



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

**DETERMINACIÓN DEL MODO DE HERENCIA DEL ADN MITOCONDRIAL EN
LARVAS DE *PERUMYTILUS PURPURATUS*, A PARTIR DE LA FORMACIÓN DE
FAMILIAS GENÉTICAS.**

Tesis para optar al título de Ingeniero en Acuicultura

Profesor Patrocinante: Dra. Marcela Astorga Opazo

Instituto de Acuicultura

JAIME ALEXIS VARGAS MILLACHEO

PUERTO MONTT, CHILE

2009

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar este trabajo tan arduo y lleno de dificultades como lo fue el desarrollo de mi tesis es inevitable pensar en aquellas personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término. Es por esto que para mi es un verdadero placer utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Debo agradecer de manera especial y sincera a la Dr. Marcela Patricia Astorga por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como profesional. Muchas gracias Profesora.

De igual manera Agradecer al Dr. Pedro Bustamante, por su colaboración, paciencia y consejos brindados siempre.

Por supuesto, el agradecimiento más profundo y sentido va para mi familia. Sin su apoyo, colaboración e inspiración habría sido imposible llevar a cabo este trabajo.

A mi madre, Marllys, por su ejemplo de lucha y honestidad; a mi tía Jacqueline por su inteligencia y generosidad y por ser un ejemplo de superación, a mis tíos: Magdalena y Donato por su apoyo incondicional y sincero.

Finalmente, debo agradecer al Laboratorio de Genética de la Universidad Austral de Chile por haber facilitado el espacio físico y equipos para llevar a cabo los análisis genéticos.

Esta investigación fue llevada a cabo con fondos del proyecto FONDECYT 1050848.

ÍNDICE

Pág.

Índice de Figuras	iii
Índice de tablas.....	iv
RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. HIPOTESIS.....	6
1.2. OBJETIVOS.....	7
1.2.1. General.....	7
1.2.2. Específicos.....	7
2. MATERIALES Y MÉTODO.....	8
2.1. Obtención de las muestras.....	8
2.2. Preservación de las muestras.....	8
2.3. Generación de familias de <i>Perumytilus purpuratus</i>.....	10
2.3.1 Inducción a la emisión de gametos.....	10
2.3.1.1 Shock térmico.....	10
2.3.1.2. Tratamiento Pinchazo del músculo aductor posterior.....	10
2.3.2. Fecundación.....	10
2.3.3. Cultivo de larvas.....	11
2.3.4. Obtención y preservación de Familias.....	12
2.4. Caracterización genética del ADN mitocondrial (ADNmt) de <i>P. purpuratus</i>.....	13
2.4.1. Extracción de ADN.....	13
2.4.2. Amplificación de material genético mediante Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	16
2.4.3. Secuenciación de ADNmt.....	17
2.4.3.1. Lectura del ADNmt.....	17
2.4.3.2. Alineamiento de las muestras.....	17
2.5. Diferenciación genética de las Familias de <i>P. purpuratus</i>.....	18
2.5.1. Indicadores de Variabilidad genética.....	18
2.5.2. Análisis Filogenéticos.....	18
3. RESULTADOS.....	19

3.1. Generación de familias de <i>Perumytilus purpuratus</i>.....	19
3.2. Caracterización genética del ADN mitocondrial (ADNmt) de <i>P. purpuratus</i>.....	20
3.2.1. Extracción de ADN.....	20
3.2.2. Amplificación de material genético mediante PCR.....	21
3.3. Secuenciación.....	23
3.3.1. Lectura del ADN mt.....	23
3.3.2. Alineamiento de muestras	24
3.4. Diferenciación genética de las Familias de <i>P. purpuratus</i>.....	26
3.4.1. Variabilidad Genética.....	26
3.4.1.1. Indicadores de variabilidad genética para el total de las muestras.....	26
3.4.1.2. Indicadores de Variabilidad genética de parentales y descendencia.....	28
3.4.1. 3. Número de mutaciones entre pares de secuencias.	29
3.4.2. Análisis Filogenético.....	31
3.4.2.1. Distancia genética.....	31
3.4.2.2. Árbol filogenético.....	33
4. DISCUSIÓN.....	35
5. CONCLUSIÓN.....	40
6. BIBLIOGRAFÍA.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sistema de herencia del DNAm en metazoos y <i>Mytilus</i>	2
Figura 2: Distribución de <i>Perumytilus purpuratus</i> en Chile y el mundo.....	5
Figura 3: Área de muestreo, Playa Pelluco, Puerto Montt, Chile.....	9
Figura 4: Generación de familias de <i>P. purpuratus</i>	19
Figura 5: Gel de agarosa, perfil de tinción de ADN extraído.....	20
Figura 6: Reacción de PCR del ADN de 20 muestras de <i>P. Purpuratus</i>	21
Figura 7: Reacción de PCR del ADN de 11 larvas de <i>P. Purpuratus</i> ,.....	22
Figura 8: Cromatogramas de secuenciaciones de 5 muestras de <i>P. purpuratus</i>	23
Figura 9: Alineamiento múltiple para 34 muestras de <i>P. purpuratus</i>	24
Figura 10: Cromatogramas de secuenciaciones correspondiente al tejido de manto de hembras de <i>P.purpuratus</i>	25
Figura 11: Gráficos de distribución de frecuencias del número de mutaciones entre pares de secuencias	30
Figura 12: Hipotesis filogenetica de las relaciones evolutivas de <i>P. purpuratus</i>	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Muestras de <i>Perumytilus purpuratus</i> utilizadas para la formación de Familias.....	12
Tabla 2: Indicadores de variabilidad genética para las familias, machos, hembras, Tejido de manto y Gónada de <i>P.purpuartus</i>	27
Tabla 3: Indicadores de variabilidad genética para parentales y descendencia de <i>P. purpuratus</i>	28
Tabla 4: Distancia genética dentro de familias, parental, descendencia, machos y hembras de <i>P. purpuratus</i> , basado en el modelo Tamura- Nei.....	32
Tabla 5: Distancia genética entre familias, parentales, descendencia, machos y hembras de <i>P. purpuratus</i> , basado en el modelo Tamura- Nei.....	32

RESUMEN

El ADN mitocondrial de algunas especies de moluscos de la familia Mytilidae presenta un sistema de herencia diferente al presente en otros animales. Este sistema es conocido como herencia doble uniparental (DUI) y es caracterizado por la presencia de dos genomas mitocondriales en la misma especie, uno transmitido a través del óvulo (genoma F) y otro transmitido a través del espermatozoide (genoma M). Por otra parte, *Perumytilus purpuratus* es una de las especies de moluscos perteneciente a la familia Mytilidae, de mayor importancia ecológica debido a sus características de competidor dominante en el intermareal de Chile, distribuyéndose desde el Ecuador al Estrecho de Magallanes por el Pacífico, y hasta Santa Cruz por el Atlántico argentino. En relación a ello, el presente estudio tuvo como objetivo: Determinar el modo de herencia de *P. purpuratus* evaluado en larvas y establecer la posible presencia de diferentes genomas mitocondriales en diferentes tejidos de este chorito, a partir de la formación de familias genéticas.

El estudio molecular consistió en analizar parcialmente secuencias nucleotídicas de la región 16S del ADN mitocondrial ribosomal y se evaluaron 4 familias genéticas generadas en el laboratorio para esta especie. Los parentales fueron obtenidos desde la Bahía Pelluco, Puerto Montt, y después de generar las familias genéticas, se les realizó extracción de ácidos nucleicos (ADN) con el método de fenol/Cloroformo, para realizar reacciones de amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), obtención de las respectivas secuencias nucleotídicas y su posterior caracterización genética.

A partir de los análisis genéticos se observó que los parentales poseen genomas diferentes, encontrándose un genoma femenino F y un genoma masculino M, lo cual fue independiente del tipo de tejido analizado. Sin embargo, la progenie muestra el genoma mitocondrial materno, por

lo que en base a esta última observación, las larvas de *P. purpuratus* tendrían un modo de herencia uniparental materna.

Finalmente, los análisis de agrupación filogenética, detectaron una separación de individuos machos v/s hembras - larvas de esta especie, por lo que se establece la presencia de dos genomas mitocondriales en *P. purpuratus*.

SUMMARY

The mitochondrial DNA of some species of bivalves of the *Mytilidae* family have a system of inheritance different than other animals. This system is known as Doubly uniparental inheritance (DUI) and is characterized by the presence of two mitochondrial genomes, one transmitted through the egg (F genome) and the other transmitted through the sperm (F genome). On the other hand, *Perumytilus purpuratus* is a bivalve specie belonging to the *Mytilidae* family, important for their ecological characteristics of dominant competitor in the intertidal in Chile and distributed from Ecuador to the Strait of Magellan at the Pacific and reaching Santa Cruz by the Argentine Atlantic. Related with this, the aim of this study was to determine the mode of inheritance *P. purpuratus* of larval by producing genetic families to study the possible presence of different mitochondrial genomes in different tissues of the mussel.

This molecular study analyzed the partial nucleotide sequences of *mitochondrial 16S rRNA* gene in 4 genetic families generated at the laboratory were evaluated for this species. The progenitors were collected at Pelluco Bay, Puerto Montt and after generating the genetic families, nucleic acids extraction (DNA) with phenol/Chloroform were carried out, in order to obtain DNA samples for PCR amplifications, sequencing and subsequent genetic characterization.

The genetic analysis showed that independent of their tissue, the progenitors have different genomes, finding both types of genomes, the female F and the male M genomes. However, the progeny of both sexes inherited the mother's mitochondrial genome, suggesting that larvae of *P. purpuratus* might have an uniparental maternal inheritance mode.

Finally, the phylogenetic analysis showed a separation between male and females v/s larvae individuals of this specie, suggesting the possible presence of two mitochondrial genomes in *P. purpuratus*.

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los análisis de variabilidad poblacional utilizando el material genómico en poblaciones naturales se ha enfocado en la utilización del ADN mitocondrial (ADNmt), debido a que es fácil de aislar del resto del ADN nuclear, muestra variabilidad intraespecífica y posee un genoma haploide, heredado generalmente por vía materna sin que ocurra recombinación génica y por tanto puede ser tratado como un solo locus génico, lo que a su vez facilita la interpretación y el tratamiento estadístico de los datos. Además posee una alta tasa de evolución que en los vertebrados es 4 veces más rápida que la mayoría de los genes nucleares (Birky et al., 1983; Wilson et al., 1985).

El hecho que los genes mitocondriales evolucionen más rápido que la contraparte nuclear entrega una visión más amplia de la diferenciación subpoblacional (Brown et al., 1979), y permite la identificación de caracteres filogenéticos entre taxones de estrecha relación como las especies y poblaciones. Estas características, junto con el hecho de existir un elevado número de copias, lo hace especialmente útil en estudios evolutivos entre especies próximas.

Los ADN mitocondriales (ADNmt) consisten, generalmente, en una molécula circular, cerrada y bicatenaria, aunque también existen ADNmt lineales y monocatenarios. La transmisión del genoma mitocondrial de modo uniparental es muy frecuente en todos los eucariotas (Birky, 1995) y el gameto a través del cual se hereda suele ser el materno (Avise, 1987). Por lo que este genoma es heredado generalmente por vía materna sin que ocurra recombinación génica. Sin embargo, el ADNmt de los moluscos presenta modificaciones a este modelo uniparental, dentro de estos se ha encontrado un grupo de moluscos que presentan un tipo de patrón diferente al modelo general. Es así que se ha establecido en los moluscos de la familia Mytilidae y específicamente en el género

Mytilus, que este grupo posee un modo excepcional de herencia del ADNmt en el que dos moléculas altamente divergentes en secuencia nucleotídica (10-20%) son transmitidas separadamente por vía materna y paterna (Fisher & Skibinski 1990, Rawson & Hilbish 1995; Stewart *et al.* 1995). Esta se ha denominado «herencia uniparental doble» (DUI, según sus iniciales en inglés) (Skibinski *et al.* 1994; Zouros *et al.* 1994) (Figura 1). En este sistema es posible encontrar la presencia de 2 genomas mitocondriales uno transmitido a través del óvulo (Genoma Femenino o F) y otro transmitido a través del espermio (Genoma masculino o M). El genoma M se encuentra exclusivamente en la línea germinal masculina, es decir, en los espermatozoides y sus células precursoras y el genoma F se encuentra en todos los tejidos.

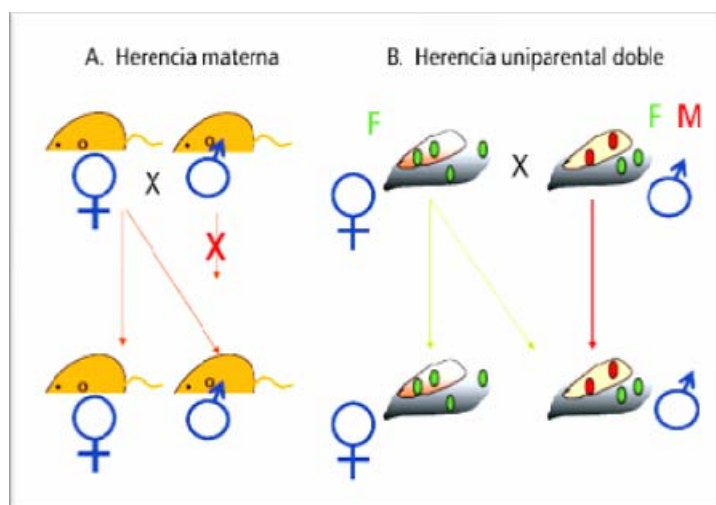


Figura 1. Sistemas de Herencia. **A.** En el sistema de herencia uniparental materna del DNA mitocondrial. La progenie de ambos sexos hereda el genoma mitocondrial de su madre, siendo destruidas las mitocondrias presentes en los espermatozoides. **B.** Herencia doblemente uniparental en los mejillones (*Mytilus*). Existen 2 clases de mitocondrias, que portan, respectivamente, genomas de tipo F (verde) y de tipo M (rojo). La progenie de ambos sexos hereda el genoma F materno, pero sólo la progenie de sexo masculino hereda el genoma M del padre. Extraído de Martínez y Figueras 2007.

Aunque este mecanismo de herencia podría estar presente en todos los moluscos, hasta ahora sólo se ha podido demostrar en algunas familias de Bivalvos, como los mejillones marinos (Mitílidos) y de agua dulce (Uniónidos), y las almejas (Venéridos) (Mizi *et al.* 2005).

No hay evidencias que se encuentre en los grupos de bivalvos que contienen preponderantemente especies hermafroditas, como las ostras (Fam. Ostreidae) o los ostiones (Fam. Pectinidae), ni en otras clases de moluscos, aunque sería necesario un estudio particularizado de estos y otros grupos taxonómicos para confirmarlo. También se ha comprobado que los genomas F y M pueden presentar recombinación o mezcla entre ellos, en las especies con DUI (Ladoukakis y Zouros 2001; Rokas *et al.* 2003).

En especies del genero *Mytilus* se ha observado que las hembras son homoplásmicas, con la presencia de solo el genoma F y los machos serian heteroplásmicos con el genoma F en el tejido somático y el genoma M en el tejido gonádico (Skibinski *et al.* 1994; Zouros *et al.* 1994).

Entre los moluscos de la familia Mytilidae encontramos el chorito maico *Perumytilus purpuratus* una especie de gran importancia ecológica debido a sus características de competidor dominante en el intermareal de Chile (Suchanek 1986, Alvarado & Castilla 1996, Guiñez 1996), y además por ser considerado un ingeniero ecosistémico manteniendo una alta diversidad de especies asociadas (Okamura 1986, Fréchette & Lefaivre 1990, Guiñez & Castilla 1999).

P. purpuratus es una especie pequeña que presenta una concha mitiliforme, con un grueso periostraco en tono púrpura oscuro y una escultura externa con estrías radiales. Internamente es de color blanco, con una marcada línea paleal y un pequeño músculo aductor. Fuera de esta línea, el color de la concha es en tonos púrpura brillante (Paredes & Tarazona, 1980).

Esta especie presenta un importante desarrollo gonadal, extendiéndose además del manto, por todo el cuerpo del individuo, incluso entre los paquetes musculares del músculo aductor posterior (Vinuesa, 1981). Presenta sexos separados y la emisión de productos gaméticos se realiza durante casi todo el año, careciendo de una etapa definida y reconocible de reposo sexual (Vinuesa, 1981). Posee una larva planctónica de 14 días. (Ramorino & Campos 1979, Guiñez & Castilla 1999), es una especie que presenta dimorfismo sexual, donde la hembra tiene un manto de color café mientras que en el macho es de color amarillo.

La distribución de *P. purpuratus* esta dada desde Santa Cruz en el Atlántico Argentino hasta el Ecuador por el Pacífico, por lo cual abarca toda la costa chilena (Osorio & Bahamonde 1968, Lancelloti y Vásquez 2000). Es muy común encontrar poblaciones de esta especie en zonas rocosas formando un ancho cinturón que ocupa el horizonte medio de la zona litoral, lo que los deja expuestos en las bajas mareas (Paredes & Tarazona, 1980).



Figura 2: Distribución de *Perumytilus purpuratus* en Chile y el mundo

En base a estos antecedentes antes mencionados, en la presente tesis se desea determinar el modo de herencia del ADN mitocondrial en larvas de *Perumytilus purpuratus*, utilizando familias genéticas, para corroborar la posible presencia del modelo de doble herencia uniparental ya observado en mitílidos, y establecer la posible presencia de diferentes genomas mitocondriales en diferentes tejidos del chorito, *P. purpuratus*, en base al análisis de parentales y descendencia obtenidos de la formación de familias genéticas.

1.1 HIPOTESIS

H1. El modo de transmisión del genoma mitocondrial de *P. purpuratus* colectados en la Bahía de Pelluco seguiría el modelo uniparental, observado en la mayoría de organismos. En ellos se espera:

- I. Presencia de un solo genoma.
- II. Presencia de un genoma materno o femenino.

H2. El modo de herencia de *Perumytilus purpuratus* ya sean parentales o descendencia, sería seguiría el modelo de doble herencia uniparental. En ellos se espera:

- I. Presencia de un genoma materno o femenino (F) en hembras.
- II. Presencia de un genoma paterno o masculino (M) en gónada de machos.
- III. Presencia de un genoma materno o femenino (F) en tejido somático de machos

1.2 OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar el modo de herencia del ADN mitocondrial en larvas del chorito maico *Perumytilus purpuratus*, a través de la caracterización molecular de familias genéticas.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Generar familias de *P. purpuratus* mediante cruzamientos dirigidos y obtención de progenie en laboratorio (hatchery).
- Caracterizar el genoma mitocondrial de parentales y progenie de *P. purpuratus* mediante la herramienta genómica de secuenciación.
- Diferenciar genéticamente entre machos, hembras, parentales y descendencia de *P. purpuratus* mediante la realización de análisis genéticos.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Obtención de las Muestras.

Las muestras de *Perumytilus purpuratus* fueron colectadas durante el mes de noviembre de 2008 desde la zona intermareal de la playa de Pelluco (41°12'38.83" S) (73°01'33.84"O) (Fig. 3) en Puerto Montt, Chile, desde donde se colectó un total de 30 individuos mediante extracción manual utilizando espátula, durante periodos de marea baja,.

2.2. Preservación de las muestras

Los individuos colectados fueron mantenidos en contenedores con agua de mar y trasladados al laboratorio de la Universidad Austral de Chile Sede Puerto Montt. Posteriormente, fueron aclimatados, para esto, los individuos fueron ubicados en grupos de cinco en bandejas plásticas con agua a 13°C, con aireación constante, recambio periódico de agua a salinidad de 30,5 ppm.

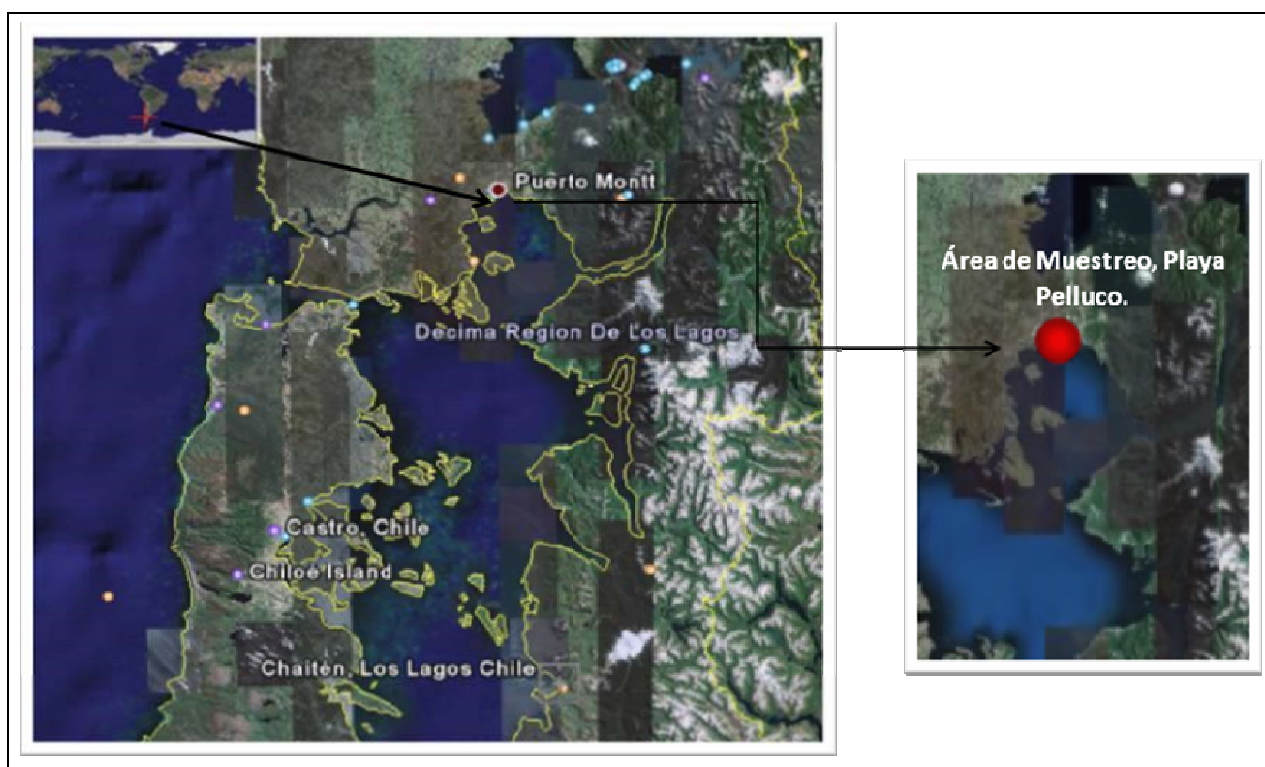


Figura 3: Área de muestreo, Playa Pelluco, Puerto Montt, Chile

2.3. Generación de familias de *Perumytilus purpuratus*

2.3.1 Inducción a la emisión de gametos.

La inducción al desove se realizó según el protocolo de método de inducción de gametos (Briones. 2009)*, que se basa en:

2.3.1.1 Shock térmico.

La inducción a la maduración y luego al desove mediante un shock térmico, que consiste en un tratamiento de frío a calor, para esto los individuos se dejan en el congelador (a -7°) durante 40 minutos y posteriormente se colocan en vasos plásticos con el agua de mar filtrada y esterilizada a 20° C.

2.3.1.2. Tratamiento Pinchazo del músculo aductor posterior.

Para este tratamiento se abren cuidadosamente las valvas, colocar un trozo de palo de fósforo para mantenerlas abiertas, pinchar con una aguja fina el músculo aductor posterior, colocar en su recipiente y finalmente colocar inmediatamente el agua de mar filtrada a 20° C. Además en los casos que solo se observa desove de hembras se realiza “stripping” (maceración de gónadas) de individuos machos, para la fecundación de los gametos femeninos obtenidos.

2.3.2 Fecundación.

Concluido el desove se realiza la fecundación, para esto los ovocitos previamente lavados, se colocan en un vaso plástico de 300 ml el que contiene 200 ml de agua de mar filtrada y esterilizada, posteriormente se añade de 3 a 6 gotas de los espermatozoides que ya se han
(Briones, com. pers.).

mezclado con el agua y observado al microscopio (Donde se observaron muy móviles). La cantidad de gotas dependerá de la cantidad de ovocitos, la que puede variar de 30000 a 120000 por gota?, luego se estimula la fecundación a través de un suave movimiento del vaso, sin levantar de la mesa, para agrupar los ovocitos en el centro, finalmente se deja durante 2 minutos y se vierte la mezcla en un vaso plástico con agua de mar esterilizada. El volumen de agua se calcula partir de la fecundidad y calculando alrededor de 15-20 larvas /ml para esta primera etapa. Los vasos quedan tapados y no se mueven por 48 horas ya que las larvas en su primer estado, trocóforas, son muy frágiles en condiciones artificiales.

2.3.3 Cultivo de larvas.

Una vez realizada la fecundación, como se menciona arriba, los huevos se colocan en un vaso de base plana con un volumen de agua de aproximadamente 250 ml y se dejan durante 48 horas, revisando, a partir de una muestra, la aparición de larvas D. A las 48 horas, una vez que han aparecido las larvas D, éstas son lavadas. Para ello se necesita una manguera transparente de aproximadamente 1/4 de pulgada. El largo dependerá de la altura en la que se encuentran los vasos y se lavan por diferencia de presiones reteniendo las larvas en filtro de 50 a 70 μm el que en ningún momento debe estar seco.

2.3.4 Obtención y preservación de Familias

Una vez llevado a cabo el desove y la fecundación se logró obtener cuatro familias (Tabla 1), a cada una de estas familias se les realizó análisis genético, para lo cual las muestras de manto, gónada y larvas fueron almacenadas en tubos eppendorf de 2 ml con etanol al 95%.

Tabla I: Muestras de *Perumytilus purpuratus* utilizadas para la formación de Familias.

Familia 1 (4 × 1)	Familia 2 (4 × 2)	Familia 3(3 × 15)	Familia 4 (21 × 22)
Hembra 4	Hembra 4	Hembra 3	Hembra 21
Macho 1	Macho 2	Macho 15	Macho 22

2.4. Caracterización genética del ADN mitocondrial (ADNmt) de *P. purpuratus*.

2.4.1. Extracción de ADN

La Extracción del ADN se realizó para los tejidos de manto y gónada de parentales (hembras y macho), y en la descendencia (larvas), esta se llevó a cabo según lo establecido en el método estándar fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y precipitación con etanol (Doyle & Doyle 1987). El cual consiste en tomar un trozo de tejido de aproximadamente 100 gr de cada uno de los individuos, posteriormente se macera finamente la muestra, estas se introducen individualmente en tubos eppendorf de 1,5 ml esterilizados, a cada uno de los tubos se les agrega 300 µl de buffer de lisis, que produce una lisis que permite liberar el ADN del interior de la célula, para esto se utilizan los buffers de extracción 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), que tiene cuatro grupos carboxilo y dos grupos amino, cuya forma completamente de-protonizada puede unirse a cualquier complejo metálico en solución, quitando a los cationes de la solución para desestabilizar la membrana celular e inhibir a las ADNasas;
- 3) sales (p.ej. cloruro de sodio, NaCl 20mM), que forman una capa iónica suave que recubre al ADN protegiéndolo y ayudando a evitar su degradación;
- 4) Tris-HCl 20 mM con pH entre 7.5 y 8.2 para mantener el pH de la solución estable; y
- 5) proteinasa K (concentración 5 µl) para degradar proteínas o enzimas, posteriormente durante un par de segundos se agita en vórtex, para incubar en baño termorregulador a 45° C toda la noche.

Al día siguiente a cada una de las muestras se les agregó 150 µl de NaCl a 5M, se agita fuertemente por dos minutos y luego se centrifuga (5 minutos a 12000 rpm), se recupera el sobrenadante con cuidado para traspasarlo a tubos limpios, se vuelve a agregar 150 µl de NaCl 5M, se mezcla bien por lo que se agita nuevamente por 2 minutos y se centrifuga (5 minutos a 12000 rpm), se extrae y transfiere el sobrenadante (500 µl) a un tubo limpio, se le agrega 40 µl de NaCl 2M y 2 volúmenes (1000 µl) de etanol puro a cada uno de los tubos. Se centrifuga (10 min a 12000 rpm) y se resuspende con 300 µl de agua esterilizada, en esta etapa es importante que el pellet este bien disuelto, luego se agrega 300 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, se agita fuertemente por 30 min, esto resulta necesario para eliminar proteínas tales como nucleasas; se centrifuga (8000 rpm por 5 min), se recupera el sobrenadante con cuidado, para así evitar acarrear proteínas que quedan en la interface. Se transfiere el sobrenadante a un tubo limpio y se agrega un volumen de 300 µl de cloroformo: alcohol isoamílico, se agita fuertemente por 10 min., esta extracción se lleva a cabo para acabar de limpiar la muestra de cualquier residuo lipídico. Se Centrifuga (8000 rpm por 5 min.) para recuperar el sobrenadante y luego se transfiere a tubos limpios. Una vez concluido este paso se realiza la precipitación del ADN, para lo cual se añaden 2 volúmenes de etanol puro (600 µl) y se mezcla. En este paso se visualiza levemente el ADN. 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. Posteriormente, se centrifugan las muestras (12000 rpm por 12 min), se elimina el sobrenadante y se lava el pellet en alcohol al 70 % (750 µl) para eliminar todas las sales que permanezcan en la solución. Las muestras 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 queden trazas de alcohol, se resuspende el pellet con 100 µl de H₂O y se disuelve muy bien este, el resultado obtenido es ADN concentrado.

Concluida la etapa de extracción de ADN se lleva a cabo la estimación de ADN mediante electroforesis para la electroforesis se midieron 5 µl de la mezcla, extraída con una micropipeta y se agregaron 0,5 µl de solución de siembra, se colocó la mezcla 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 30 minutos.

El tampón para la confección del gel y la corrida electroforética corresponde a TAE diluido 50 X, concluida la corrida se sumergió el gel en una solución con sbyr-safe (4 µl) por unos 10 min., conseguida la fluorescencia, que se observa en el transluminador y se procede a registrar los resultados en una fotografía con una cámara Cannon PC 1089.

2.4.2 Amplificación de material genético mediante Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de cada una de las muestras obtenidas del proceso de extracción de ADN se utilizaron los partidores universales definidos por Simon *et al.* (2000) para el gen 16S del ADN mitocondrial, con dos partidores, el 16Sar (5' CGCCTGTTTATCAAAAACAT 3') y el 16Sbr (5'CCGGTCTGAACTCAGATCACGT 3'). Antes de realizar las reacciones de amplificación con todas las muestras, se ajustaron las condiciones de PCR.

La amplificación fue preparada en un volumen final de 15 µl, el cual contenía lo siguiente: 1,5 µl Buffer (tampón PCR), 1,5 mM de MgCl₂ (2 µl), dNTPs (2 µl), Taq DNA polimerasa (0,2 µl), 2 µl de cada partidor, 4,8 µl de agua autoclavada y se completo el volumen con 1 µl de ADN.

Las condiciones de PCR fueron similares a las establecidas por Simón *et al.* (2000), que consiste en una desnaturalización inicial a 95° C por 9 minutos, seguida de 35 ciclos a 94° C por 1 minuto, 55° C por 45 segundo y 72° C por 1 minuto, y una extensión final de 72° C por 5 minutos y un enfriamiento a 4° C.

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador PTC-1160. La especificidad y el tamaño del producto final de amplificación se verificó mediante electroforesis, para esto se midieron 5µl de la mezcla extraída con una micropipeta y se agregaron 0,5 µl de solución de siembra, además se utilizaron 5 µl de un marcador de tamaño de 100 pb con 0,5 µl Sbyr-safe, posteriormente se colocó cada una de las mezclas en los pocillos de un gel de agarosa al 1,5% , efectuándose la separación electroforética con una diferencia de voltaje de 73-84 volt por unos 30 minutos. El tampón para la confección del gel y la corrida electroforética es TAE diluido al 50 X. Conseguida la fluorescencia, se procedió a registrar los resultados en una fotografía con una cámara Cannon PC 1089.

La calidad de los productos de la reacción, fueron reflejados en la de la intensidad y limpieza de la banda que se logró visualizar en el gel.

2.4.3. Secuenciación de ADNmt

2.4.3.1. Lectura del ADNmt

Para llevar a cabo la lectura del ADN se realizó secuenciación del fragmento amplificando mediante lectura en secuenciador automático. Cada producto fue previamente purificado, donde se extraen los residuos de PCR y luego cada muestra fue secuenciada en ambos sentidos, “forward” y “reverse” y comparados por sobreposición para su edición usando los programas Blast-2 y BIOEDIT 5.0.9 (Hall, 1999).

2.4.3.2. Alineamiento de las muestras

Luego de editadas las muestras fueron alineadas, lo cual corresponde a buscar o establecer un segmento entre ellas donde el número de coincidencias sea máximo, incrementando de esta manera el parecido entre ellas. Debido a que los resultados obtenidos no resultan siempre ser el óptimo, es necesario corregir algunas zonas de alineamiento a mano. El alineamiento múltiple se efectuó, para las secuencias obtenidas y para muestras de *P. purpuratus* externos de la familia que se utilizaron de comparación, las cuales estaban identificados por sexo, y su correspondiente tejido (manto o gónada), para ello se usó el programa informático CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997).

2.5. Diferenciación genética de las Familias de *P. purpuratus*

2.5.1. Indicadores de Variabilidad genética.

El número de sitios polimórficos, número de haplotipos, diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica y el número promedio de nucleótidos diferentes se estimaron a partir de la secuencias de muestras obtenidas de parentales y descendencia, utilizando el programa DnaSP versión 5.53 (Rozas *et al* 2009).

La cantidad de mutaciones acumuladas en el genoma de parentales (Hembras y Machos) y descendencia se estimó llevando a cabo análisis de frecuencia de individuos en relación al número de mutaciones entre pares de secuencias, utilizando el programa DnaSP versión 5.53 (Rozas *et al* 2009).

.

2.5.2. Análisis Filogenético.

Para realizar el análisis filogenético se utilizó el programa informático MEGA versión 4.0 (Kumar *et al.*, 2000). En dicho análisis se incluyeron secuencias de especies emparentadas evolutivamente, con el objetivo de enraizar el árbol. las especies usadas como grupo externo fueron individuos de los géneros *Brachidontes* y *Mytilus*.

En este análisis se realizó agrupamiento de las muestras *a priori* para poder determinar la distancia entre parentales y entre descendencia. Para lo cual se utilizó el método de distancia con el criterio de Tamura-Nei. Luego se procedió a la reconstrucción los árboles filogenéticos por medio del método *Neighbor Joining* (Saitou y Nei, 1987) y se visualizaron los árboles. Se aplicó dicha metodología de distancias dado que se buscó visualizar cómo se relacionan los parentales y su descendencia.

3. RESULTADOS

3.1. Generación de familias de *Perumytilus purpuratus*

Se obtuvieron tres desoves espontáneos correspondiente a los parentales: hembra 4, hembra 3 y hembra 21, y cinco desoves inducidos (macho 1, macho 2, macho 15 y macho 22) entre los cuales se realizó cruzamientos dirigidos (Figura 4). Producto de la fecundación se obtuvo una alta descendencia (Larvas D) para cada una de las hembras fecundadas. Logrando de esta manera la formación de cuatro familias (Figura 4).

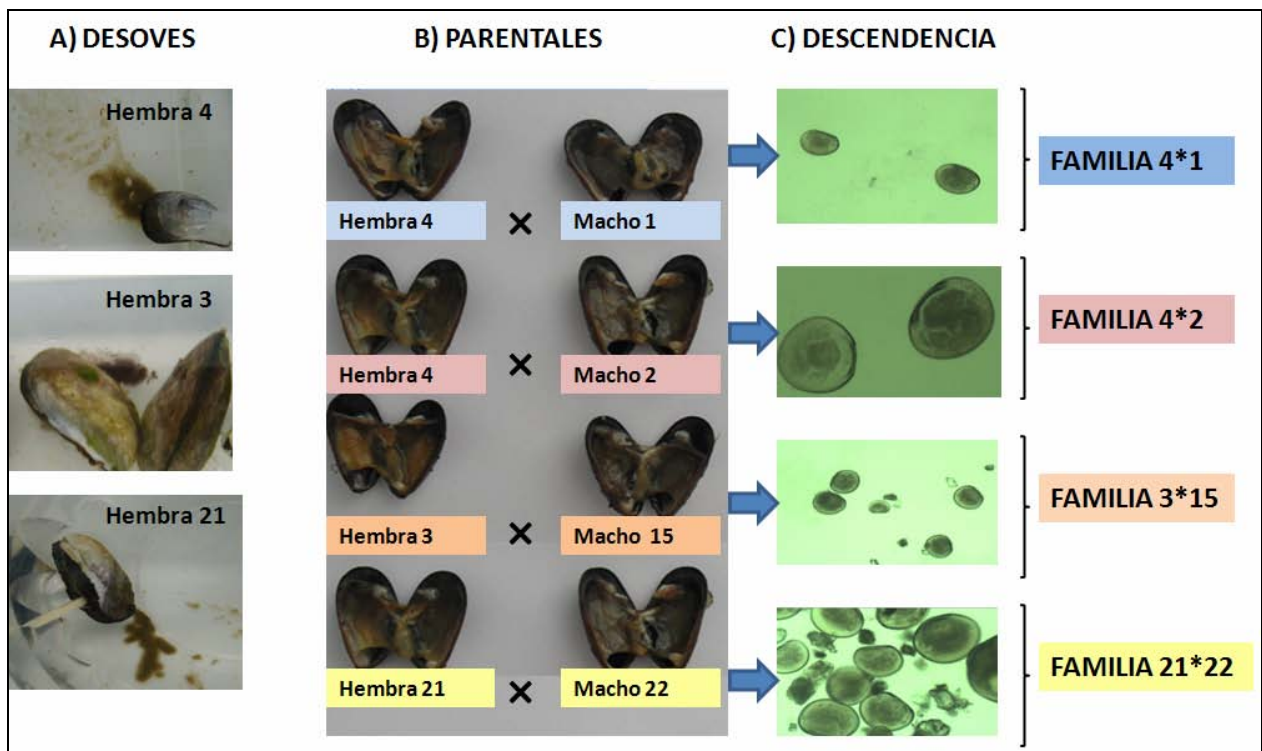


Figura 4: Generación de cuatro familias a partir de desoves espontáneos e inducidos y su posterior descendencia (Larvas D).

3.2. Caracterización genética de *P. purpuratus*.

3.2.1. Extracción de ADN

A partir de la extracción de ADN, podemos decir que este se obtuvo en todas las muestras analizadas, como se observa en la Figura 5, en la cual se visualizan los resultados de la electroforesis en gel de agarosa a partir del resultado de extracción de ADN para las muestras de *P. purpuratus*. La intensidad de la tinción de las bandas esta relacionada con la cantidad y la calidad del ADN obtenido. En las diferentes muestras es posible observar algunos signos de degradación o fragmentación, además éstas mostraron presencia de ARN. Sin embargo, el método permitió obtener ADN suficiente para las siguientes etapas del análisis.

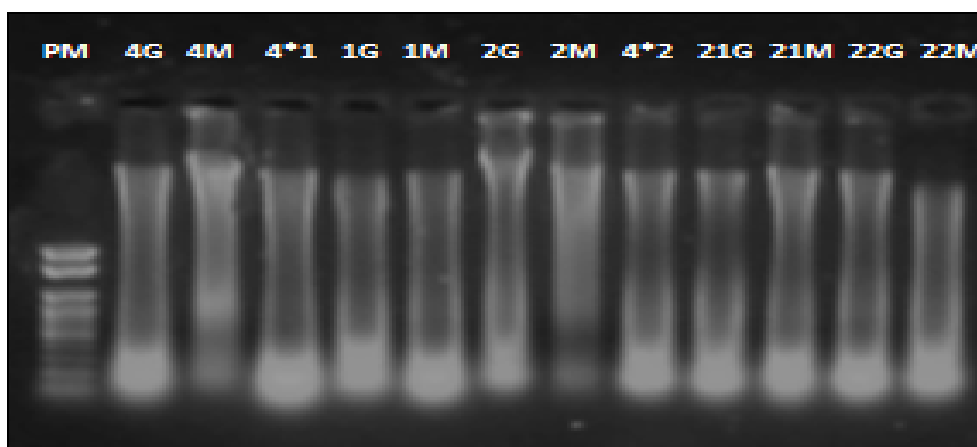


Figura 5: Fotografía de un gel de agarosa, mostrando el perfil de tinción del ADN extraído mediante el método fenol/ cloroformo de 12 muestras de *P. purpuratus*, PM: marcador de peso molecular 100 pb, electroforesis durante 40 min a 73 volt.

3.2.2. Amplificación de material genético mediante PCR.

Mediante la amplificación por PCR, se obtuvo una buena amplificación de la región 16S de ADNmt (Figura 6), observándose la presencia de bandas específicas y de buena intensidad de un fragmento de aproximadamente 500 pb.

Al realizar la amplificación diferencial entre parentales y descendencia (larvas), se pudo detectar la menor amplificación de estas ultimas, (Indicadas como 4*1, 4*2, 21*22 y 3*15), donde se observan bandas de menor intensidad. En general, no se observó variabilidad en la amplificación de las diferentes muestras.

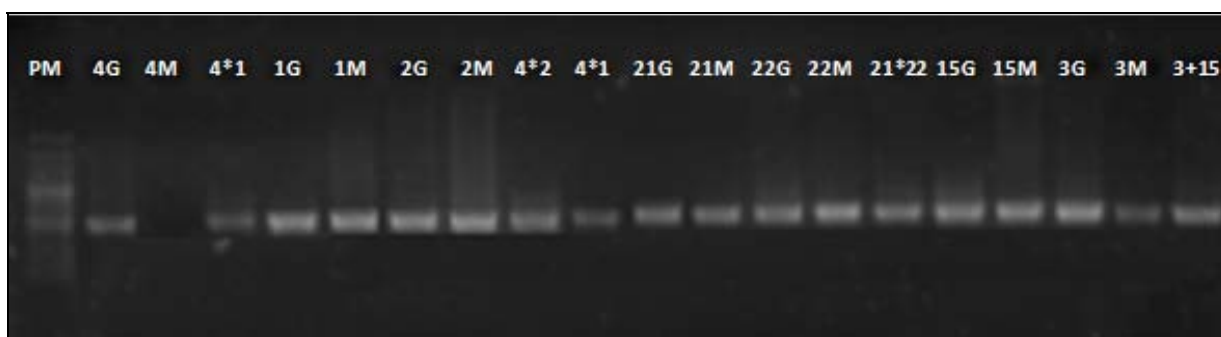


Figura 6: Fotografía de un gel de agarosa, para la reacción de PCR del ADN de 20 muestras de *P. Purpuratus*, con los partidores 16Sar y 16 Sbr. El pocillo PM corresponde al marcador de peso molecular (100 pb). Se realizó electroforesis durante 60 min a 73 volt.

Mediante la amplificación por PCR, se obtuvo una buena amplificación de la región 16 S para el ADN Mitocondrial de replicas de la descendencia (larvas), observándose la presencia de una banda especifica con menor intensidad, de aproximadamente 500 pb. (Figura 7)



Figura 7: Fotografía de un gel de agarosa, para la reacción de PCR del ADN de 11 larvas de *P. Purpuratus*, con los partidores 16Sar y 16 Sbr. El pocillo PM marcador de peso molecular (100 pb), electroforesis, durante 60 min a 73 volt.

3.3. Secuenciación

3.3.1. Lectura del ADNmt

Se obtuvieron un total de 35 secuencias de la región 16S de ADNmt para *P. purpuratus*, de las cuales, 15 corresponden a los parentales y 12 a las larvas descendientes y 8 corresponden a muestras controles para comparación de otros individuos no pertenecientes a las familias. Para las diferentes muestras se obtuvo una secuencia de 480 pares de bases nucleotídicas. Los resultados obtenidos a partir de la secuenciación se pueden observar mediante algunos de los cromatogramas que se muestran en la Figura 8. Se observa en esta figura buenos niveles de amplificación y la limpieza de la muestra lo que permitió una adecuada lectura.

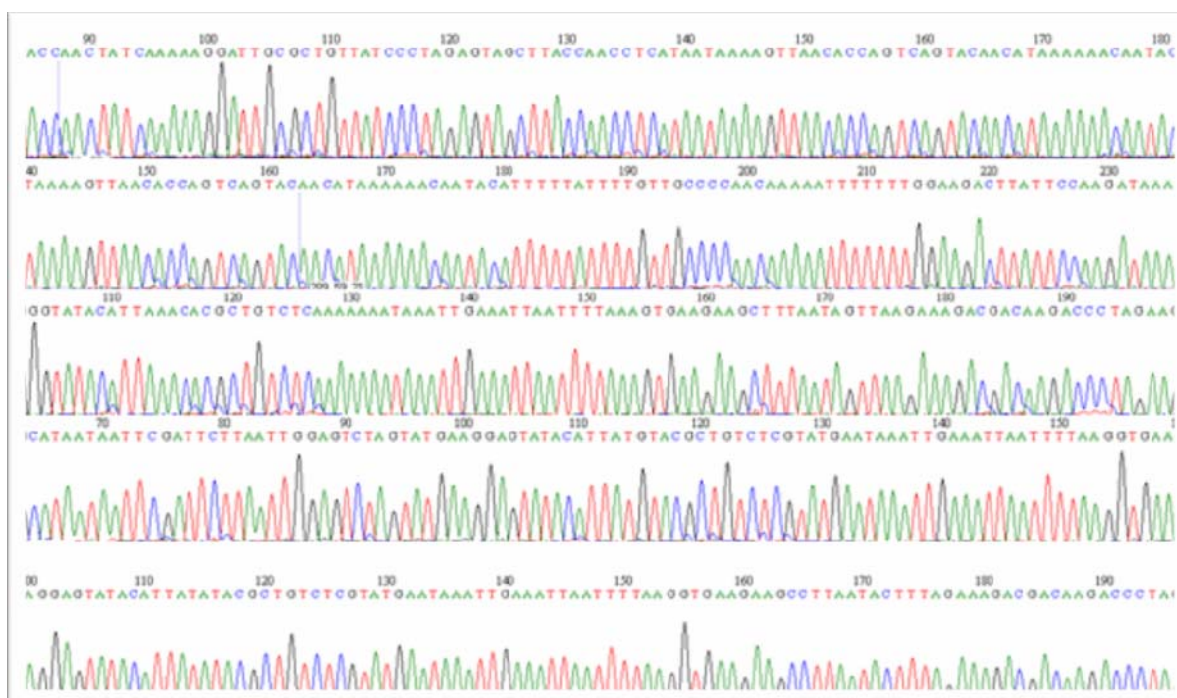


Figura 8: Cromatogramas de secuenciaciones de 5 muestras de *P. purpuratus*.

3.3.2. Alineamiento de muestras

El alineamiento fue correcto para las 35 muestras (Fig.9). El total de secuencias analizadas para *P. purpuratus* presentaron un porcentaje de identidad genética de un 76, 4 %, basado en la similitud de las secuencias.

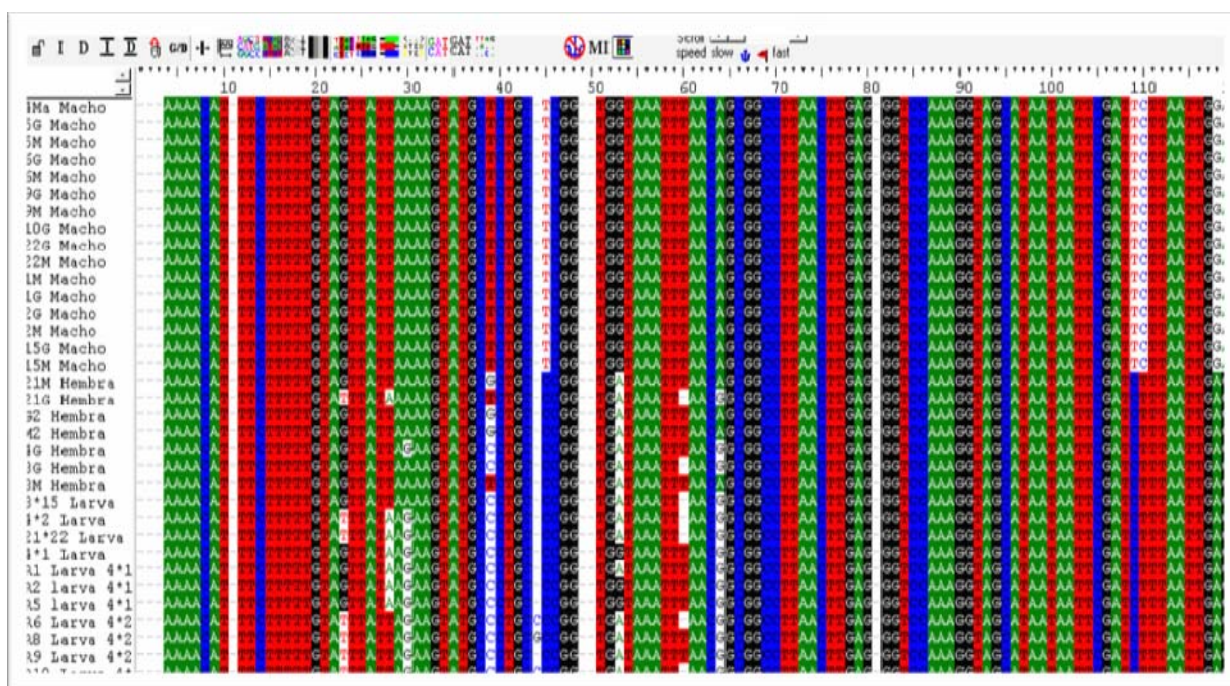


Figura 9: Alineamiento múltiple para 34 muestras de *P. purpuratus*, programa CLUSTAL.

Además, en el alineamiento se observó que en 2 casos las secuencias de las hembras de *P. purpuratus* presentaban ruido en los cromatogramas, específicamente en el ADNmt obtenido de tejido del manto, donde fue posible detectar la presencia de dos genomas, siendo siempre el más predominante y con mayor señal el correspondiente al genoma F, siendo imposible leer correctamente el genoma M. Un ejemplo de este ruido en los cromatogramas es mostrado en la figura 10.

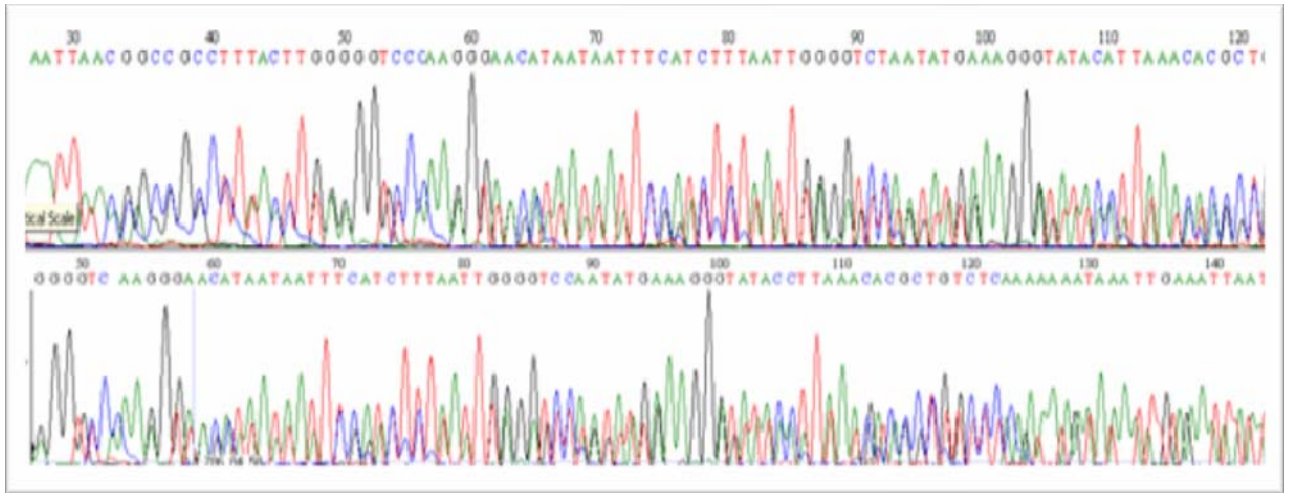


Figura10: Cromatogramas de secuenciaciones correspondiente al tejido de manto de 2 hembras de *P.purpuratus* que muestran el efecto del ruido de dos genomas presentes.

3.4. Diferenciación genética de las Familias de *P. purpuratus*

3.4.1. Variabilidad Genética

3.4.1.1. Indicadores de variabilidad genética para el total de las muestras

Los indicadores de variabilidad genética, en base al total de muestras analizadas de *P. purpuratus* obtenidos del programa DnaSP versión 5.53, determinaron 65 sitios de segregación o sitios polimórficos (S) de los 480 sitios de la secuencia, 15 haplotipos de las 35 secuencias analizadas, una diversidad haplotípica de 0,904 y una diversidad nucleotídica de 0,065.

Al realizar este análisis separado entre familias no se registraron diferencias en los niveles de variabilidad entre cada una de estas (Tabla 2), obteniéndose una cantidad similar de sitios polimórficos y valores de diversidad haplotípica h cercanos a 1 (0,8-0,9).

Por otra parte a través de los análisis obtenidos entre machos y hembras es posible establecer diferencia en los niveles de variabilidad entre ambos, lo cual se observa en la Tabla 2. destacando el elevado número de haplotipos encontrados en el genoma F, de hecho, en 7 genomas mitocondriales de tipo F analizados, se observa la existencia de 6 haplotipos, esto hace que los valores de diversidad haplotípica h calculado sean próximos a 1 (0,952). En el genoma mitocondrial de tipo M, de las 16 secuencias estudiadas solamente existen 5 haplotipos, tales datos hacen que los valores de diversidad haplotípica h sean de 0,675.

Al comparar los indicadores de variabilidad entre tipo de tejido, gónada o manto, se observa que no hay diferencias existiendo 8 haplotipos respectivamente (Tabla 2). Con valores de diversidad haplotípica de 0,06 para el tejido de manto y 0,051 para el tejido de gónada.

Tabla 2. Indicadores de variabilidad genética para las familias, machos, hembras, tejido de manto y Gónada de *P.purpuartus*.

	Familia 1	Familia 2	Familia 3	Familia 4	Hembra	Macho	Manto	Gónada
Largo Secuencia	484	484	484	484	488	488	488	488
S (sitios polimórficos)	60	63	60	61	10	5	65	60
N° haplotipos	4	4	4	4	6	5	8	8
Diversidad haplotípica	0,81	0,64	0,80	0,91	0,95	0,67	0,84	0,89
Desviación estándar	0,13	0,14	0,16	0,16	0,09	0,11	0,10	0,09
Diversidad nucleotídica P:	0,050	0,050	0,070	0,070	0,008	0,003	0,060	0,051
N° promedio nucleótidos diferentes K	28,60	24,40	36	36,30	4,28	1,05	29,16	25,09

3.4.1.2. Indicadores de variabilidad genética de parentales y descendencia.

Los indicadores de variabilidad genética, en base a los parentales y la descendencia de la familia 1 y 2 obtenidos del programa DnaSP versión 5.53, revelan valores similares entre parentales y entre descendencia. (Tabla 3).

Sin embargo uno de los primeros aspectos que destaca en relación con el conjunto de los resultados obtenidos es el alto número de sitios polimórficos encontrado en parentales (59 – 61) respectivamente, mientras que para la descendencia solo se encontró un sitio polimórfico.

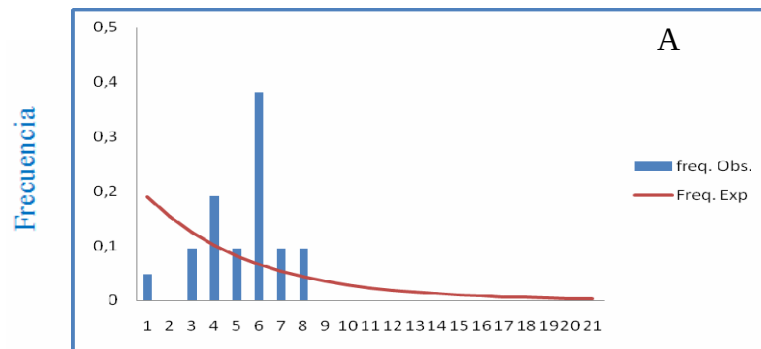
Los valores de diversidad haplotípica h calculado para la descendencia fluctúan entre 0,33-0,5, mientras que en el genoma mitocondrial de los parentales 1 y 2 los valores de diversidad haplotípica h calculado son de 0,667-0,833 respectivamente.

Tabla 3: Indicadores de variabilidad genética para parentales y descendencia de *P. purpuratus*.

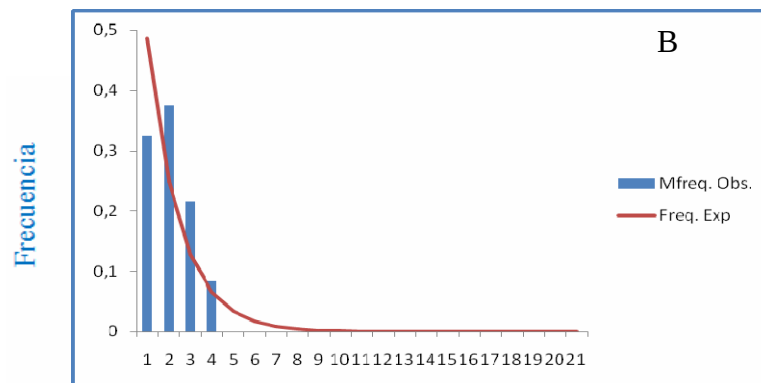
	FAMILIA 1		FAMILIA 2	
	Parentales 1	descendencia 1	Parentales 2	descendencia 2
Largo Secuencia	485	485	485	485
S (sitios polimórficos)	59	1	61	1
Nº haplotipos	2	2	2	2
Diversidad haplotípica	0,66	0,5	0,66	0,33
Desviación estándar	0,31	0,26	0,31	0,21
Diversidad nucleotídica P	0,081	0,001	0,083	0,00069
Nº promedio nucleótidos diferentes K	39,3	0,5	40,6	0,33

3.4.1. 3. Número de mutaciones entre pares de secuencias

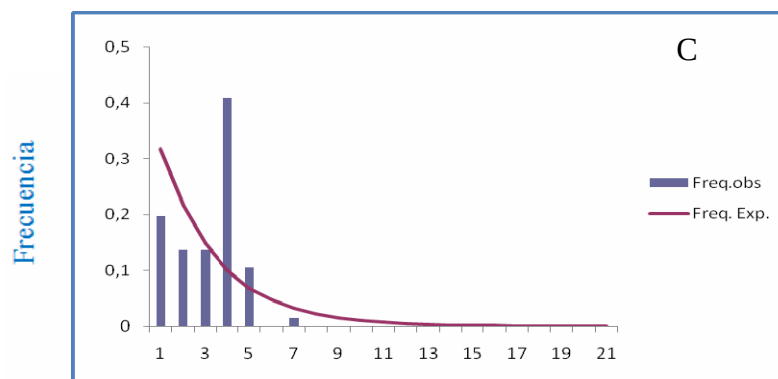
El análisis de frecuencia de individuos en relación con el número de mutaciones entre pares de secuencias permitió detectar que en las siete muestras de hembras de *P. purputaus* analizadas, se observan 8 mutaciones acumuladas en el genoma de estas (Genoma F) (Fig. 11.A), para las 16 muestras de machos se observa que el genoma de estos (Genoma M) presenta 5 mutaciones acumuladas (Fig. 11.B), en relación a las muestras correspondiente a la descendencia a partir de la formación de familias de *P. purpuratus* se observan 7 mutaciones acumuladas de un total de 12 muestras analizadas (Fig. 11.C).



Número de mutaciones entre pares de secuencias



Número de mutaciones entre pares de secuencias



Número de mutaciones entre pares de secuencias

Figura 11: Gráficos de distribución de frecuencias del número de mutaciones entre pares de secuencias para (A) Parentales Hembras (B) Parentales Macho y (C) Descendencia de *P. purpuratus*.

3.4.2. Análisis Filogenéticos.

3.4.2.1. Distancia genética.

En la tabla 4 y 5 se muestran los valores de distancia genética dentro y entre familias, descendencia y parentales, machos y hembras.

Los valores de distancia dentro de parentales y descendencia son muy similares para cada una de estas, encontrándose valores D_{T-N} que van desde 0,062 a 0,068, las familias en cambio presentan valores D_{T-N} que oscilan entre 0,056 – 0,082, mientras que la distancia genética dentro de hembras y machos son muy bajos con valores de D_{T-N} de 0,0066 y 0,0016 respectivamente.

Por otra parte la distancia entre parentales y descendencias indican valores similares en cada uno de estos, siendo los más altos aquellos obtenidos tanto para los parentales v/s descendencia 3*15 y 21*22 con valores de 0,091-0,096. Mientras que en familias los valores D_{T-N} oscilan entre 0,062 y 0,068.

Tabla 4: Distancia genética dentro de familias, parental, descendencia, machos y hembras de *P.purpuratus*, basado en el modelo de Tamura-Nei

	Distancia Dentro
Familia 1 (4*1)	0,073
Familia 2 (4*2)	0,056
Familia 3 (3*15)	0,082
Familia 4 (21*22)	0,082
Parentales 4*1	0,062
Parentales 4*2	0,068
Parentales 3*15	0,065
Parentales 21*22	0,066
Descendencia 4*1	0,065
Descendencia 4*2	0,068
Hembras	0,0066
Machos	0,0016

Tabla 5: Distancia genética entre familias, parentales, descendencia, machos y hembras de *P.purpuratus*, basado en el modelo de Tamura-Nei

	Distancia Entre
Familia 1 v/s Familia 2	0,062
Familia 1 v/s Familia 3	0,068
Familia 1 v/s Familia 4	0,065
Familia 2 v/s Familia 3	0,066
Familia 2 v/s Familia 4	0,065
Familia 3 v/s Familia 4	0,068
Parentales – descendencia 4*1	0,073
Parentales – descendencia 4*2	0,071
Parentales – descendencia 3*15	0,091
Parentales – descendencia 21*22	0,096
Hembras - Machos	0,098

3.4.2.2. Árbol filogenético

En el árbol filogenéticos obtenido tras aplicar los algoritmos de Neighbor-Joining (Fig.12) se puede observar una topología que muestra cluster bien definidos, destacando la agrupación de las secuencias de larvas y hembras en una de ellas y todas las secuencias de machos en otra, con un porcentaje de coincidencia de un 99%, así como también para *Brachidontes* el cual aparece en otro cluster.

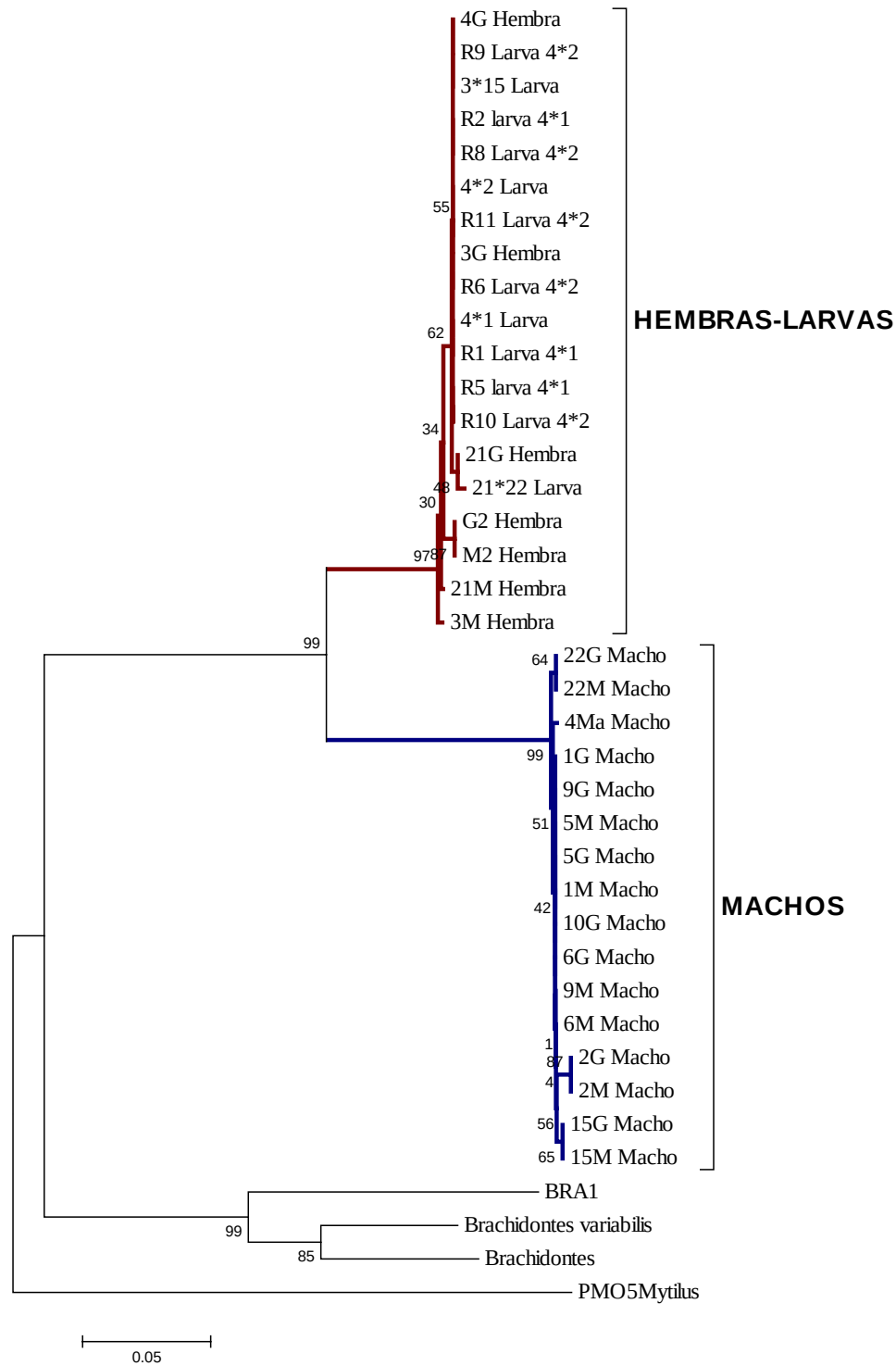


Figura 12: Árbol filogenética de hembras, parentales y descendencias de *P. purpuratus*. Utilizando el metodo Neigbor-joning (Saitou y Nei, 1987). El árbol esta basado en 488 pares de bases de la región 16S.

4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo un análisis basado en secuencias de ADNmt, con el marcador molecular de la región 16S, en muestras de *P. purpuratus* obtenidas a partir de la formación de familias.

De acuerdo a los resultados obtenidos para la generación de familias, solo se logró obtener desoves para tres individuos de un total de 30 individuos colectados, a través de la inducción a la liberación de gametos mediante Shock térmico, esto puede deberse a que la temperatura no es el único factor que permite explicar las diferencias latitudinales de las características reproductivas en los moluscos. (Sastry, 1970; Crump, 1971; Newell y col., 1982; Bricelj y col., 1987; MacDonald y Thompson, 1988). Muchos estudios atribuyen estas variaciones especialmente a la oferta alimenticia local, la cual determina la reserva de nutrientes y por consiguiente la capacidad para iniciar el desarrollo gametogénico. Por tanto la gametogénesis y la emisión de gametos son posibles a cierta temperatura sólo si existen suficientes reservas en el animal o disponibilidad de alimento en su medioambiente inmediato.

Por otro lado un aspecto importante a considerar en los análisis genéticos es la calidad del ADN extraído, es por ello que se debe considerar el origen de la muestra, su proceso de extracción y la concentración que se haya obtenido, con el fin de asegurar la calidad de los productos de la PCR para su posterior secuenciación (Innis y Gelfand, 1991). La determinación de la secuencia de ADN es útil en el estudio de la investigación básica de los procesos biológicos fundamentales, así como en la identificación de especies siendo además utilizadas con éxito en estudios que permiten la reconstrucción de la filogenia y determinación de estructuras poblacionales de diversas especies (Olivares et al, 2006). Lo cual nos ha permitido confirmar que las secuencias de

las muestras obtenidas corresponden a *P. purpuratus*, lográndose además la obtención del fragmento objetivo de análisis en esta especie.

Los alineamientos de las secuencias de hembras y descendencias muestran entre sí una elevada homología, lo mismo sucede en las secuencias de machos. Sin embargo se observó la presencia del genoma F y M en el tejido de manto de algunas hembras de *P. purpuratus*, presentándose el genoma M en menores cantidades. Este fenómeno no es extraño existiendo pruebas de que el genoma F puede invadir la ruta de transmisión del genoma M y sustituir la de este. Por otra parte, también se ha demostrado que algunas veces el tipo de genoma M es descubierto en hembras adultas en varios órganos en cantidades muy bajas (Garrido-Ramos *et al.* 1998), lo que podría estar explicando la presencia de este genoma en el tejido de manto de hembras *P. purpuratus*.

La cantidad de variabilidad genética dentro y entre grupos está determinada por cuatro factores principales: la tasa de mutación, es decir la frecuencia con la que se originan nuevas variantes de un marcador, el tamaño de la población, que determina la tasa de deriva genética, la tasa de migración y la aparición de barreras geográficas u oceanográficas y la selección natural.

Si consideramos además que la variabilidad genética es el resultado de la aparición azarosa de variantes en los diferentes linajes, entonces hay al menos dos factores que la afectan en forma directa. En primer lugar, el tiempo medido en generaciones es el principal agente que opera aumentando la variabilidad solo por azar: a mayor cantidad de generaciones, mayor variabilidad genética, (Hartl y Clark, 1997; Avise, 2000). En segundo lugar, el tamaño poblacional efectivo (N_e) tiene también una principal influencia en dicha variabilidad: a menor N_e , hay menor cantidad de individuos representantes de diferentes matrilineas, por lo cual disminuye la variabilidad genética en el grupo considerado (Hartl y Clark, 1997; Avise, 2000).

Considerando estos procesos y los resultados de indicadores de variabilidad genética obtenidos en general, tanto para hembras y larvas, donde se aprecia una alta cantidad de sitios polimórficos y variabilidad haplotípica, podríamos decir que esto se debe a la mayor tasa de mutaciones observadas en estas (Astorga y Guíñez, 2008.)

Otro de los aspectos que destaca en relación con el conjunto de los resultados obtenidos es el elevado número de haplotipos encontrados en hembras, esta heterocigosidad poblacional, no está en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores que demuestran la existencia de una mayor diversidad de haplotipos M en relación con los F en poblaciones naturales, probablemente debido a la ausencia de presión selectiva que sufre el mitocondrial de tipo M. (Infante, *et al*, 2004).

Por otra parte, al evaluar los parámetros de diversidad génica a nivel nucleotídico obtenidos del análisis de la región 16S del ADNmt de las familias de *P. purpuratus*, se identificaron diferencias en los niveles de variabilidad genética entre descendencia y parentales siendo mayores para parentales que descendencia, estos hechos son interesantes y sugerentes de la situación del estudio. En el caso particular de este estudio, el hecho que los parentales presenten la mayor diversidad nucleotídica, podría explicarse por la presencia de machos con hembras, debido a que estos presentan entre ellos valores muy bajos de variabilidad genética, no siendo así al agruparlos como parentales, entonces esto estaría relacionado con el ingreso de nuevas variantes génicas provenientes de machos y hembras debido a la diferencia de mutaciones acumuladas en estos.

De acuerdo al número de mutaciones entre pares de secuencia observadas en este estudio, se obtuvo una leve tendencia a una mayor cantidad de mutaciones acumuladas en hembras y larvas (genoma F) que en machos (genoma M), lo cual sugiere una historia evolutiva mas reciente para el genoma M, y concuerda con la hipótesis de masculinización del genoma mitocondrial donde el

genoma M del padre puede reemplazar al genoma F en las Hembras (Fisher & Skibinski; 1990; Rawson *et al.* 1996; Garrido- Ramos *et al* 1998; Quesada *et al*, 1999; Ladoukakis *et al*, 2002).

La distancia genética determinada mediante prueba Tamura-Nei presentan valores similares de distancia entre y dentro de las familias, lo que no es extraño debido a que las muestras analizadas proceden del mismo lugar y además se asemejan a los valores de distancias descritos en otros estudios de variabilidad genética de *P. purpuratus*, donde se indican valores de distancia similar, cuando se refiere a individuos procedentes de mismas localidades (Astorga *et al*, 2008)

En los árboles filogenéticos obtenidos se puede observar una topología que muestra agrupaciones (cluster) bien definidas, destacando la agrupación de larvas y hembras en un único clado, lo que podría estar revelando que el modo de herencia para esta especie es la herencia uniparental materna, donde la progenie de ambos sexos heredaría el genoma mitocondrial de su madre, no observándose el modo de herencia definido por Zouros *et al.* (2004), como doble herencia uniparental (DIU), en el que existen dos genomas mitocondriales que se transmiten uno por vía materna (genoma F), y otro por vía paterna (genoma M), el que además ha sido demostrado en algunas familias de Bivalvos (Mizi *et al.* 2005). Sin embargo, teniendo en cuenta las numerosas excepciones a la pauta de herencia descrita en cruzamientos híbridos, la existencia de machos que sistemáticamente no transmiten el genoma M y la ausencia del genoma M en el 24% de los machos, se ha mostrado que la doble herencia uniparental no está directamente implicado en la determinación del sexo, además esto se puede deber a que el análisis de la descendencia corresponden a larvas, las cuales no han realizado el desarrollo de sus gónadas, donde dependiendo de su sexo en estado adulto, serán capaces de presentar otro genoma, lo cual no se comprueba en esta investigación.

Por otra parte en los análisis de agrupación filogenética fue posible establecer una separación de los genomas mitocondriales de individuos machos v/s hembras de esta especie. Por lo que se afirma la posible presencia de dos genomas mitocondriales en estos productos de recombinación (Astorga y Guiñez, 2008.), lo cual explicaría la separación de ambos sexos en su similitud genética.

Con el propósito de lograr una mayor comprensión del modo de herencia presente en la descendencia de familias de *Perumytilus purpuratus*, se recomienda hacer análisis de descendencia hasta el estado adulto, para así corroborar si dependiendo de su sexo en este estado son capaces de presentar otro genoma. Una situación que a nuestro conocimiento no ha sido documentada ni investigada.

CONCLUSIÓN

Los resultados principales del presente estudio se pueden resumir en las siguientes conclusiones:

- se logró generar cuatro familias genéticas a partir de los tres desoves obtenidos.
- se logró conocer y manejar metodologías moleculares de extracción de ADN, amplificación por PCR y análisis de secuencias de ADN a partir de su caracterización genética. Además, se aplicaron y estandarizaron estas metodologías moleculares en diferentes tipos de muestras de *Perumytilus purpuratus*, con el objetivo de definir la adecuada obtención de datos genéticos para determinar el modo de herencia de esta especie a partir de la formación de familias genéticas
- El alineamiento que se obtuvo para las cuatro muestras coincidió con secuencias de otras especies de los géneros *Brachidontes* y *Mytilus*, lo cual nos ha permitido confirmar la correcta obtención del fragmento objetivo de análisis en esta especie.
- A partir de los análisis de caracterización genética se observó:
 - segregación de individuos de *Perumytilus purpuratus* en base a su genoma mitocondrial
 - diferenciación en dos genomas mitocondriales, un genoma F y un genoma M
 - Las larvas de *P. purpuratus* tendrían un modo de herencia uniparental materna, no observándose el modo de herencia definido por Zouros *et al.* (2004), como doble herencia uniparental (DIU).

5. BIBLIOGRAFIA

ALVARADO, J. & CASTILLA, J. 1996. Tridimensional matrices of *Perumytilus purpuratus* on intertidal platforms with varying wave forces in central Chile. Marine Ecology Progress Series, 133, 135-141.

ASTORGA M.P, AGUIRRE, M. GUIÑEZ, R. 2008. *Perumytilus purpuratus* or *Brachidontes purpuratus* at the Chilean and Argentine coasts? Genetical, ecological and paleontological precedents. Biological Research. R-47.

ASTORGA & GUIÑEZ. 2008. Evidence for mtDNA recombination in the mussel *Perumytilus purpuratus*. Biological research R-132.

AVISE, J.C., ARNOLD, J., BALL, R.M., BERMINGHAM, E., LAMB, T., NEIGEL, J.E., REEB, C.A., Y SOUNDES, N.C. 1987. Intraespecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. 18:489-522.

AVISE, J.C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press. 447pp.

BIRKY, JR., C. W., T. MARUYAMA and P. FUERST, 1983 An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics*.

BIRKY, JR., C. W., 1995 Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11331–11338.

BRICELJ, V.M. EPP, J. y R.E. MALOUF. 1987. Intraspecific variation in reproductive cycles of the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 36: 123-137

BROWN, J. M., COLBOURN, E. A., WATSON, J. K. G., & WAYNE, F. D. 1979, *J. Mol. Spectrosc.*, 74, 294.

CRUMP, R. G. 1971. Annual reproductive cycles in three geographically separated populations of *Patiriella regularis* (Verrill) a common New Zealand asteroid. (L). *Exp. Mar. Biol. Ecol.* 72:137-162.

DOYLE, JJ. & DOYLE, JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.

FISHER C, SKIBINSKI DOF (1990) Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 242:149–156.

FRÉCHETTE, M; LEFAIVRE, D. 1990. Discriminating between food and space limitation in benthic suspension feeders using self-thinning relationships. *Marine Ecology-progress series* 65 (1): 15-23.

GARRIDO-RAMOS, M., D.T. STEWART, B.W. SUTHERLAND, AND E. ZOUROS. 1998. The distribution of male-transmitted and female-transmitted mitochondrial DNA types in somatic tissues of blue mussels: Implications for the operation of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genome* 41: 818-824

GUIÑEZ, R. 1996. Dinámica poblacional del chorito maico, *Perumytilus purpuratus* (Lamarck 1819) (Bivalvia: Mytilidae), en gradientes de exposición al oleaje. Ph. D. Thesis, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 213 pp.

GUIÑEZ R. & CASTILLA J. C. 1999. A tridimensional self-thinning model for multilayered intertidal mussels. *American Naturalist* 154: 341-357.

HALLTA, R.1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 41: 95-98

HARTL, D.L, Y CLARK A.G. 1997. Principles of Population Genetics. 3er Edición. Sinauer Associates. 542pp.

INFANTE, C; MANCHADO, M; CATANESE, G. 2004. Estudio preliminar sobre la variabilidad genética del ADN mitocondrial en distintas poblaciones naturales de mejillones (*Mytilus spp.*) a lo largo de las costas de andaluzas . Biological research. R- 130.

INNIS, M.A. & GELFAND D.D. 1991. PCR Protocols: A Guide to methods and applications. Academics Press, New York. 185 pp.

LADOUKAKIS, E.D., y E. ZOUROS, E., 2001 Direct evidence for homologous recombination in mussel (*Mytilus galloprovincialis*) mitochondrial DNA. Mol. Biol. Evol. 18: 1168–1175.

LADOUKAKIS, E. D., C. SAAVEDRA, A. MAGOULAS, and E. ZOUROS, 2002 Mitochondrial DNA variation in a species with two mitochondrial genomes: the case of *Mytilus galloprovincialis* from the Atlantic, the Mediterranean and the Black Sea. Mol. Ecol. **11**:755-769

LANCELOTI, D.A & VÁSQUEZ ,J.A. 2000. Zoogeografía de macroinvertebrados bentónicos de la costa de Chile: contribución para la conservación marina. Revista Chilena de Historia Natural 73: 99-129.

MACKDONALD, B.A. y R.J.THOMPSON. 1985 Influence of temperature and food availability on the ecological energetics of the giant scallop *Placopecten magellanicus* II reproductive output and total production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 25:295-303.

MARTÍNEZ, P. Y FIGUERAS A. 2007 Genética y Genómica en Acuicultura Serie: Publicaciones científicas y tecnológicas del Observatorio Español de Acuicultura. CSIC. 889 págs.

MIZI, A. ZOUROS, E. MOSCHONAS, N. RODAKIS, G. 2005. The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: implications for the doubly uniparental inheritance mode of mtDNA. *Mol Biol Evol* 22:952–967.

NEWELL, R.C. y G.M. BRANCH. 1980. The influence of temperature on the maintenance of metabolic energy balance in marine invertebrates. *Adv. Mar. Biol.* 17:329-396.

OKAMURA, B. 1986. Group living and effect of spatial position in aggregations of *Mytilus edulis*. *Oecologia* 69: 341-347.

OLIVARES, A., QUINTEIRO, J. & REY- MENDEZ, M. 2006. Autenticación de lapas del genero *Fissurella* (Mollusca: Vetigastropoda) en la costa chilena, mediante PCR RFLP. *Investigaciones Marinas* 34 (1):113-118.

OSORIO, C. & N. BAHAMONDE. 1968. Los moluscos bivalvos en las pesquerías nacionales chilenas. *Biología Pesquera* (Chile), 3: 69-128.

PAREDES C & J TARAZONA. 1980. Las comunidades de mitílidos del mediolitoral rocoso del departamento de Lima. *Revista Peruana de Biología* 2 (1): 59-71.

QUESADA, H., R. WENNE, and D. O. F. SKIBINSKI, 1999 Interspecies transfer of female mitochondrial DNA is coupled with role-reversals in the mussel *Mytilus trossulus*. Mol. Biol. Evol. **16**:655-665.

RAMORINO L & CAMPOS B (1979) Desarrollo larval y postlarval de *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1919). Bivalvia: Mytilidae. Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso 12: 207-218.

RAWSON, P.D and HILBISH, T.H., 1995. Evolutionary relationships among the male and female mitochondrial DNA lineages in the *Mytilus edulis* species complex. Mol Biol Evol 12:893–901

ROKAS A, LADOUKAKIS, E, ZORROS, E. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. Trends Ecol. Evol. 2003

ROZAS, J. & LIBRADO, P. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452 | doi: 10.1093/bioinformatics/btp187.

SAITOU, N AND NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.

SASTRY, A. N. 1970. Reproductive physiological variation in the latitudinally separated populations of the bay scallop *Aequipecten irradians*. Biol. Bull. 138: 56-65.

SIMON, C, F. FRATI, A. BECKENBACH, B. CRESPI, H. LIU AND P. FLOOK. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers, *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87), pp. 651–701.

SKIBINSKI, D.O.F., C. GALLAGHER, and C.M. BEYNON. 1994. Sex-limited Mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics* 138: 801-809.

STEWART, D.T, SAAVEDRA. C, STANWOOD RR, BALL, A.O, ZOUROS, E. 1995. Male and female mitochondrial DNA lineages in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group. *Mol Biol Evol* 12:735–747.

SUCHANEK TH. 1986. Mussels and their role in structuring rocky shore communities. En: Moore PG & R Seed (eds) *The ecology of rocky coasts*: 70-96. Columbia University Press, New York, New York, USA.

TAMURA, K. DUDLEY, J. NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.

THOMPSON JD., DG. HIGGINS & T.J. GIBSON. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, , Vol. 22, No. 22 4673-4680.

WILSON, A. C., R. L. CANN, S. M. CARR, M. GEORGE, and U. B. GYLLENSTEIN *et al.*, 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. Biol. J. Linn. Soc. **26**:375-400.

ZOUROS, E., A.O. BALL, C. SAAVEDRA, K.R. FREEMAN, 1994. A new type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A. 91, 7463–7474.