992). En el presente trabajo se midieron las variables fisiológicas en

individuos adultos de una misma cohorte de *M. chilensis*, a fin de establecer su relación con el grado de HML y el tamaño corporal observado. Trabajos sobre fisiología energética en *M. chilensis* son escasos en la literatura y se limitan a los resultados reportados por Navarro (1983), en el cual el genotipo del individuo no se consideró tomándose entonces como un factor constante, pero se debe destacar que una cohorte compuesta por diferentes grupos etarios y diferentes genotipos, pueden expresar capacidades fisiológicas diferenciales.

En el presente estudio la tasa de excreción no presentó una relación significativa ($P > 0.05$) con el tamaño corporal en dos de los ensayos realizados, aunque la pendiente de la regresión, en ambos casos fue positiva, solo en el ensayo realizado a 20 °C y 30 psu, correspondiente a una de las condiciones de estrés, la relación fue negativa ($r^2 = 0.01$; $P > 0.05$) Tabla 1, Fig. 11. Aquellos individuos de mayor tamaño, presentaron una menor tasa de excreción bajo condiciones de estrés. Sin embargo, este ensayo fue donde se registraron los mayores niveles de excreción con un promedio de 41.872 $\mu\text{g NH}_4\text{-N h}^{-1}$ lo que podría ser reflejo de lo que señala Navarro (1988), en relación a que esta especie en períodos donde se ve reducida la ingestión de alimento, movilizan proteínas como sustrato metabólico principal, produciendo altas tasas de excreción. Se pudo observar un incremento de esta tasa con la temperatura y salinidad, al igual que lo observado por Hutchinson y Hawkins (1992), aunque la mayor influencia, en este caso fue de la temperatura. Los coeficientes de correlación para esta tasa, fueron menores a los reportados para la misma especie Navarro (1983), donde se reportó un valor de $r = 0.99$, pero utilizando un menor número de individuos ($N=24$) y un rango de tamaño más amplio. En cuanto al valor del intercepto estuvo por sobre y bajo la media

observada, y los valores del coeficiente de regresión b se encuentran muy por encima de lo obtenido en dicho estudio, lo que pudo deberse a las diferencias de temperaturas en las que se realizaron las mediciones.

El consumo de oxígeno mostró una tendencia a incrementar con el aumento del tamaño corporal, aunque la relación no fue significativa ($P > 0.05$); Tabla 1, Fig. 9 y 11; exceptuando en el ensayo de 30 psu y 20 °C donde fue significativa la tendencia positiva, pudiendo deberse a la situación de estrés en que se encontraban los individuos; a diferencia del ensayo a 25 psu y 15 °C donde se mostró independiente del tamaño corporal del individuo, Fig. 10. Se observó una leve disminución del consumo de oxígeno a medida que aumentaba la salinidad, no detectándose un aumento a medida que se incrementó la temperatura, lo cual era esperado y observado en otros trabajos como el de *Ostrea edulis* de Hutchinson y Hawkins, (1992) en donde la tasa respiratoria tendió a aumentar con la temperatura, en forma independiente de la salinidad en la cual se realizó el ensayo. No obstante, la reducción de consumo de oxígeno podría ser causada por el cierre de las valvas ante un aumento de salinidad, por sobre el promedio de su hábitat, deteniéndose la corriente alimentaria y la irrigación de oxígeno a las branquias. Las pendientes de la tasa de consumo de oxígeno fueron menores, para condiciones experimentales similares (metabolismo estándar + proceso de digestión) reportados por Navarro (1983), lo que puede ser explicado debido a las diferencias de temperaturas utilizadas (12 °C a 15 ó 20 °C), siendo ésta variable la que afecta la respuesta respiratoria en bivalvos y la salinidad, mostrándose casi independiente del tamaño corporal.

En la mayoría de los tratamientos las variables fisiológicas se correlacionaron positivamente con el peso seco aunque no en forma significativa ($P > 0.05$). También se observó pendientes positivas entre el tamaño corporal, las variables fisiológicas y la heterocigosidad multi locus (HML), pese a que no fueron significativas. Es así, que en la relación peso seco y HML la pendiente fue positiva ($P > 0.05$), lo cual es lo esperado aún cuando ésta no fue significativa, indicando que los individuos de mayor peso corresponderían a aquellos con mayor grado de HML (Fig. 12). Lo anterior nos permite especular que la mayor eficiencia metabólica de los individuos más heterocigotos, se traduce en la obtención de mayor tamaño corporal. En el consumo de oxígeno se registró una correlación positiva y significativa en el ensayo de 30 psu - 20 °C, sin embargo, en todas las regresiones de las variables fisiológicas estandarizadas sobre la heterocigosidad multi locus, se vieron bajos valores de los coeficientes de determinación (r^2).

La tendencia general fue que los individuos de mayor peso presentaron tasas fisiológicas comparativamente superiores, aunque no significativamente distintas. Ello podría deberse a la poca dispersión de tamaño corporal de los individuos estudiados, lo cual no permitió observar de manera más notoria como el efecto peso corporal determina la variación de los parámetros fisiológicos que componen las pérdidas energéticas tomando en cuenta que se analizó sola una cohorte. Otra consideración se refiere a la existencia de esta correlación, debido a la hipótesis de efecto directo (sobredominancia), la que en estudios alozímicos estaría regulando la existencia o no de correlación entre fitness y HML, la sobredominancia confiere ventaja al individuo heterocigoto por sobre el homocigoto (Mitton, 1997).

La componente que domina consumo de energía para el alcance del crecimiento está dado por el gasto del consumo de oxígeno. Esta variable puede verse afectada por aumentos de temperatura o bajas de salinidad (Hutchinson y Hawkins, 1992), le sigue la variable tasa de excreción, siendo estas dos tasas fisiológicas las que influirían directamente en el balance energético y por ende en la energía que queda disponible para el crecimiento. La tasa de consumo de oxígeno y de excreción, han sido generalmente correlacionadas negativamente con la HML (Koehn, 1982 en *C. virginica*; Diehl, 1986, Diehl et al., 1985 en *M. edulis*; Toro, 1996 en *Ostrea chilensis*) pero no obstante, al realizar el balance de energía se ha encontrado en estos trabajos una correlación positiva entre crecimiento y HML, la cual se propone, es un producto de una mayor eficiencia energética, de un costo metabólico inferior en los individuos heterocigotos.

De este modo el presente estudio se suma a otros reportes en los que no se ha encontrado asociaciones positivas entre la heterocigosidad multi locus y la fisiología energética de invertebrados marinos; aún cuando las asociaciones no resultaron ser significativas, la ausencia de relación puede deberse a la edad de los individuos experimentales, ya que es sabido que en individuos adultos la energía es destinada para reproducción y no para crecimiento como ocurre en juveniles; pero igual debe tomarse en cuenta la poca dispersión de los tamaños corporales de los individuos analizados y que se estudió solo una cohorte.

5.1 Conclusiones

- ❖ La alta variabilidad genética observada para *Mytilus chilensis* sugiere que estas poblaciones presentan un gran potencial para adaptarse genéticamente al cambio ambiental, lo que se explica porque habitan en ambientes muy inestables.
- ❖ La heterocigosidad estimada se encuentra dentro del rango descrito para bivalvos marinos. Aunque se encontró un déficit de heterocigotos, que se aleja de lo esperado de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg, que podría estar siendo producido por una selección contra los heterocigotos.
- ❖ Las Tasas fisiológicas aumentaron con el tamaño del individuo, no encontrándose una relación positiva entre heterocigosidad y crecimiento; por lo que el grado de heterocigosidad multi locus (HML) no estaría incidiendo sobre el balance energético y por consiguiente no estaría afectando la tasa de crecimiento, salvo bajo condiciones de estrés extremas.
- ❖ La tasa de excreción aumentó sus valores junto con el incremento de la salinidad, al contrario el consumo de oxígeno aumentó a medida que la salinidad decrecía. Mientras bajo condiciones estresantes el consumo de oxígeno en relación al tamaño corporal y al grado de heterocigosidad evidencia una sobredominancia de individuos heterocigotos por sobre los homocigotos,

revelando las diferencias potenciales entre estos, las que se ven acentuadas por el estrés ambiental.

- ❖ La correlación entre heterocigosidad y tamaño corporal podría depender de la etapa de vida del individuo, si está maduro o no sexualmente determina los requerimientos energéticos, por lo que podría perderse con la edad la correlación, por lo que no se habría encontrado en el presente estudio debido a que se trabajó con individuos adultos.

- ❖ La poca dispersión del tamaño corporal de los individuos analizados igual habría influido en la ausencia de relación ya que podría enmascarar el efecto del peso corporal por sobre las variables fisiológicas y por haber estudiado sólo una cohorte.

6. LITERATURA CITADA

- Adamkewickz, L., Tabú, S.R. and Wall, J.R. (1984). Genetics of the clam *Mercenaria mercenaria*. II. Size and genotype. *Malacología*, 25:525-533.
- Bahamondes-Rojas, I. and Muñoz, J.E. (1998). Manual cultivo mitílicos. Valdivia. UACH.16pp.
- Barton, J. R. (1997). Environment, sustainability and regulation in commercial aquaculture: The case of Chilean salmonid production. *Geoforum*, 28:313-328.
- Bautista, C. (1989). Moluscos tecnología de Cultivo. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 167 pp.
- Bayne, B.L. and Newell, R.C. (1983). Physiological energetics of marine molluscs. In: A.S.M. Saleuddin and K.M. Wilbur (Eds.), *The mollusca*. University Press, New York, N.Y., pp. 407-515.
- Beaumont, A.R., Beveridge, C.M. and Budd, M.D. (1983). Selection and heterozygosity within single families of the mussel, *Mytilus edulis* (L). *Mar. Biol. Letters*, 4:151-161.
- Beaumont, A.R. and Toro, J.E. (1996). Allozyme genetics of *Mytilus edulis* subjected to cooper and nutritive stress. *J. Mar. Biol. Ass. U.k.* 76:1061-1071.
- Beaumont, A. R. and Hoare, K. (2003) *Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture*. Oxford. Blackwell Science Ltda. 170 pp.
- Chaparro, O.R. and Thompson, R.J. (1998). Physiological energetics of brooding in Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 171:151-163.

- Clasing, E., Oñate, A. y Arraigada, H. (1998). Cultivo de choritos en Chile. Valdivia. UACH. 36 pp.
- Diehl, W.J., Gaffney, P.M., McDonald, J.H. and Koehn, R.K. (1985). Relationship between weight-standardized oxygen consumption and multiple-locus heterozygosity in the mussel, *Mytilus edulis*. Proceedings of the 19th European Marine Biology Symposium, pp. 529-534.
- Diehl, W.J., Gaffney, P.M., Koehn, R.K. (1986). Physiological and genetic aspects of growth in the mussel I. Oxygen consumption, growth, and weight loss. *Physiological zoology*, vol. 59,2:201-211.
- FAO (1999) Anuario estadístico de pesca. Producción de acuicultura. Vol 88/2, 178 pp
- FAO (2000) Anuario estadístico de pesca. Producción de acuicultura. Vol 90/2, 178 pp
- FAO (2001) Anuario estadístico de pesca. Producción de acuicultura. Vol 92/2, 186 pp
- Garton, D.W., Koehn, R.K. and Scott, T.M. (1984). Multiple-locus heterozygosity and physiological energetics of growth in the coot clam, *Mulinia lateralis*, from a natural population. *Genetics*, 108: 445-455.
- Gentili, M.R. and Beaumont, A.R. (1988). Environmental stress, heterozygosity, and growth rate in *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 120: 145-153.
- Gosling, E.M. and McGrath, D. (1990). Genetic variability in exposed-shore mussels, *Mytilus* spp. along an environmental gradient. *Mar. Biol.*, 104:413-418.
- Guillard, R.M. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En Smith W.L. and M.H Chanley (eds) Culture of Marine Invertebrate Animals: 29-60. Plenum Press, N.Y.

- Hansson, B. And Westerberg, L. † (2002). On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Mol. Ecol.*, 11: 2467-2474.
- Harris, H. and Hopkinson, D.A. (1978). Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. Amsterdam : North Holland.
- Hawkins, A.J.S. (1985). Relationship between the synthesis and breakdown of protein, dietary absorption and turnovers of nitrogen and carbon in the blue mussels, *Mytilus edulis* L. *Oceanología*, 66:42-49.
- Hawkins, A. J. S., Bayne, B. L. and Day, A. J. (1986). Protein turnover, physiological energetics and heterozygosity in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the basis of variable age-specific growth. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.*, 229:161-176.
- Hutchinson, S. and Hawkins, L. E. (1992) Quantification of the physiological responses of the european flat oyster *Ostrea edulis* L. to temperature and salinity. *J. Moll. Stud.*, 58:215-226.
- Klimant, I., Meyer, V. and Kuhl, M. (1995). Fiberoptic oxygen microsensors, a new tool in aquatic biology. *Limnol. Oceanogr.*, 40: 1159-1165.
- Koehn, R.K and Gaffney, P.M. (1984). Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 82: 1-7.
- Koehn, R.K., Diehl, W.J and Scott, T.M. (1988). The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozygosity and growth rate in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics*, 118:121-130.

- Koehn, R.K and Shumway, S.E. (1982). A genetic/physiological explanation for differential growth rate among individuals of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Mar. Biol. Letters*, 3:35-42.
- Lancelloti, D.A. and Vásquez, J.A. (2000). Zoogeografía de macroinvertebrados bentónicos de la costa de Chile: contribución para la conservación marina. *Rev. Ch. Hist. Nat.*, 73:99-129.
- Mitton, J.B. and Pierce, B.A. (1982). Allozyme heterozygosity and growth in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *J. Heredity*, (4):250-3.
- Mitton, J.B. and Grant, M.C. (1984). Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Annual Reviews in Ecology and Systematics*, 15, 479–499.
- Mitton, J.B. (1993). Enzyme heterozygosity, metabolism, and developmental stability. *J. Genética*, 1:47-65.
- Mitton, J.B. (1997). Selection in Natural Populations. Oxford University Press, Oxford. 240 pp.
- Nash, C. E. (1988) A global overview of aquaculture production. *J. World. Aqua. Soc.*, 19:51-58.
- Navarro, J.M. 1983. Balance energético de *Mytilus chilensis* Hupé, (Bivalvia, Mytilidae) en base a experimentos de laboratorio. *Mems Assoc. Latinoam. Acuicult.*, 5 (2):175-187.
- Navarro, J.M. (1988). The effects of salinity on the physiological ecology of *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) (Bivalvia: Mytilidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 122: 19-33.

- Navarro, J.M. y Gutierrez, A. (1990) Cultivo de moluscos en America latina. Colombia, Bogotá, D. E. 20 pp.
- New, M. B. (1997). Aquaculture and the capture fisheries: balancing scales. *World aquaculture*, 28 (2) 11-30.
- Newkirk, G. F. (1980). Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalves. *Aquaculture*, 19:209-228.
- Newkirk, G. F. (1983) Applied breeding of commercially important mollusks: a summary of discussion. *Aquaculture*, 33: 415-422.
- Recart, H. (1993). Cultivos Marinos. Valdivia: UACH. Pág 117-129.
- Rodhouse, P.G. and Gaffney, P.M. (1984). Effect of heterozygosity on metabolism during starvation in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.*, 80: 179-187.
- Rodhouse, P. G. ; McDonald, J. H. ; Newell, R. I. E. and Koehn, R. K. (1986). Gamete production, somatic growth and multiple-locus enzyme heterozygosity in *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, vol 90 (2):209-214.
- Sanchez, V. (2002). Crece la industria mitilicultora. *Aquanoticias*, 75:8-14.
- SERNAPESCA. (2005) Anuario estadístico de pesca. Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, Chile. (http://www.sernapesca.cl/index.php?option=com_remository&Itemid=54&func=select&id=43).
- SERNAPESCA (2006) Anuario estadístico de pesca. Servicio nacional de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, Chile. 114 pp.
- Sokal, R.R and Rohlf, F.J. (1995). Biometry the principles and practice of statistic in Biological Research, 3rd edn. Freeman, New –York. 887 pp.

- Solórzano, L. (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypochlorite method. *Limnol. Oceanogr.*, 14:799-801.
- Soto, A. F. (1992). Estudios sobre crecimiento y desove en *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) en relación a variables ambientales del canal Caicaén, Calbuco. Tesis Facultad de Ciencias. Univ. Austral de Chile, 83 pp
- Toro, J. E. and Newkirk, G. F. (1990) Divergent selection for growth rate in the European oyster *Ostrea edulis*: response to selection and estimation of genetic parameters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 62:219-227.
- Toro, J. E., Sanhueza, M. A., Winter, J. E., Senn, C. M., Aguila, P. and Vergara, A. M. (1995) a). Environmental effects on the growth of the Chilean oyster *Ostrea chilensis* in five mariculture locations in the Chiloé Island, Southern Chile. *Aquaculture*, 136:153-164.
- Toro, J.E., Vergara, A.M. and Galleguillos R. (1995) b). Deficiencia de heterocigotos en una cohorte de *Ostrea chilensis* (Philippi, 1845). *Biología Pesquera*, 24:3-6.
- Toro, J.E. and Vergara, A.M. (1995) c). Evidence for selection Against Heterozygotes: Post-Settlement Excess of Allozyme Homozygosity in a Cohort of the Chilean Oyster, *Ostrea chilensis* Philippi, 1845. *Biol. Bull.*, 188:117-119.
- Toro, J.E., Vergara, A.M. and Galleguillos, R. (1996). Multiple-locus heterozygosity, physiology and growth at two different stages in the life cycle of the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Mar. Ecol. P.S.*, 134:151-158.
- Toro J.E. and Vergara, A.M. (1998). Growth and heterozygosity in a 12-month-old cohort of *Ostrea chilensis* (Philipi, 1845) obtained by mass spawning in the laboratory. *Mar. Ecol. PSZN.*, 19: 311-323.

- Toro, J. E., Alcapán, A.C., Ojeda, J.A. and Vergara, A.M. (2004). Selection response for growth rate (Shell height and live weight) in the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854). *J. Shell. Res.* In Press.
- Toro, J. E., Castro, G.C., Ojeda, J.A. and Vergara, A.M. (2006). Allozymic variation and differentiation in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis*, along its natural distribution. *Genetics and Molecular Biology*, 29,1:174-179
- Vergara, A.M., Toro, J.E. and Paschke, K.A. (1992). Relationship among physiological variables, heterozygosity and growth efficiency in *Tiostrea chilensis*, (Philipi 1845). *Rev. Biol. Mar. Valparaíso*, 27: 283-297.
- Weiss, R.F. (1970). The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. *Deep Sea Res.*, 17: 721-735.
- Winter, J. E., Toro, J. E., Valenzuela, G. S and Chaparro, O. R. (1984). Recent developments, status and prospects of molluscan aquaculture on the Pacific coast of South America. *Aquaculture*, 39:95-134
- Yeh, E.C., Yang, R.C. and Boyle, T. (1999). POPGENE Version 1.31. Microsoft Windows Based Freeware for Population Genetics Analysis (<http://www.ualberta.ca/~fyeh>). University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Alberta, Canada.
- Zouros, E., Singh, S.M. and Miles, H.E. (1980). An overdominant phenotype and its possible explanations. *Evolution*, 34:856-867.
- Zouros, E.(1987). On the relation between heterozygosity and heterosis: an evaluation of the evidence from marine mollusks. *Curr. Topic Biol. Med. Res.*, 15:255-270.

Zouros, E., Romero-Dorey, M. and Mallet, A.L. (1988). Heterozygosity and growth in marine bivalves: further data and possible explanations. *Evolution*, 42:1332-1341.