



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
SEDE PUERTO MONTT
ESCUELA DE ACUICULTURA Y PESQUERÍAS

Determinación de la estructura genética poblacional del chorito *Mytilus chilensis*, Hupé, 1854, desde bancos naturales distribuidos en la zona centro-sur y sur de Chile.

Tesis para Optar al Título de Ingeniero en Acuicultura

Profesor Patrocinante: Dr(a) Marcela Astoga Opazo

Escuela De Acuicultura y Pesquería

Sede Puerto Montt

MAURICIO ELEUTERIO BOZO BAHAMONDE

PUERTO MONTT-CHILE

2009

“En primer lugar agradezco a mis Padres y a mi hermano Felipe por su amor incondicional y por toda su confianza depositada en mí durante mi estadía en la Universidad.

A mi abuelo Eleuterio por cada sabio consejo que me ha entregado, siempre han sido muy importantes en decisiones que he tomado en mi vida

A mi abuela Guillermina la cual ha sido un ejemplo de vida a seguir, siempre sabiendo dar la cara a cada momento adverso que se le ha presentado.

A mi profesora patrocinante por su dedicación y paciencia al momento de ayudar a que este trabajo pudiese salir adelante.

A mis compañeros de carrera por todos los buenos momentos que se dieron durante estos años de Universidad muchas gracias por todo, aprendí a conocer excelentes personas.

A mis compañeros de laboratorio Jaime, Cynthia, Jonatan, Richard y Julio.

A mi novia por ser un gran apoyo durante estos 2 últimos años, haz sido un apoyo fundamental haciéndome crecer mucho como persona, pudiendo ver la vida desde otra perspectiva”.

INDICE DE CONTENIDO.

	Pág.
Índice de Tablas.....	I
Índice de Figuras.....	II
Resumen.....	IV
Abstract.....	V
1.- Introducción.....	1
2.- Hipótesis.....	5
3.- Objetivos.....	6
3.1.- Objetivos generales.....	6
3.2.- Objetivos específicos.....	6
4.- Materiales y Métodos.....	7
4.1.- Área de estudio.....	7
4.2.- Recolección de muestras.....	8
4.3.- Análisis Genético.....	8
4.3.1 Método de extracción de ADN.....	8
4.3.2 Método de Amplificación de microsátélites.....	11
4.3.3 Lectura de Microsátélites.....	12
4.3.4 Análisis Estadístico.....	12

5.-Resultados.....	13
5.1 Extracción de ADN.....	13
5.2 Amplificación de microsatélites.....	14
5.2.1 Amplificación microsatéliteMG1.....	14
5.2.2 Amplificación microsatélite MG6.....	15
5.2.3 Amplificación microsatélite MG3.....	16
5.3 Lectura de microsatélites.....	17
5.4 Análisis Estadístico.....	18
6.- Discusión.....	22
7.-Bibliografía.....	27
8.-Anexos.....	31

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1.- Reactivos utilizados para la reacción de PCR y concentraciones de las soluciones de trabajo a utilizar.....	11
Tabla 2.- Muestra el número de individuos analizados (n) y las frecuencias alelicas obtenidas para cada alelo dentro de su respectivo locus, además de presentar la heterocigosidad observada (Ho) y probabilidad de ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) para cada una de las localidades analizadas de <i>Mytilus chilensis</i>	19
Tabla 3.-Valores obtenidos del estadístico F para cada alelo dentro de los diferentes locus estudiados.....	20
Tabla 4.- Valores obtenidos del estadístico F por locus y la interacción de estos, además se pueden observar los valores de p para el test exacto de Fisher y su respectivo error estandar (E.E).....	20
Tabla 5.- Probabilidad entre pares de localidades por locus ocupando test exacto de diferenciación de poblaciones (Raymond and Rousset 1995), en donde se observa p y su respectivo error estandar (E.E).....	21

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1.- Localización de 3 poblaciones naturales de choritos (<i>Mytilus chilensis</i>) muestreadas en la costa del Centro Sur y Sur de Chile.....	7
Figura 2.- Fotografía de un gel de agarosa, mostrando el perfil de tinción del ADN extraído mediante el método fenol/ cloroformo de 12 muestras de <i>Mytilus chilensis</i> (posillo 1-12), para la localidad de Puerto Raúl Marín Balmaceda.....	13
Figura 3.- Fotografía de un gel de agarosa, mostrando la amplificación del ADN de 12 muestras de <i>Mytilus chilensis</i> (posillo 1-12) para el sector Puerto Raul Marin Balmaceda, con el partidor MG3.....	14
Figura 4.- Fotografía de un gel de agarosa, mostrando la amplificación del ADN de 12 muestras de <i>Mytilus chilensis</i> (posillo 1-12) para el sector de Chaihuin, con el partidor MG6.....	15
Figura 5.- Fotografía de un gel de agarosa, mostrando la amplificación del ADN de 12 muestras de <i>Mytilus chilensis</i> (posillo 1-12) para el sector de Rolecha, con el partidor MG1.....	16

Figura 6.- Muestra las capturas de imágenes mostrando los Peaks obtenidos para 1 muestra (CHA 3) con el software Peakscanner, con los 3 distintos marcadores utilizados en esta investigación en donde cada grafico corresponde a I) MG1, II) G3 y III) MG6.....17

RESUMEN

El progresivo aumento en la demanda y calidad de semillas de choritos *Mytilus chilensis*, para abastecer los centros de cultivo reafirma la necesidad de profundizar el conocimiento sobre los aspectos biológicos y ecológicos asociados al desarrollo de esta especie. El presente estudio tuvo por objetivo determinar la estructura genética poblacional del *Mytilus chilensis* para 3 poblaciones a través del análisis de microsatélites altamente variables, analizando 3 loci polimorficos de microsatélites (MG1, MG3 y MG6). Las muestras fueron obtenidas desde Chaihuin, Rolecha y Puerto Raúl Marín Balmaceda. A estas muestras se les realizó extracción de ADN con el método fenol/Cloroformo, amplificación del ADN mediante PCR, lectura de los microsatélites y su posterior análisis estadístico por medio de softwares especializados para este tipo de análisis. A partir de los resultados obtenidos se pudo observar una alta heterocigosidad para los marcadores MG1 y MG6, no sucediendo lo mismo con MG3. Además se pudo ver que cada población analizada de la costa sur y centro sur de Chile se esta comportando de manera independiente, mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$) ya sea en la comparación total como entre pares de localidades. La alta estructuración genética observada para cada población se podría deber a diversos procesos que pudieran estar ocurriendo en esta especie ya sean mutaciones, barreras geográficas, baja tasa migración, entre otros.

ABSTRACT

The gradual increase in demand and quality of mussel (*Mytilus chilensis*) seed in order to supply the mussel farms reaffirms the need to deepen the knowledge about the biological and ecological aspects associated with the development of this species. This study aimed to determine the population genetic structure of *M. chilensis* for 3 populations through the analysis of highly variable microsatellites (MG1, MG3 and MG6). Samples were obtained from Chaihuin, Rolecha and Puerto Raúl Marín Balmaceda. DNA extraction method with phenol / Chloroform, DNA amplification by PCR, reading of the microsatelitelis and subsequent statistical analysis by specialized software were carried out. Based on the results there is a high heterozygosity for markers MG1 and MG6, but not for MG3. In addition each population analyzed in the south east and south-central Chile is behaving independently, showing significant differences ($p < 0.05$) in either the total comparison and between pairs of locations. The high genetic structuring observed for each population could be due to various processes that may be occurring in this species, like mutations, geographic barriers, low migration, among others.

INTRODUCCION

La especie de choritos *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) se distribuye desde Iquique hasta Tierra del Fuego, por el Océano Pacífico, y continúa por la costa Atlántica en Argentina, hasta el norte de Brasil (Santa Cruz y Lozada, 1979). Los choritos presentan gran resistencia a los cambios climáticos ambientales, cuyas poblaciones se extienden desde la zona intermareal hasta los 10 metros de profundidad, formando bancos naturales. Las poblaciones existentes en la zona intermareal del Sur de Chile, se pueden ver expuestas a temperaturas atmosféricas de 28° C en verano y hasta -10° C en invierno. La tolerancia que presenta la especie a los cambios de salinidad es amplia y fluctúa entre 4 y 32 ‰. Esto le permite habitar en las zonas de los archipiélagos, donde existen grandes fluctuaciones de salinidad que varían con la profundidad y las estaciones del año (Pacheco *et al.* 2000).

Estudios han demostrado que *M. chilensis* es una especie gonocórica; los machos exhiben una gónada de color crema amarillenta, mientras que en las hembras la gónada es de color crema-anaranjado (Osorio, 1979). Excepcionalmente se encuentran ejemplares hermafroditas que presentan gónadas con ambos colores en áreas separadas (Lozada, 1967). Al alcanzar la madurez sexual se produce el desove, favorecido por cambios de temperatura y salinidad, por lo que en pocos días la mayor parte de la población elimina sus gametos (Bautista, 1988). Esta especie al igual que otros bivalvos, presenta fecundación externa (Chipperfield, 1953). Posteriormente se forma la larva trocófora de vida breve, que da paso a la larva veliger, de vida planctónica (Bautista, 1988). La fijación tiene lugar cuando la larva (próxima a metamorfosearse y convertirse en juvenil), encuentra un sustrato adecuado para adherirse al fondo, pierde el velo, y

se produce una reestructuración general de todos los órganos (Gilbert, 1991). El pie le ayuda a desplazarse para buscar sustratos; al encontrarlo se fija y metamorfosea y adquiere el aspecto externo de un adulto, y recibe el nombre de pre-semilla, a partir de aquí solamente se dedica a crecer hasta alcanzar su talla comercial.

En Chile, en lo que respecta al cultivo de esta especie, el desarrollo de la actividad mitilicultora ha estado determinada desde sus inicios por el abastecimiento de semillas provenientes del medio natural. A pesar de la importancia de la actividad de la captación de semillas, existen pocos estudios enfocados a comprender la dinámica de la distribución temporal y espacial de larvas e individuos asentados en los sitios utilizados por los cultivadores como lugares de captación.

De acuerdo a estudios realizados sobre la evolución y proyecciones de la mitilicultura en Chile (Plaza *et al.* 2005) esta actividad debería continuar expandiéndose en los próximos años para pasar de las 75.000 a las 175.000 ton. de desembarque anual. Para el año 2008 el volumen de desembarque anual para *Mytilus chilensis* fue de 187.540 toneladas (Sernapesca, 2008).

El progresivo aumento en la demanda de semillas para abastecer los centros de cultivo reafirma la necesidad de profundizar el conocimiento sobre los aspectos biológicos y ecológicos asociados al desarrollo de esta especie.

Una de las ramas apropiadas para el estudio de poblaciones es la genética de poblaciones, cuya problemática es describir la variación y distribución biológica, con el objeto de dar explicación a fenómenos evolutivos. Para ello, define a una población como un grupo de individuos de la misma especie que están aislados reproductivamente de otros grupos afines. Estas poblaciones, están sujetas a cambios evolutivos en los que subyacen cambios genéticos, los que a su vez están influenciados por factores como la selección natural y la deriva genética que actúan principalmente disminuyendo la variabilidad de las poblaciones, o migración y mutación que actúan aumentándola.

Hasta el momento en Chile existen sólo unos pocos estudios sobre genética de poblaciones de organismos marinos de importancia comercial, algunos de estos estudios han sido realizados por Astorga y Ortiz (2006), Gomez-Uchida et al. (2003), Pickerell *et al.* (2004). Algo similar ocurre para el chorito *Mytilus chilensis* donde se encuentran sólo dos trabajos en relación a la genética de poblaciones de esta especie (Toro *et al.* 2004; Toro *et al.* 2006). Es por ello que se hace necesario comenzar estudios en este ámbito con el fin de obtener información sobre variabilidad genética, diferenciación genética, niveles de flujo génico entre poblaciones, entre otros, utilizando marcadores moleculares altamente variables (microsatélites) en organismos marinos de importancia económica.

En lo que respecta a *Mytilus chilensis* (Hupe, 1854), el primer estudio genético de esta especie fue realizado por Toro y Sastre (1995) el cual consistió en la manipulación cromosómica, en donde se obtuvieron individuos triploides usando shock térmico post fecundación. Estudios más reciente sobre caracterización genética poblacional de *Mytilus chilensis* han sido realizados

por Toro *et al.* 2004, en donde estudió la estructura genética a lo largo de la costa chilena utilizando marcadores moleculares RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), para lo cual analizó ocho poblaciones naturales (1900 km) desde Arauco (VIII Región) a Punta Arenas (XII Región). Los resultados mostraron que los valores de distancia genética entre poblaciones fueron pequeños a pesar de la gran separación geográfica, la población de Punta Arenas fue genéticamente diferente a las otras, aunque a una escala pequeña. Posteriormente, Toro *et al.* 2006, a partir de las frecuencias alométricas de los loci Pgm, Gpi, Icd, Me, Gsr, Lap y Pep, encontró resultados similares. A pesar de las grandes distancias geográficas, los valores de distancia genética, y la variación genética estandarizada entre poblaciones, fueron pequeños. Los niveles de flujo génico encontrados en este estudio previenen el efecto de diferenciación entre poblaciones por deriva génica.

En esta presente tesis se plantea determinar la estructura genética poblacional del chorito (*Mytilus chilensis*) desde la zona centro sur y sur de Chile, similar al rango analizado por Toro *et al.* (2004, 2006), mediante la utilización de marcadores moleculares de alta variabilidad, los cuales corresponden a microsatélites, los que han llegado a ser considerados como los mas adecuados para estudios poblacionales.

HIPOTESIS

Basado en los resultados previos obtenidos para *Mytilus chilensis* en la costa chilena (Toro *et al.* 2004, 2006) se plantean las siguientes hipótesis:

H0: La especie *Mytilus chilensis* conformará una única población mendeliana con alta migración entre las diferentes localidades, en base al análisis de los bancos naturales de la zona centro-sur y sur de Chile.

H1: Debido al uso de marcadores de alta resolución (microsatélites) se establecerán diferencias poblacionales entre las localidades analizadas en la zona centro-sur y sur de Chile.

OBJETIVOS

.-Objetivo general.

Determinar la estructura genética poblacional del chorito (*Mytilus chilensis*) en la costa centro sur y sur de Chile a través del análisis de microsatélites de ADN.

.-Objetivos específicos.

Estimar los indicadores de variabilidad genética del chorito *Mytilus chilensis*, en cada una de las localidades analizadas de la zona centro-sur y sur de Chile.

Determinar el grado de diferenciación genética del chorito *Mytilus chilensis* entre las diferentes localidades analizadas de la zona centro-sur y sur de Chile.

Establecer el grado de conectividad genética entre bancos naturales del chorito *Mytilus chilensis*, en base a estimadores de flujo génico y niveles de migración entre las diferentes localidades analizadas de la zona centro-sur y sur de Chile.

MATERIALES Y METODOS.

AREA DE ESTUDIO

Se realizaron muestreos en la Costa del centro sur y sur de Chile, donde la abundancia de esta especie presenta los mayores valores, para esto se obtuvieron muestras desde la localidad de Chaihuín ($39^{\circ}54'50.84''S$) ($73^{\circ}33'05.40''O$), Rolecha ($41^{\circ}54'25.84''S$) ($72^{\circ}52'34.05''O$) y Puerto Raúl Marín Balmaceda ($43^{\circ}46'11.64''S$) ($72^{\circ}59'08.90''O$) (Fig. 1).

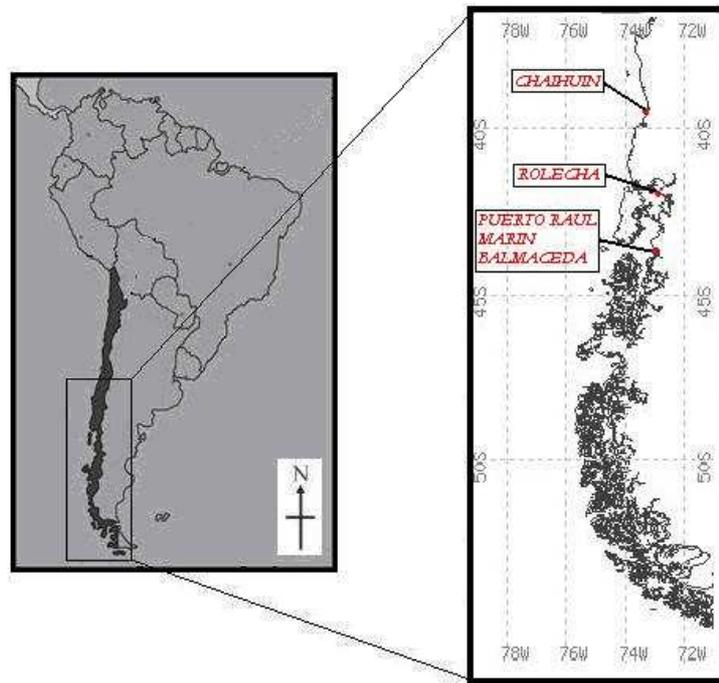


Figura 1.- Localización de 3 poblaciones naturales de choritos (*Mytilus chilensis*) muestreadas en la costa del Centro Sur y Sur de Chile.

RECOLECCION DE MUESTRAS

Las muestras fueron recolectadas al azar por medio de dragas y/o buceo desde los bancos naturales en los 3 diferentes sectores a estudiar. El número de ejemplares adultos de chorito (*Mytilus chilensis*) a muestrear fue de 30-40 individuos en cada una de las localidades.

ANALISIS GENETICO

.- Método de extracción de ADN.

La Extracción del ADN se realizó desde el manto del chorito siguiendo el método estándar fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitación con etanol (Doyle & Doyle 1987), el cual se describe a continuación:

De la fracción extraída desde manto de aproximadamente 100 gr., las muestras se introdujeron individualmente en tubos eppendorf de 1,5 ml., los cuales deben estar previamente esterilizados. Las muestras dentro de los tubos fueron maceradas minuciosamente hasta conseguir una sustancia uniforme. A cada uno de los tubos se les agregó 300 µl de buffer de lisis, lo cual permite liberar el ADN del interior de la célula, para esto se utilizaron buffers de extracción los que contienen:

- 1) Detergentes, como sodio dodecilo sulfato (SDS) a una concentración final del 1%.
- 2) Una molécula quelante (p. ej. EDTA, ácido etileno amino tetra acético, 50 mM) .

- 3) Sales (p.ej. cloruro de sodio, NaCl 20mM).
- 4) Tris-HCl 20 mM con pH entre 7.5 y 8.2.
- 5) Proteínasa K (concentración 5 μ l).

Las muestras deben ser agitadas unos segundos en vortex para ser incubadas en un termorregulador a 45° C por 24 hrs. A cada muestra se les agregó 150 μ l de NaCl a 5M, agitando fuertemente por dos minutos y luego se centrifugó (5 minutos a 12000 rpm), se recuperó el sobrenadante para traspasarlo a tubos limpios, para luego volver a agregar 150 μ l de NaCl 5M, nuevamente se debe agitar para luego centrifugar (5 minutos a 12000 rpm). Se extrajo y transfirió el sobrenadante (500 μ l) a un tubo limpio, en donde se le agregó 40 μ l de NaCl 2M y 2 volúmenes (1000 μ l) de etanol puro a cada uno de los tubos, se centrifugó (10 min a 12000 rpm) y resuspendió con 300 μ l de agua esterilizada.

Posteriormente se agregó 300 μ l de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), en donde se agita fuertemente por 30 min, esto es necesario para eliminar proteínas tales como nucleasas; luego se procede a centrifugar por 5 minutos a 8000 rpm, luego se recupera el sobrenadante con cuidado, para así evitar acarrear proteínas que quedan en la interfase, se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio y se agrega un volumen (300 μ l aprox.) de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agita fuertemente por 10 min., se centrifugó (8000 rpm por 5 min.) para recuperar el sobrenadante y luego se transfiere a tubos limpios.

Concluido el paso anterior se realizó la precipitación del ADN, para lo cual se debe añadir 2 volúmenes de etanol puro (600 μ l) y luego mezclar. El alcohol en la solución de precipitación se utiliza para remover las concentraciones residuales de sales y promover la precipitación del ácido nucleico, la precipitación del ADN es casi inmediata en presencia de alcohol, sin embargo se debe incubar las muestras por 10 min. a -20° C. Subsiguientemente, se centrifugan las muestras (12000 rpm por 12 min), se elimina el sobrenadante y se lava el pellet en alcohol al 70 % (750 μ l) con el fin de retirar todas las sales que permanezcan en la solución. Las muestras nuevamente se vuelven a centrifugar, se elimina el etanol y se deja secar el ADN en estufa a 45° C por 5 min. o hasta que no existan más trazas de alcohol, se resuspende el pellet con 100 μ l de H_2O y se disuelve, el resultado a obtener es ADN concentrado.

Finalizada la etapa de extracción de ADN se realizó la electroforésis, en donde se tomaron 5 μ l de la mezcla extraída con una micropipeta a la cual se le agrego 0,5 μ l de solución de siembra, la mezcla fue introducida en los pocillos de un gel de agarosa sumergidos de 0,8%, efectuándose la separación electroforética con una diferencia de voltaje de 73-84 volt por unos 30 minutos, todo esto es realizado en TAE a un 50%.

Para finalizar se sumergió el gel en una solución con sbyr-safe (4 μ l) por unos 20 min., conseguida la fluorescencia, se observó en un transluminador para registrar los resultados en una fotografía por medio de una cámara digital.

.- Método de Amplificación de microsatélites.

Se comenzó con la preparación de los reactivos que actúan en conjunto en el proceso de amplificación por PCR, en donde se debe considerar lo siguiente:

Tabla 1.- Reactivos utilizados para la reacción de PCR y concentraciones de las soluciones de trabajo a utilizar.

	Solución Trabajo	Solución Final	Volumen (ml)
Buffer PCR	10 X	1 X	1,5
MgCl₂	50 mM	1,8 μ M	0,54
dNTPs	2,5 mM	200 μ M	1,2
Partidor (F)	10 μ M	0,2 mM	2
Partidor (R)	10 μ M	0,2 mM	2
Taq. Pol.	5 μ / μ M	1 U	0,2
H₂O	--	--	6,52
ADN	--	--	1
Total			15

Los partidores a utilizados en este trabajo serán específicos para la amplificación de microsatélites, los cuales han sido descritos para otras especies de mitílidos, estos corresponden a: Mg1, Mg3 y Mg6 obtenidos desde *Mytilus galloprovincialis* (Presa et al 2002).

Teniendo lista la preparación de trabajo, se agrego ADN de cada muestra por separado en tubos eppendorf con la solución anteriormente descrita (Tabla 1), para luego colocar cada tubo en el equipo de termociclador , en donde se realiza la reacción de PCR, utilizando el siguiente programa: 95°C por 5' seguido de 35 ciclos de desnaturación a 95° por 40'', extensión a 57° por 40'' y alineamiento a 72°C por 1 ', con un extensión final a 72° por 20'.

Posteriormente, se realizó la electroforesis de PCR la cual es de similar preparación que la electroforesis de la extracción de ADN mencionada anteriormente, con la diferencia de que el gel se encuentra a una concentración de un 1.5% y el gel se hace correr a 75 volts.

.- Lectura de microsatélites.

Una vez obtenidas las copias de los microsatélites mediante PCR, se realiza una lectura mediante un secuenciador automático, lo cual en este caso se realizara mediante envío de las muestras al laboratorio de servicios de la Pontificia Universidad Católica de Chile en Santiago. Luego de realizada la lectura con el secuenciador automático las muestras son analizadas mediante el software Peakscanner, para obtener los datos de los fragmentos de ADN analizados en donde se obtiene el tamaño y posición de los peaks de las muestras para que estos datos puedan ser ingresados a los software estadísticos.

.- Análisis Estadístico.

El análisis de las muestras se realizo mediante la utilización de programas estadísticos específicos para análisis genético, en este caso el software Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3 (Millar P. 1997). Los análisis estadísticos a realizar serán: ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg, mediante test exacto, estadístico F para determinar estructura genética poblacional y su significancia mediante prueba exacta de Fisher.

RESULTADOS

EXTRACCION DE ADN

De acuerdo a los análisis realizados en lo que respecta a extracción de ADN se logró obtener ADN para la 24 muestras por cada una de las 3 localidades estudiadas en *Mytilus chilensis*. La calidad del ADN puede ser visualizada en la Fig. 2, se observa una fotografía de un gel de agarosa mediante electroforesis de ADN, en donde se puede apreciar algún grado de degradación del ADN.

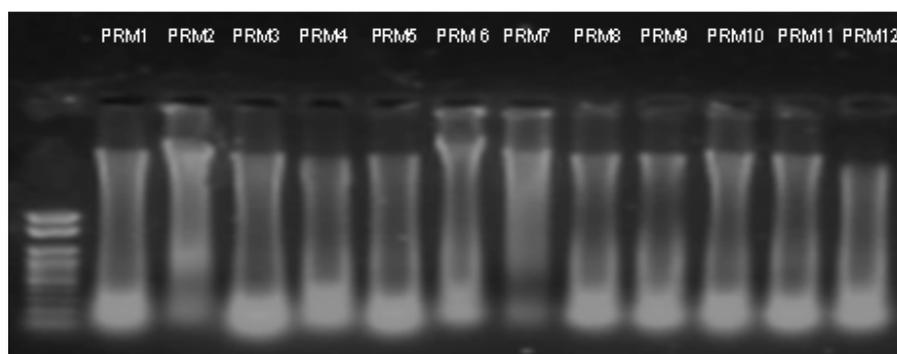


Figura 2.- Fotografía de un gel de agarosa, mostrando el perfil de tinción del ADN extraído mediante el método fenol/ cloroformo de 12 muestras de *M. chilensis* (posillo 1-12), para la localidad de Puerto Raúl Marín Balmaceda.

AMPLIFICACION DE MICROSATELITES.

Amplificación Microsatélite MG3

El marcador MG3 amplificó para 20 muestras provenientes de Chaihuin, 20 muestras de Rolecha y 24 muestras para Puerto Raúl Marín Balmaceda. Para todas las muestras analizadas se obtuvo el tamaño de bandas que correspondían al de dicho marcador ya nombrado, el cual fluctúa entre 143-151 pb. En la Figura 3 se puede observar el tamaño de bandas observado para 12 muestras de Puerto Raúl Marín Balmaceda.



Figura 3.- Fotografía de un gel de agarosa, mostrando la amplificación del ADN de 12 muestras de *M. chilensis* (posillo 1-12) para el sector Puerto Raul Marin Balmaceda, con el partidor MG3.

Amplificación Microsatélite MG6

El marcador MG6 amplificó para 21 muestras provenientes de Chaihuin, 20 muestras de Rolecha y 20 muestras para Puerto Raúl Marín Balmaceda. Para todas las muestras analizadas se obtuvo tamaño de bandas que correspondían al de dicho marcador ya nombrado, el cual fluctúa entre 214-236 pb. En la Figura 4 se puede observar el tamaño de bandas observado para 12 muestras de Puerto Raúl Marín Balmaceda.



Figura 4.- Fotografía de un gel de agarosa, mostrando la amplificación del ADN de 12 muestras de *M. chilensis* (posillo 1-12) para el sector de Chaihuin, con el partidor MG6.

Amplificación Microsatélite MG1

El marcador MG1 amplificó para 20 muestras provenientes de Chaihuin, 20 muestras de Rolecha y 24 muestras para Puerto Raúl Marín Balmaceda. Para todas las muestras analizadas se obtuvo tamaño de bandas que correspondían al de dicho marcador ya nombrado, el cual fluctúa entre 168-208 pb. En la Figura 5 se puede observar el tamaño de bandas observado para 12 muestras de Puerto Raúl Marín Balmaceda.



Figura 5.- Fotografía de un gel de agarosa, mostrando la amplificación del ADN de 12 muestras de *M. chilensis* (posillo 1-12) para el sector de Rolecha, con el partidor MG1.

LECTURA DE MICROSTELITES.

Para la lectura de microsatélites realizada por el programa Peakscaner se pudieron observar los peaks obtenidos para cada uno de los microsatélites obteniendo la posición y el tamaño de estos correspondiente. En las capturas de imágenes de la Figura 6 se pueden observar los peaks obtenidos para una muestra con sus 3 respectivos microsatélites.

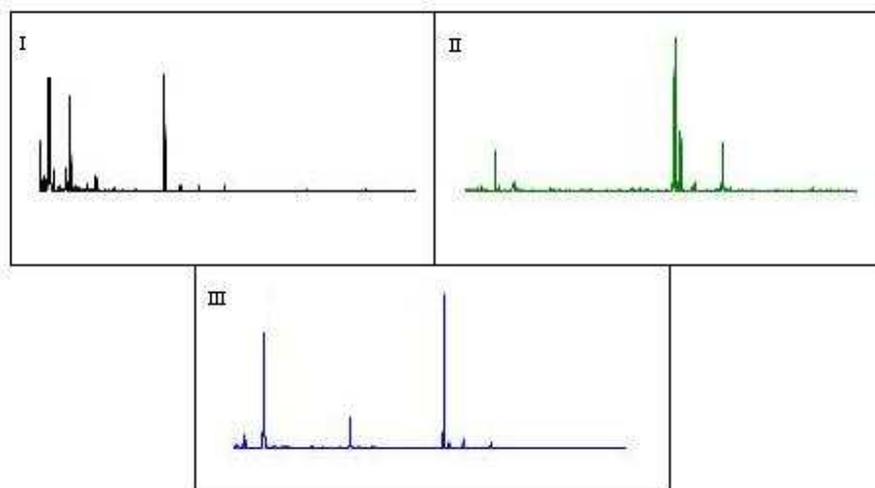


Figura 6.- Muestra las capturas de imágenes mostrando los Peaks obtenidos para 1 muestra (CHA 3) con el software Peakscaner, con los 3 distintos marcadores utilizados en esta investigación en donde cada grafico corresponde a I) MG1, II) MG3 y III) MG6.

ANALISIS ESTADISTICO

De los análisis estadísticos realizados para los 3 loci polimórficos MG1, MG3 y MG6 en las 3 localidades estudiadas, se obtuvieron altos valores de heterocigosidad observada para los marcadores MG1 y MG6 (Tabla 2), no así para el marcador MG3 en donde existió una muy baja heterocigosidad obteniendo como valores máximos un 9% para la localidad de Rolecha (Tabla 2). En lo que respecta al número de alelos presente en cada locus se puede observar una alta cantidad de alelos para los marcadores MG1 y MG6 llegando a encontrarse 9 alelos por marcador en las 20 muestras analizadas por cada población, no así para MG3 donde la cantidad de alelos encontrada fue muy baja en relación a los marcadores MG1 y MG6 (Tabla 3). Para la diferenciación entre localidades se obtuvieron valores significativos entre los distintos pares de localidades para los 3 microsatélites obteniéndose valores de $p = 0,0002$ para Chaihuin v/s Rolecha, $p = 0,0027$ para Chaihuin v/s Puerto Raúl Marín Balmaceda y un $p = 0,018$ para Rolecha v/s Puerto Raúl Marín Balmaceda (Tabla 5), en cambio al analizar los microsatélites por separado no se ven diferencias significativas ($p > 0,05$) para los marcadores MG3 y MG6 por separado y si hay diferencias significativas ($p < 0,05$) para el marcador MG1 (Tabla 5).

Locus	Chaihuin	Rolecha	Puerto Raul Marin Balmaceda
MG1			
n	20	20	24
146	0,475	0,225	0,405
148	0,000	0,150	0,000
156	0,000	0,200	0,048
158	0,050	0,275	0,214
160	0,075	0,000	0,119
162	0,050	0,000	0,048
164	0,000	0,075	0,142
166	0,175	0,050	0,000
168	0,175	0,025	0,024
Ho	0,703	0,803	0,751
HW	0,005	0,000	0,184
MG3			
n	20	20	24
138	1,000	0,950	0,975
140	0,000	0,050	0,000
146	0,000	0,000	0,025
Ho	0,000	0,097	0,049
HW	-	1,000	1,000
MG6			
n	21	20	20
247	0,021	0,000	0,000
250	0,542	0,550	0,525
253	0,083	0,275	0,300
256	0,146	0,100	0,125
259	0,104	0,050	0,025
262	0,042	0,000	0,000
265	0,021	0,000	0,000
271	0,021	0,025	0,025
298	0,021	0,000	0,000
Ho	0,664	0,609	0,618
HW	1,000	0,170	0,068

Tabla 2.- Se muestra el número de individuos analizados (n) y frecuencias alélicas obtenidas para cada alelo dentro de su respectivo locus, además de presentar la heterocigosidad observada (Ho) y probabilidad de ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) para cada una de las localidades analizadas de *M. chilensis*.

	Alelos	<i>Fit</i>	<i>Fst</i>	<i>Fis</i>
MG1	146	0,071	0,045	0,028
	148	0,667	0,116	0,624
	156	0,376	0,108	0,301
	158	0,677	0,049	0,660
	160	0,475	0,023	0,463
	162	0,487	-0,013	0,494
	164	0,415	0,041	0,390
	166	-0,038	0,096	-0,148
	168	0,190	0,081	0,119
MG3	138	-0,015	0,005	-0,020
	140	0,002	0,030	-0,029
	146	0,001	0,002	-0,002
MG6	247	-0,001	-0,004	0,003
	250	-0,289	-0,017	-0,268
	253	-0,231	0,072	-0,326
	256	-0,141	-0,016	-0,123
	259	0,208	0,001	0,207
	262	1,000	-0,008	1,000
	265	-0,001	-0,004	0,003
	271	-0,024	-0,024	0,000
	298	-0,001	-0,004	0,003

Tabla 3.-Valores obtenidos del estadístico F para cada alelo dentro de los diferentes locus estudiados.

	<i>Fit (F)</i>	<i>Fst (Theta p)</i>	<i>Fis (f)</i>	<i>p</i>	<i>E.E</i>
Mg1	0,3244	0,0590	0,2820	0,0000	0,0000
Mg3	-0,0065	0,0127	-0,0195	0,1125	0,0053
Mg6	-0,1529	0,0087	-0,1630	0,2466	0,0263
Mg1/Mg3/Mg6	0,1103	0,0361	0,0770	0,0002	

Tabla 4.- Valores obtenidos del estadístico F por locus y la interacción de estos, además se pueden observar los valores de p para el test exacto de Fisher y su respectivo error estandar (E.E).

	MG1		MG3		MG6		MG1*MG3*MG6
	<i>p</i>	<i>E.E</i>	<i>p</i>	<i>E.E</i>	<i>p</i>	<i>E.E</i>	<i>p total</i>
<i>Chaihuin V/S Rolecha</i>	0,000	0,000	0,205	0,004	0,208	0,012	0,000
<i>Chaihuin V/S Pto. Raúl Marín B.</i>	0,001	0,001	0,461	0,005	0,119	0,012	0,003
<i>Rolecha V/S Pto. Raúl Marín B:</i>	0,001	0,001	0,500	0,006	1,000	0,000	0,018

Tabla 5.- Probabilidad de diferenciación genética entre pares de localidades por locus mediante prueba exacta de diferenciación de poblaciones (Raymond y Rousset 1995), en donde se observa el valor de *p* y su respectivo error estandar (E.E).

DISCUSION

A partir de los resultados obtenidos en la presente tesis podemos decir que existió una óptima extracción de ADN y una correcta amplificación de los 3 microsatélites ocupados para este estudio los que previamente se encontraban definidos para *Mytilus galloprovincialis* por Presa *et. al.* (2002), los cuales permitieron obtener valores adecuados para los análisis genéticos poblacionales para la especie *Mytilus chilensis*, lo cual es realizado por primera vez en esta especie con este tipo de marcadores hipervariables que permiten realizar una aproximación más específica para conocer los niveles de diferenciación que pudieran existir entre grupos o bancos naturales.

De acuerdo a lo analizado mediante los indicadores de variabilidad genética, la especie *Mytilus chilensis* presentó una Heterocigosidad observada (H_o) para el microsatélite MG3 que fue muy baja o nula dentro de las 3 localidades analizadas obteniendo valores de entre un 0% a un 9% (Tabla 2), en cambio, para los microsatélites MG1 y MG6 se puede observar un alto nivel de heterocigosidad presentando valores de entre un 70% a 80% para MG1 y un 60% a 66% para MG6 (Tabla 2). Los valores de heterocigosidad encontrados para esta especie concuerdan con los niveles de variabilidad observados para moluscos bivalvos con este tipo de marcadores. Los resultados obtenidos por estos microsatélites se encuentran cercanos a los valores obtenidos por Diz y Presa (2008) en *Mytilus galloprovincialis* en donde los resultados obtenidos para MG1 fluctúan entre el 89% y 90% y para MG3 entre un 80% y 85%. Además, la heterocigosidad obtenida para *Mytilus chilensis* para estos microsatélites es similar a los valores encontrados en

otros tipos de moluscos bivalvos como *Mytilus edulis* (Del Rio & Beaumont 2000) y *Panopea abrupta* (Vadopalas et.al 2004) en donde también han sido ocupados este tipo de marcadores.

En lo que respecta a la diferenciación de las poblaciones estudiadas se pudo observar que existen diferencias significativas entre las 3 localidades analizadas de *Mytilus chilensis*, ya sea en la comparación total como entre pares de localidades. Al analizar las diferencias detectadas por alguno de los 3 loci analizados, se observa que las diferencias son explicadas por el microsatélite MG1 y no así para MG3 y MG6 en donde no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) (Tabla 5). Al analizar los 3 microsatélites con todas las posibles combinaciones existentes entre las poblaciones se observan diferencias significativas, es decir, cada población se estaría comportando de manera independiente, ya que los valores obtenidos en el test exacto de diferenciación de poblaciones (Raymond y Rousset 1995) son significativos ($p < 0,05$) para la interacción de los 3 locus estudiados en las 3 poblaciones (Tabla 5). Los resultados obtenidos en este estudio mediante marcadores hipervariables muestran resultados diferentes a los obtenido por Toro et. al. (2006), en donde no encuentran diferencias significativas entre las distintas poblaciones a pesar de que se ocupa un rango similar de distribución al utilizado en el presente estudio, explicando que todas las poblaciones se están comportando de una manera similar lo cual no ocurre en este caso. Esta diferencia con lo observado previamente se puede estar debiendo a los distintos marcadores utilizados al ser estos de tipos diferentes, ya que los marcadores utilizados por Toro et. al. (2006) corresponden a alozimas, las cuales cuentan con una baja variabilidad genética y en general poseen un grado de polimorfismo bajo (Martinez et.al. 2007), a diferencia de los utilizados en este trabajo que son microsatélites, los cuales son marcadores hipervariables capaces de detectar en forma mas sensible cualquier tipo de proceso de cambio

genético como mutaciones que estén ocurriendo dentro del genoma, deriva genética de las poblaciones, (Martinez et.al 2007), no así en el caso de las alozimas que permiten detectar presencia de procesos selectivos.

La alta estructuración genética observada para cada población se podría deber a diversos procesos que pudieran estar ocurriendo en esta especie. Así podemos suponer que estaría existiendo una alta tasa de mutación en la especie *Mytilus chilensis*, ya que se pudo observar que existe una alta cantidad de alelos observados por locus al analizar los microsatélites MG1 y MG6 en donde al ser comparados estos entre todas las poblaciones analizadas no presentan un alelo en común sino que existen alelos que aparecen en menor frecuencia que otros (Tabla 3), sin embargo, es conocido que la tasa de mutación en las regiones de microsatélites es más alta que en otras regiones del genoma, debido a ser estos sectores neutros para la selección. Por otro lado, la migración en estas especies con estados adultos sésiles, es determinada por sus periodos larvales, en donde las larvas son trasladadas en el plancton por las corrientes oceanográficas, lo cual determina el grado de dispersión y por lo tanto el nivel de flujo génico entre localidades. En este caso, debido a los resultados de estructuración genética poblacional, podrían estar existiendo barreras geográficas, en este caso oceanográficas, que están impidiendo que exista un correcto flujo de genes y así no estuviese existiendo una migración efectiva de individuos por parte de las distintas poblaciones, esto al contrastarlo con estudios oceanográficos en donde se expone que existe una gran influencia de la Corriente de Deriva del Oeste sobre la costa de Chile (Strub & Mesias 1998; Camus 2001) , no afectaría el traslado de las larvas planctónicas de choritos en donde esta especie cuenta con un estado larvario de 40 - 45 días (Toro et. al. 2004 a) , sino que estas corrientes deberían estar favoreciendo a un mayor flujo de dispersión de larvas (Toro et. al.

2004 b), lo cual no estaría ocurriendo en este estudio en donde todas las poblaciones se estarían comportando de manera diferenciada sin que existiese una migración por parte de las larvas planctónicas a través de la costa de Chile.

De acuerdo a lo planteado se puede observar que en las 3 poblaciones de adultos de *Mytilus chilensis*, cada una se esta comportando de manera independiente por lo tanto será de gran importancia seguir realizando estudios en base al comportamiento de las poblaciones de choritos en la costa chilena ocupando marcadores polimorficos diseñados para esta especie de *Mytilus* y así corroborar la información entregada en la presente tesis, además de realizar muestreos en más zonas para así poder observar mas detalladamente los limites de la diferenciación entre las distintas poblaciones existentes de *Mytilus chilensis* en la costa chilena.

La información recolectada en esta tesis puede ser de gran importancia al momento de realizar la obtención de semillas de chorito, las cuales son de gran importancia al momento de realizar el cultivo de esta especie, ya que al ver que cada población se esta comportando de una forma particular estas podrían estar presentando características importantes para esta especie, ya sean resistencia a enfermedades, altas tasas de crecimientos, expresiones fenotípicas de importancia comercial entre otras, lo cual podría ser de gran ayuda e interés para la industria de la mitilicultura chilena.

BIBLIOGRAFIA

ASTORGA M. & ORTIZ J. 2006. Variabilidad genética y estructura poblacional del tunicado *Pyura chilensis* Molina, 1782, en la costa de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* (2006).

BAUTISTA, C.P. 1988. Moluscos: Tecnología de Cultivo. *Ed. Mundi Prensa*. 25-37 pp.

CAMPUS PA. 2001. Marine biogeography of continental Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 74:587-617.

CHIPPERFIELD, P.N.L. 1953. Observations on the breeding and settlement of *Mytilus edulis* in British waters. *J. Mar. Biol. Ass. U. K*, 32: 449-176.

DEL RIO-PORTILLA, M. A. y A. R. BEAUMONT. 2000. Larval growth, juvenile size and heterozygosity in laboratory reared mussels, *Mytilus edulis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 254 (1): 1-17.

DOYLE, J.J & DOYLE, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from plant tissue. *Focus* 12:1315.

GILBERT, B. 1991. En: Omega. Ed. Acuicultura. Vol I. La miticultura tradicional. 238-291.

GOMEZ-UCHIDA D, WEETMAN D, HAUSER L. 2003. Allozyme and AFLP analyses of genetic population structure in the hairy edible crab *Cancer setosus* from the Chilean coast. *Journal Of Crustacean Biology* 23 (2): 486-494.

LOZADA, L. E. 1967. Informe sobre madurez sexual y crecimiento de la población de *Mytilus chilensis* (Húpe, 1854) en Nercón, Estero de Castro, Chiloe: Contribución al estudio de la cholga *Aulacomya Ater* en Putemún. *Biol. Pesq.* :3-38.

MILLER, MARK P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.

OSORIO, C. 1979. Moluscos marinos de importancia económica en Chile. *Biol. Pesq. Chile* 11: 3-47.

PEREZ M., GUÑEZ R., LLAVOTA A., TORO J.E., ASTORGA M. & PRESA P. 2007. Development of microsatellite markers for the ecosystem bioengineer mussel *Perumytilus purpuratus* and crosspriming testing in six Mytilinae genera.

PLAZA H., ORTUZAR Y, GONZALES M, AROS J . 1995 . Estado de situación y perspectivas de la industria del chorito. Fishing partners Ltda. Pp. 67.

PRESA P., PEREZ M. DIZ A. 2002. Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus spp.*). *Conservation Genetics* 3:441 – 443, 2002.

PICKERELL T, SJ MCCONELL, DOF SKIBISNKY (2004). Isolation and characterization of three microsatellite loci from the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Annales Zoologici Fennici* 41 (2): 455-457.

SANTA CRUZ G., E. LOZADA L. 1979. Chorito *M.chilensis* (Hupe, 1854) Lamellibrachia Anisomyaria Mytilidae. Estado Actual de las Principales Pesquerías Nacionales. Bases para un Desarrollo Pesquero. III Moluscos AP 79 – 18 CORFO – IFOP

STRUB PT., MESIAS JM. 1998. Coastal ocean circulation off western South America. In: Robinson AR and Brink KH (eds) *The Sea*, v 11, John Wiley & Sons, New York, pp 273-313.

TORO JE, SASTRE HD. 1995. Induced triploidy in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Hupe, 1854), and performance of triploid larvae. *Journal Of Shellfish Research* 14 (1): 161-164.

TORO JE, OJEDA JA, VERGARA AM. 2004. The genetic structure of *Mytilus chilensis* (Hupe 1854) populations along the Chilean coast based on RAPDs analysis. *Aquaculture Research* 35 (15): 1466-1471.

TORO JE, ALCAPAN AC, VERGARA AM, OJEDA JA. 2004. Heritability estimates of larval and spat shell height in the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) produced under controlled laboratory conditions. *Aquac Res* 35:56-61.

TORO JE, GC CASTRO, JA OJEDA, AM VERGARA. 2006. Allozymic variation and differentiation in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis*, along its natural distribution. *Genetics And Molecular Biology* 29 (1): 174-179.

VADOPALAS B, LECLAIR LL, BENTZEN P. 2004. Microsatellite and allozyme analyses reveal few genetic differences among spatially distinct aggregations of geoduck clams (*Panopea abrupta*, Conrad 1849). *J Shellfish Res* 23:693–706.