



Universidad Austral de Chile

Instituto de Acuicultura

INFORME FINAL

CONTRATO DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS PROYECTO BIENES PÚBLICOS  
COD. 12BPC2-13497

“ANÁLISIS GENÉTICO-MOLECULAR DE  
INDIVIDUOS DE MEJILLÓN MYTILUS  
CHILENSIS EN BASE A GENOTIPIFICACIÓN DE  
REGIONES HIPERVARIABLES”

Proyecto: “Modelo de gestión para áreas proveedoras de  
semillas de mejillón”

Dra. Marcela Astorga

Dra. (c) Andrea Valenzuela Oñate

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

## INTRODUCCIÓN

El presente documento corresponde al informe final basado en análisis genético-molecular de individuos de mejillón chileno (*Mytilus chilensis*; Hupe, 1854) en base a genotipificación de regiones hipervariables (microsatélites), correspondiente al convenio de subcontratación para prestación de servicios genéticos asociado al proyecto CORFO 12BPC2-13497 titulado “Modelo de gestión para áreas proveedoras de semillas de mejillón”, el cual fue firmado en septiembre de 2012. Abarca desde el periodo de inicio del convenio, proceso iniciado en septiembre de 2012 y concluido con las firmas y envío de copias en octubre de 2012, hasta el término del proyecto, agosto 2014.

En base al punto segundo del convenio de subcontrato, se entrega unos de los productos definidos, correspondiente a:

- Un documento final que incluye las zonas de origen de semillas y adultos de *Mytilus chilensis* procedentes desde el Estuario de Reloncaví y de la comuna de Hualaihué, con los respectivos análisis genético-moleculares que permitan establecer la conectividad genética entre semilleros y bancos naturales del mejillón chileno entre las zonas estudiadas.

Este documento incluye:

- a) Resultados de extracción de ADN
- b) Amplificación de microsatélites para las muestras obtenidas
- c) Genotipificación de los bancos naturales y semilleros definidos por este proyecto
- d) Análisis estadístico de las relaciones genéticas.

#### e) Conclusiones finales

Por lo tanto, este informe final incorpora los resultados de los análisis genéticos para los cuatro semilleros y cuatro bancos naturales del Seno de Reloncaví y comuna de Hualaihué, que permitieron responder el objetivo específico 1, a través de la comparación de la distribución de la variabilidad genética entre juveniles y adultos de *M. chilensis*, el cual corresponde a:

#### OBJETIVO ESPECÍFICO N° 1

- Establecer patrones genéticos de relación entre semillas (juveniles) y adultos (bancos naturales) de *Mytilus chilensis*, provenientes desde el Estuario del Reloncaví, sector de Hualaihué y Seno del Reloncaví, a través de genotipificación de microsatélites de ADN.

## RESULTADOS

### OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se obtuvieron muestras de semillas (juveniles) y adultos (bancos naturales) de *M. chilensis* entre un rango de 30 a 50 individuos tomados al azar desde los lugares de muestreo, ya sean centros de captación de semillas y bancos naturales del Estuario de Reloncaví, Pichicolo-Hornopiren y Seno de Reloncaví (Fig. 1). A un total de 30 individuos se le extrajo borde del manto, el que fue almacenado en tubos eppendorf con etanol al 70% para su posterior análisis genético en el laboratorio de Ciencias Biológicas de la Universidad Austral de Chile, Sede Puerto Montt. Además, se identificó sexo y registro de longitud valvar (mm) de los individuos muestreados. El resto de los individuos fue almacenado a -24 °C como réplica de respaldo.

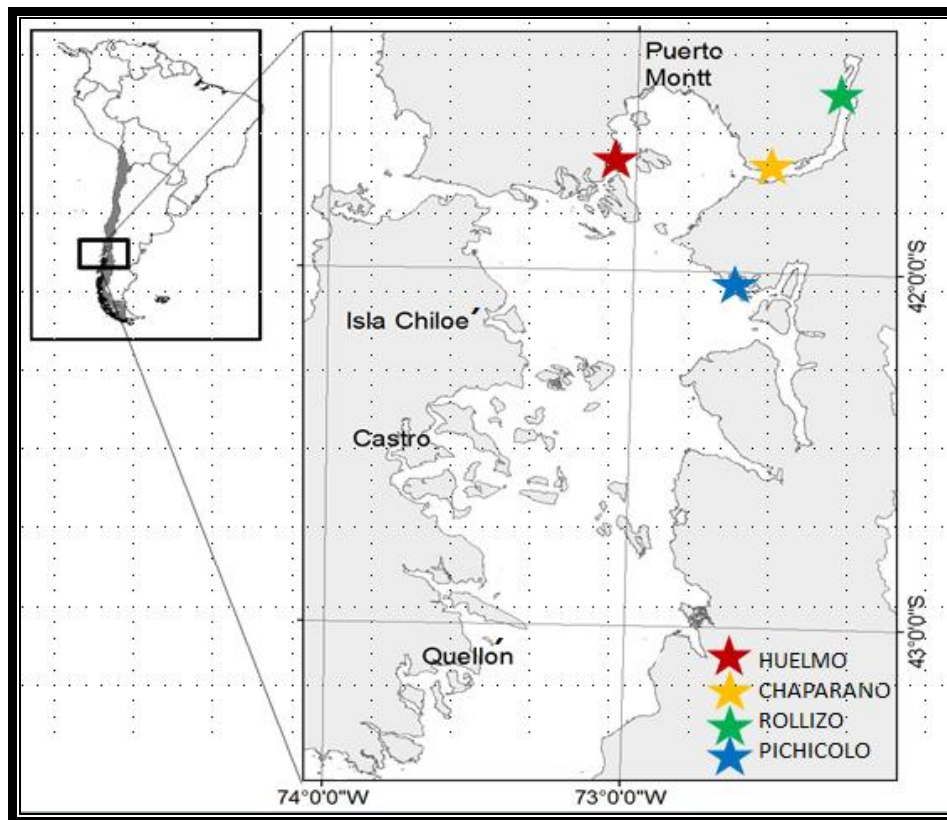


Figura 1: Sectores de recolección de individuos juveniles y adultos de *M. chilensis* en el Seno de Reloncaví, Estuario de Reloncaví, Pichicolo-Hornopiren.

Los individuos recolectados fueron rotulados según el lugar de muestreo y al estado de desarrollo ontogénico al cual pertenecían, junto con el registro de la fecha de toma de muestra (Tabla 1).

Tabla 1. Registro de la toma de muestras de especímenes juveniles y adultos de *M. chilensis* en las diferentes zonas de muestreo.

Especie	Estado	Localidad	Sector	Coordenadas	Código	Fecha
<i>M. chilensis</i>	Juvenil	Estuario	Rollizo	41°27'S; 72°20'O	RO-1J	28-12-2012
	Adulto	Reloncaví			RO-1A	28-12-2012
<i>M. chilensis</i>	Juvenil	Estuario	Chaparano	41°44'S; 72°34'O	CHA-1J	28-12-2012
	Adulto	Reloncaví			CHA-1A	09-01-2013
<i>M. chilensis</i>	Juvenil	Pichicolo	Pichicolo	42°1'S; 72°35'O	PI-1J	28-12-2012
	Adulto	Hornopiren			PI-1A	28-12-2012
<i>M. chilensis</i>	Juvenil	Seno	Huelmo	41°38'S; 73°5'O	HU-1J	04-01-2013
	Adulto	Reloncaví			HU-1A	04-01-2013

## RESULTADOS DEL ANÁLISIS MOLECULAR

**Extracción de ADN:** se realizó la extracción de ADN a través del tejido de manto de los individuos recolectados, utilizando el protocolo del kit de extracción Omega de ADN para moluscos.

La integridad de la extracción de ADN se observó mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 0,8%, teñido con Sbyr safe (10 mg mL<sup>-1</sup>), en Buffer TAE 1x, y su posterior visualización a través de un transiluminador UV y fotografiadas con una cámara digital.

Realizándose la totalidad de 240 extracciones de ADN para los dos estadios de desarrollo ontogénico de la especie *M. chilensis*, de todos los sectores comprometidos en el presente estudio (Tabla 2):

Tabla 2: Número total de extracciones de ADN realizadas a individuos juveniles y adultos de *M. chilensis*.

Especie	Estado	Sector	Código	Nº muestra	Total extraídas
<i>M. chilensis</i>	Juvenil	Rollizo	RO-1J	30	30
	Adulto		RO-1A	30	30
<i>M. chilensis</i>	Juvenil	Chaparano	CHA-1J	30	30
	Adulto		CHA-1A	30	30
<i>M. chilensis</i>	Juvenil	Pichicolo	PI-1J	30	30
	Adulto		PI-1A	30	30
<i>M. chilensis</i>	Juvenil	Huelmo	HU-1J	30	30
	Adulto		HU-1A	30	30
			TOTAL	240	240

**Amplificación de ADN:** para llevar a cabo el análisis genético se evaluaron 9 *loci* de microsatélites diseñados específicamente para *M. chilensis* (Ouagajjou *et al.*, 2011). Para la reacción de PCR se utilizó 1 µL de ADN genómico (50 ng µL<sup>-1</sup>), PCR–buffer 1x, dNTPs 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 25 mM,

partidor sentido y antisentido 10  $\mu\text{M}$ , 1 unidad de Taq ADN polimerasa (0,2  $\mu\text{L}^{-1}$ ) en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ . La amplificación se llevó a cabo con las siguientes condiciones: denaturación inicial 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de denaturación a 95°C por 40 s, alineamiento de partidores a 50°C por 40s y una fase de extensión a 72°C por 1 min. Al finalizar se realizó una extensión de 10 min a 72°C. El producto de amplificación fue conservado a 4°C. Para su corroboración, fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%) teñido con Sbyr safe (10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ), en Buffer TAE 1x. Se incluyó un patrón estándar (Ladder 100 bp, Invitrogen), que permitió discriminar de acuerdo a su peso molecular y fueron visualizados en un transiluminador UV con un sistema de fotodocumentación digital. El producto amplificado fue leído en un secuenciador automático y evaluados mediante el software Peak Scanner v.1.0.

Al finalizar el proyecto, se logró obtener productos de amplificación de ADN para los 30 individuos de las localidades de Huelmo, Chaparano, Pichicolo y Rollizo, tanto para los estadios de juveniles (semilla) y adultos (bancos naturales) de *M. chilensis*, resultando en un total de 240 individuos evaluados a partir de 9 regiones hipervariables de microsatélites específicos para la especie. Dando un total 2160 amplificaciones a partir de los *loci* MCH1, MCH2, MCH3, MCH4, MCH5, MCH6, MCH8, MCH9, MCH10 (Tabla 3). Tales amplificaciones fueron enviadas a genotipificar en dos grupos: el primer grupo corresponde al grupo A, en donde se incluyeron los loci MCH3, MCH4, MCH5, MCH6 y MCH8, y en el segundo, denominado grupo B, se incluyeron los loci MCH1, MCH2, MCH9 y MCH10.

Para corroborar el producto amplificado de ADN, se realizó la visualización mediante geles de agarosa (1,5%) de muestras aleatorias del total de las analizadas en el laboratorio.

Tabla 3. Número de amplificaciones realizadas a partir de 9 *loci* de microsatélites específicos para individuos de *M. chilensis*.

Localidad	Estado	N° Individuos	<i>Loci</i> evaluados	Amplificaciones
Huelmo	Juvenil	30	9	270
	Adulto	30	9	270
Chaparano	Juvenil	30	9	270
	Adulto	30	9	270
Rollizo	Juvenil	30	9	270
	Adulto	30	9	270
Pichicolo	Juvenil	30	9	270
	Adulto	30	9	270
			Total	<b>2160</b>

Una vez genotipificadas las muestras, se procedió a la lectura de alelos a través del programa Peak Scanner v.1.0, el cual permitió observar si el producto amplificado de ADN corresponde a un individuo heterocigoto u homocigoto para el locus en cuestión, y además permite establecer el tamaño de los alelos observados (Fig.2).



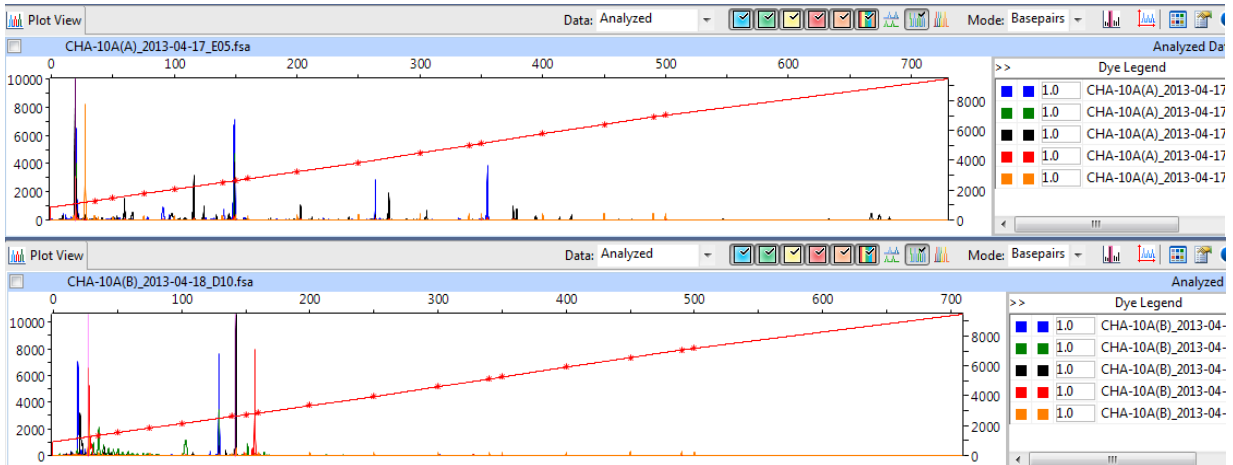


Figura 2: Lectura de alelos a través del software Peak Scanner v.1.0.

Posteriormente, una vez leídos los alelos de los individuos analizados, se registraron los tamaños de alelos en una planilla Excel para cada *loci* evaluado. A continuación, se llevaron los datos a una aplicación de macros de Excel denominada Flexibin (Fig.3), que encajonó los datos dentro de un rango según los decimales registrados, para definir los tamaños de alelos para cada locus.

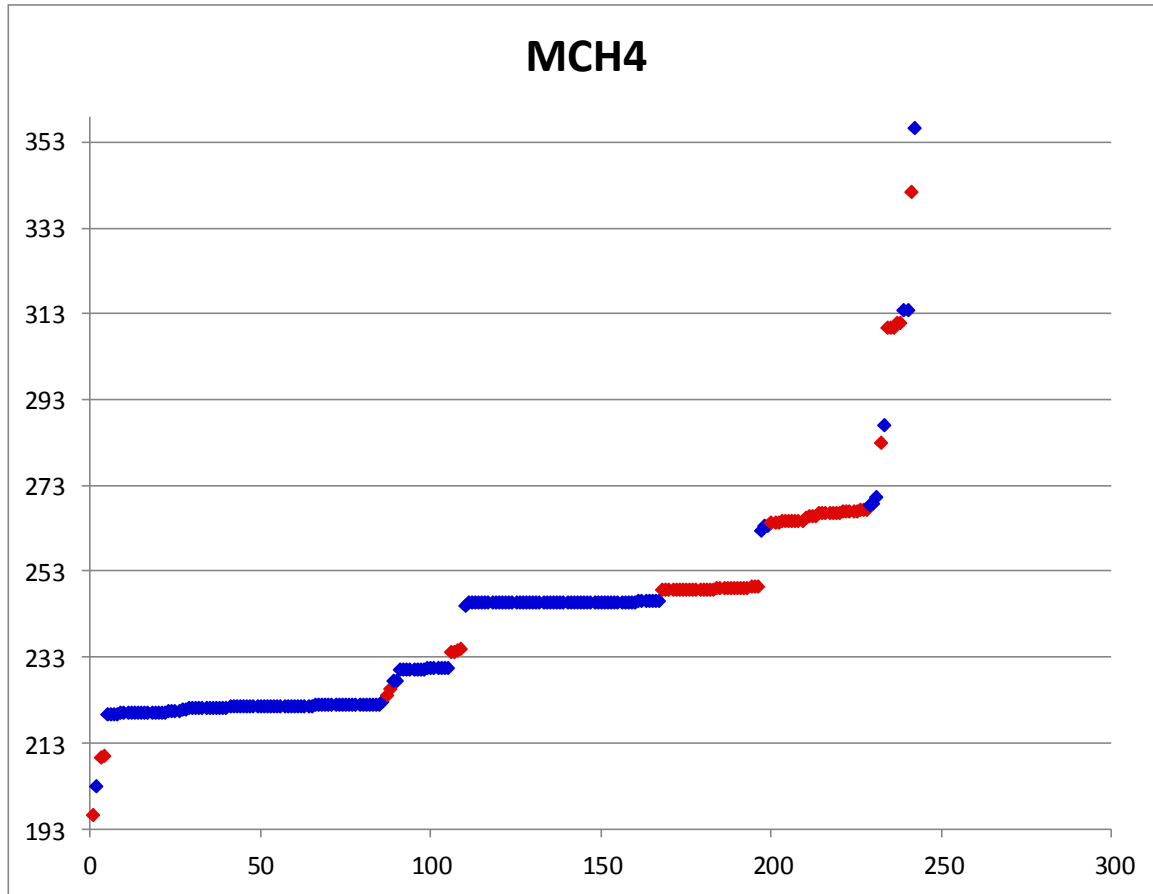


Figura 3: Ejemplo del número de alelos encontrados por la aplicación Flexibin para un locus en cuestión.

*Análisis estadísticos:* Para estimar la presencia de alelos nulos, posibles corrimientos en el tamaño de bandas, amplificación predominante de alelos pequeños, y eventuales errores tipográficos, se utilizó el software MICROCHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Se evaluó el ajuste al modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias alélicas de cada locus polimórfico, para lo cual se utilizó una prueba exacta de Fisher, a través de cadena de Markov.

A partir de los genotipos que se identificarán en cada localidad se obtuvieron los niveles de variabilidad genética expresada en términos de números de alelos, heterocigosidad esperada, heterocigosidad observada según Nei (1978), índice de fijación ( $F_{is}$ ) y AFC 3D sobre poblaciones usando los programas Genetix v.4.03 (Belkhir *et al.*, 2004) y ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

Se determinó las diferencias genéticas en las frecuencias alélicas entre localidades mediante el programa ARLEQUIN ver. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) y GENEPOP 4.0 (Raymond y Rousser, 1995).

La diferenciación genética poblacional será evaluada en base a dos análisis: (i) la distribución alélica en las diferentes localidades mediante una prueba exacta de Fisher y (ii) los valores de  $F_{st}$  para cada localidad. Ambos estadísticos genéticos serán obtenidos mediante los programas GENEPOP v.1.2 (Raymond y Rousset, 1995) y ARLEQUIN ver.3.1. (Excoffier *et al.*, 2005).

Para establecer la probabilidad de cada individuo de ser asignado a una población, en base a su genotipo multilocus, se realizó prueba de asignaciones mediante el programa GeneClass (Cournet *et al.* 1999). El procedimiento utilizado para la asignación fue estimación de la verosimilitud y probabilidad de pertenecer a cada población mediante el método bayesiano.

## Indicadores de diversidad genética

Los descriptivos genéticos obtenidos a partir de la genotipificación de los nueve *loci* de microsatélites seleccionados, permitieron observar que los individuos adultos procedentes del sector de Huelmo son los que presentan el mayor número de alelos por locus (7,38), y los individuos juveniles de Pichicolo son los que presentan el valor más bajo de número de alelos por locus (4,67), en comparación al resto de las localidades. Del mismo modo, la heterocigosidad observada y esperadas según el equilibrio Hardy-Weinberg, indicaron que los mayores valores de heterocigosidad observada fueron dados por los individuos adultos del sector de Pichicolo ( $H_o=0,78$ ), y los valores más bajos por los individuos adultos del sector de Chaparano ( $H_o=0,59$ ). En relación al rango alélico, se repite el mismo patrón observado para el número de alelos por locus entre los individuos adultos de Huelmo y juveniles de Rollizo, en torno a los valores máximos (75,50) y mínimos (50,67) encontrados. (Tabla 4).

Tabla 4. Descriptivos genéticos obtenidos a partir de los 9 *loci* polimórficos para individuos juveniles y adultos de *M. chilensis* de los diferentes sectores muestreados.

Localidad	Estado	Nº alelos	$H_o$	$H_e$	Rango alélico	
Huelmo	Juvenil	Promedio	6,67	0,68	0,68	56,22
		Des. Est.	2,60	0,20	0,20	30,81
	Adulto	Promedio	7,38	0,68	0,71	75,50
		Des. Est.	1,77	0,19	0,13	31,33
Chaparano	Juvenil	Promedio	7,00	0,65	0,66	60,67

		Des. Est.	2,87	0,27	0,22	41,41
	Adulto	Promedio	6,22	0,59	0,60	54,67
		Des. Est.	2,39	0,31	0,26	43,08
	Juvenil	Promedio	6,11	0,73	0,63	62,22
		Des. Est.	2,21	0,33	0,18	38,75
Rollizo	Adulto	Promedio	5,67	0,71	0,62	56,89
		Des. Est.	1,50	0,31	0,20	42,38
	Juvenil	Promedio	4,67	0,70	0,55	50,67
		Des. Est.	1,87	0,35	0,28	43,19
Pichicolo	Adulto	Promedio	6,00	0,78	0,65	53,67
		Des. Est.	2,65	0,17	0,15	43,19

---

### Estadísticos $F$ (Wright)

Al analizar los estadísticos  $F$  de Wright, el coeficiente de endogamia  $F_{is}$ , que mide la reducción en heterocigosis de un individuo debido al apareamiento no al azar dentro de una subpoblación, o dicho de otra forma, se define como la probabilidad de que dos alelos en un individuo sean idénticos por descendencia respecto a la subpoblación, donde el valor de éste índice varía entre -1 y 1, indicando los valores negativos exceso de heterocigotos, respecto al equilibrio Hardy Weinberg, y los positivos, deficiencia de heterocigotos, se observa que al comparar los individuos de *M. chilensis* de las cuatro localidades y los dos estadios de desarrollo ontogenético, se presentaron valores de  $F_{is}$  total de -0,0865, sugiriendo un exceso de heterocigotos producto de los apareamientos al azar entre los individuos dentro de cada localidad (Huelmo, Rollizo, Chaparano y Pichicolo). Por otro lado, el índice de fijación  $F_{st}$ , que mide el efecto de la subdivisión poblacional, es decir, la reducción de la

heterocigosidad en una población debido a la deriva genética, o que también se entiende como la correlación de alelos de diferentes individuos en la misma población, variando entre cero y uno. El valor cero indica panmixia, es decir, que no existe subdivisión, dándose apareamientos aleatorios, no produciéndose divergencia genética en la metapoblación. El valor de uno indica aislamiento completo, es decir, una subdivisión extrema de la metapoblación. Para nuestro estudio el valor de  $F_{st}$  es de 0,0733 con un  $p < 0,05$ , lo que sugiere que los individuos de las diferentes localidades se estarían diferenciándose genéticamente de manera reducida (Tabla 5).

Tabla 5. Estadísticos  $F$  de Wright para los todos los individuos juveniles y adultos de *M. chilensis* procedentes del Seño y Fiordo de Reloncaví y de la comuna de Hualaihué.

Locus	Estadísticos $F$		
	$F_{is}$	$F_{st}$	$F_{it}$
MCH1	-0,1481	0,0051	-0,1422
MCH2	-0,1869	0,0505	-0,127
MCH3	-0,2844	0,0224	-0,2557
MCH4	-0,0015	0,0396	0,0381
MCH5	0,1128	0,0740	0,1785
MCH6	0,2442	0,1822	0,3819
MCH8	-0,1240	0,0248	-0,0961
MCH9	-0,3073	0,1478	-0,1141
MC10	-0,1344	0,1962	0,0881
Todos:	-0,0865	0,0733	-0,0069

Al observar los valores de  $F_{st}$  entre localidades y estadios de desarrollo ontogenético se puede observar que, la mayor diferenciación genética estaría siendo aportada por los individuos juveniles y adultos de Pichicolo en relación a los individuos juveniles y a adultos de Huelmo y Chaparano, con altos valores de  $F_{st}$ . De la misma forma, los individuos juveniles y adultos de Rollizo se estarían diferenciando reducidamente con los individuos juveniles de Pichicolo (Tabla 7).

Tabla 7. Índice de fijación ( $F_{st}$ ) entre juveniles y adultos de *M. chilensis* de las cuatro localidades de muestreo.

		Huelmo		Chaparano		Pichicolo		Rollizo	
		Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto	Juvenil	Adulto
Huelmo	Juvenil								
	Adulto	0,0139							
Chaparano	Juvenil	0,0213	0,0384						
	Adulto	0,0264	0,0262	0,0195					
Pichicolo	Juvenil	<b>0,1467</b>	<b>0,1673</b>	<b>0,1332</b>	<b>0,1601</b>				
	Adulto	0,0868	<b>0,1150</b>	0,0781	<b>0,1054</b>	0,0336			
Rollizo	Juvenil	0,0568	0,0468	0,0498	0,0337	<b>0,1223</b>	0,0773		
	Adulto	0,0628	0,0580	0,0580	0,0525	<b>0,1186</b>	0,0682	0,0039	

## Distancia genética

Los resultados obtenidos a partir del  $F_{st}$  pueden ser corroborados al observar el gráfico de distancia genética, en donde tanto los juveniles y adultos de los bancos naturales de Pichicolo se distancian genéticamente de los individuos juveniles y adultos del resto de las localidades. Así como también, los individuos juveniles y adultos de Rollizo se diferencian genéticamente de los individuos juveniles y adultos de Huelmo y Chaparano (Figura 4).

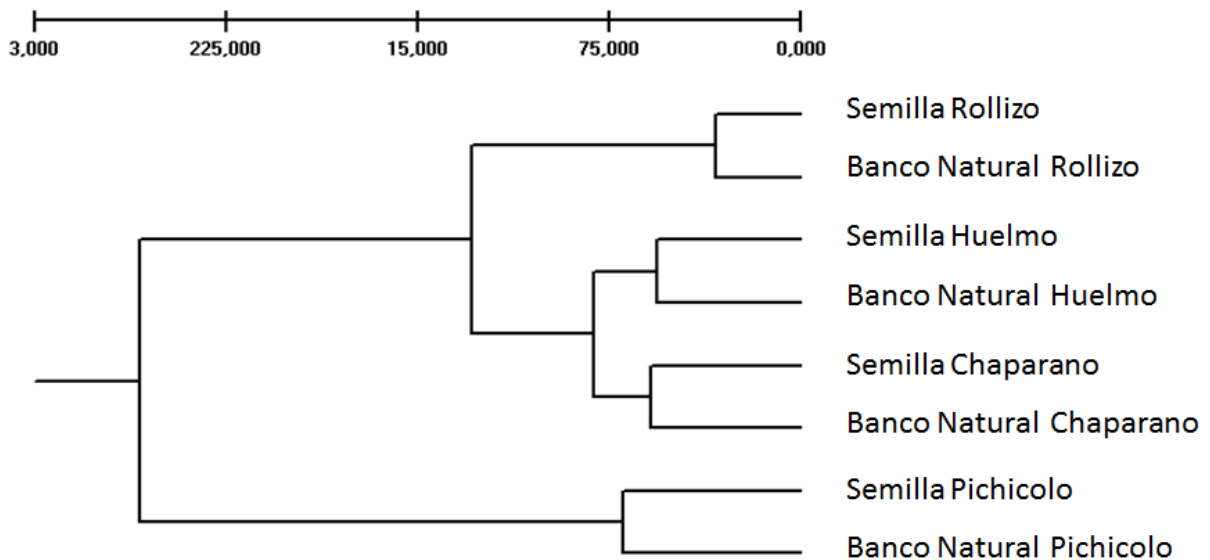


Figura 4. Distancia genética entre individuos juveniles (semilla) y adultos de bancos naturales de las cuatro localidades muestreadas.



## Asignación de individuos

Al realizar el test de asignación entre semillas y adultos de bancos naturales de los sectores de Huelmo, Chaparano, Pichicolo y Rollizo, se puede inferir que en todas las localidades los individuos juveniles (semillas) de *M. chilensis* provienen desde los mismos bancos naturales de cada localidad, sugiriendo que no existiría dispersión de larvas desde otros bancos naturales procedentes ya sea desde el Seno de Reloncaví o de la comuna de Hualaihué. Inclusive, no existiría dispersión larval ni siquiera desde dentro del mismo Fiordo de Reloncaví (Figura 5).

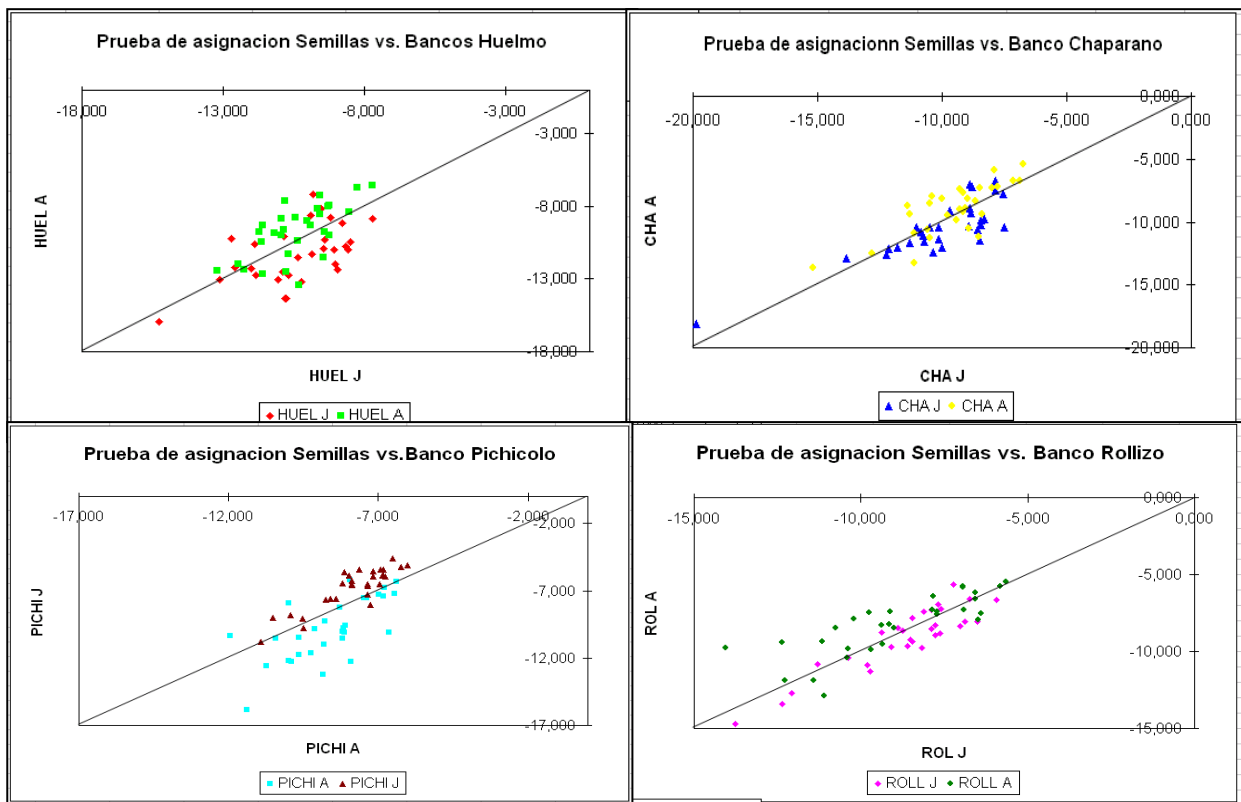


Figura 5. Test de asignación entre individuos juveniles y adultos de *M. chilensis* procedentes desde las cuatro localidades muestreadas.

La diferenciación genética presentada por los individuos juveniles (semillas) y adultos (bancos naturales) del sector de Pichicolo permite observar que, al tratar de asignar las semillas de Chaparano al banco natural de Pichicolo, éstos no se asignan, sugiriendo que las semillas de Chaparano procederían desde otro sector, posiblemente desde el mismo banco natural de Chaparano, según lo observado por el test de asignación de esa localidad. Igualmente, al realizar el test de asignación de semillas de Pichicolo al banco natural de Chaparano, se repite la misma condición, corroborando que los individuos semillas y adultos de los bancos naturales se diferencian genéticamente del resto de las localidades muestreadas (Figura 6).

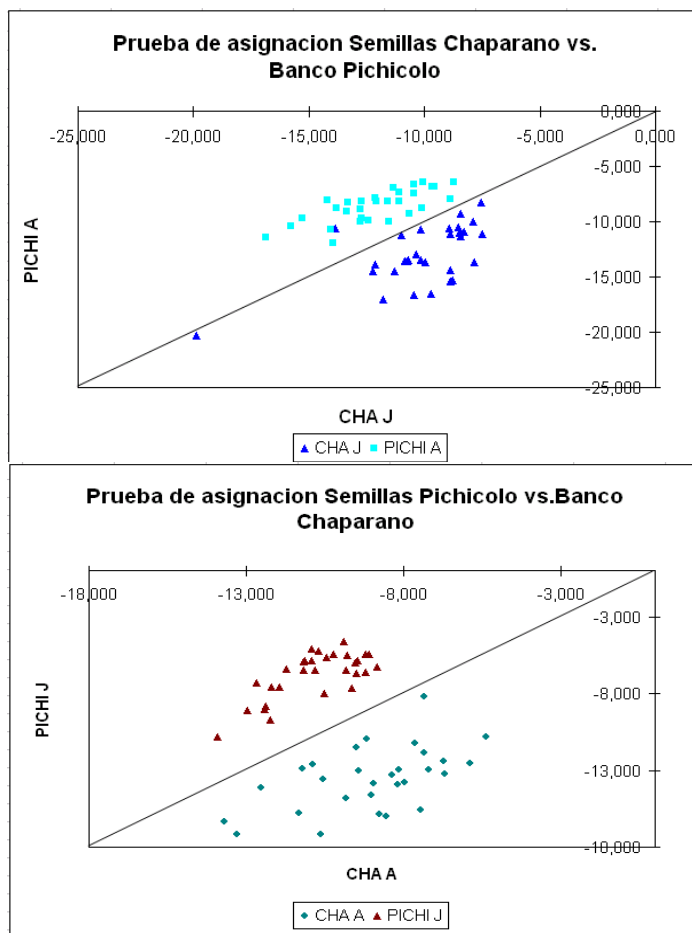


Figura 6. Test de asignación de semillas y adultos de los bancos naturales de Pichicolo con semillas y adultos de Chaparano.

## Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales, muestra que no existiría una mayor agrupación de los individuos, tanto juveniles (semillas) y adultos (bancos naturales) de las localidades de Huelmo, Chaparano y Rollizo. A diferencia de las semillas de Pichicolo, que tienden a agruparse a la izquierda de la coordenada 1, presentando una distribución genética restringida. Los adultos de Pichicolo también tienden a agruparse a la izquierda de la coordenada 1, sin embargo, presentan una distribución un poco más amplia (Figura 7).

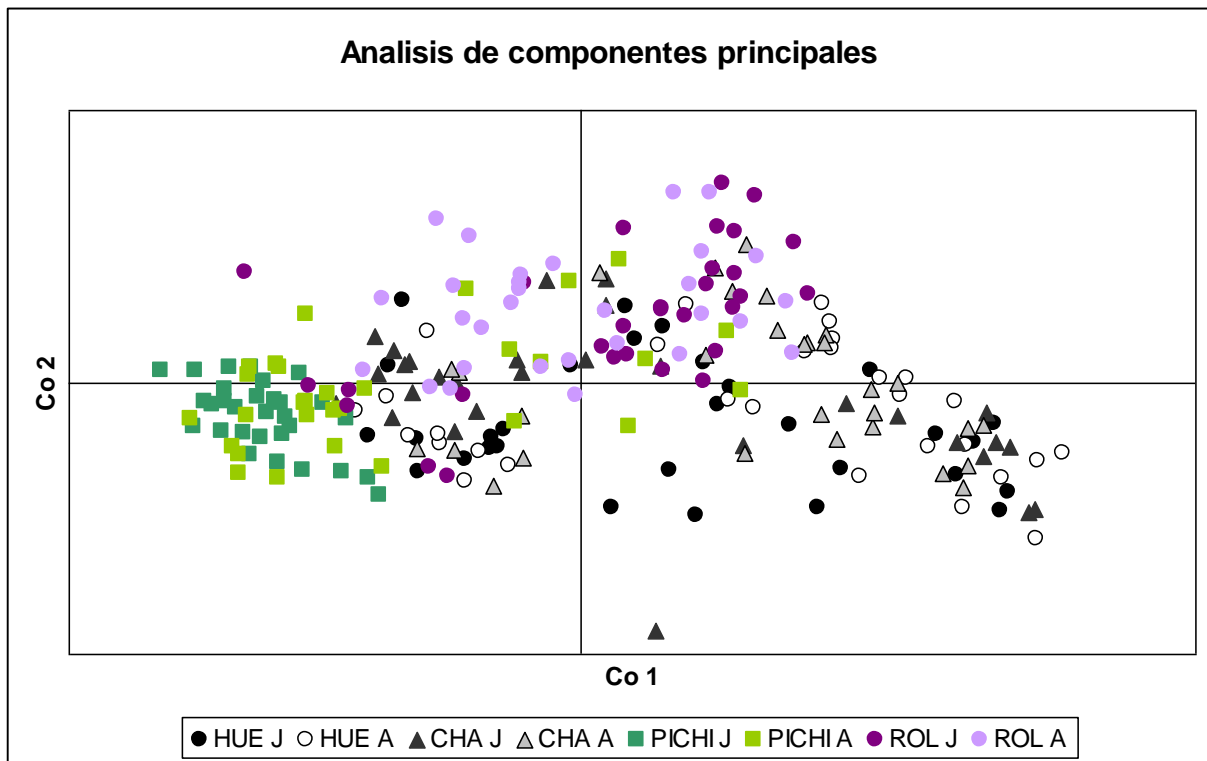


Figura 7. Análisis de componentes principales de las semillas y adultos de los bancos naturales de *M. chilensis* de las cuatro localidades muestreada.

## CONCLUSIÓN.

- Se logró la genotipificación de todas las muestras amplificadas en el trabajo de laboratorio, de las cuatro localidades de estudio.
- Se logró evaluar un alto número de alelos por locus a partir de los 9 *loci* de microsatélites analizados, lo que permite evaluar la distribución de la variabilidad genética de la especie.
- La heterocigosidad promedio observada mostró una marcada diferencia genética entre los individuos adultos de Pichicolo y el resto de las localidades.
- El índice fijación *Fst* sugiere una moderada diferenciación genética entre los individuos de las cuatro localidades, la que podría estar siendo aportada por los individuos adultos de Pichicolo que se diferencian de los individuos juveniles y adultos de Huelmo, Chaparano y Rollizo.
- La mayor diferenciación genética estaría siendo aportada por los individuos juveniles y adultos de Pichicolo en relación a los individuos juveniles y a adultos de Huelmo y Chaparano, con altos valores de *Fst*.
- El análisis de distancia genética mostró que los juveniles y adultos de los bancos naturales de Pichicolo se distancian genéticamente de los individuos juveniles y adultos del resto de las localidades. Así como también, los individuos juveniles y adultos de Rollizo se diferencian genéticamente de los individuos juveniles y adultos de Huelmo y Chaparano.

- El test de asignación indicó que en todas las localidades los individuos juveniles (semillas) de *M. chilensis* provienen desde los mismos bancos naturales de cada localidad, sugiriendo que no existiría dispersión de larvas desde otros bancos naturales procedentes ya sea desde el Seno de Reloncaví o de la comuna de Hualaihué.
  
- Finalmente, se puede concluir que a partir de los resultados obtenidos se observa una leve diferenciación genética entre localidades y destaca una posible diferenciación con la localidad de Pichicolo, observándose que las semillas obtenidas en dicha localidad tienen mayor probabilidad de proceder de su propio banco natural.