



# INFORME TÉCNICO FINAL CORREGIDO

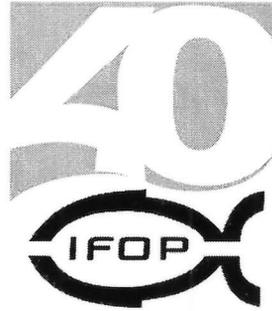
CODIGO: BID - PI - C - 2001-1-M-068

Caracterización  
genética poblacional  
para el manejo y la  
conservación de  
recursos marinos de  
importancia para la  
acuicultura y la  
p e s q u e r í a

Junio, 2005

I N S T I T U T O D E F O M E N T O P E S Q U E R O

6



---

**INFORME FINAL  
CORREGIDO  
FIA**

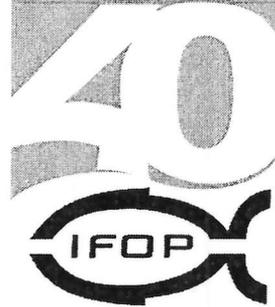
---

**Caracterización genética  
poblacional para el manejo y  
la conservación de recursos  
marinos de importancia  
para la acuicultura y la  
pesquería**

**Décima Región**

BID-PI-C-2001-1-M-068 (antiguo BIOT - 01 - AC - 068)

• Junio, 2005 •



**REQUIRENTE**

---

FONDO DE INNOVACION AGRARIA, FIA

**EJECUTOR**

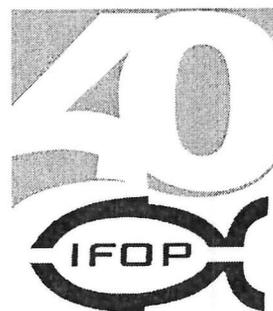
---

INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO, IFOP

Jefe División Investigación en Acuicultura:  
Leonardo Guzmán Méndez

Director Ejecutivo:  
Guillermo Moreno Paredes

• Junio, 2005 •



**JEFE DE PROYECTO**

---

ANA MARIA VERGARA MELLADO

**AUTORES**

---

ANA MARIA VERGARA MELLADO  
JORGE EDUARDO TORO YAGUI

• Junio, 2005 •



## INFORME TÉCNICO FINAL

**NOMBRE DEL PROYECTO:**

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA POBLACIONAL PARA EL MANEJO Y LA CONSERVACIÓN DE RECURSOS MARINOS DE IMPORTANCIA PARA LA ACUICULTURA Y LA PESQUERÍA

**CÓDIGO:** BID-PI-C-2001-1-M-068 (antiguo BIOT - 01 - AC - 068)

**REGIÓN(ES) DE EJECUCIÓN:** Décima Región

**FECHA DE APROBACIÓN:** Diciembre de 2001, por Concurso

**AGENTE POSTULANTE:** DIVISION INVESTIGACIÓN EN ACUICULTURA  
INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO

**AGENTES ASOCIADOS:** UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

**COSTO TOTAL DEL PROYECTO:**

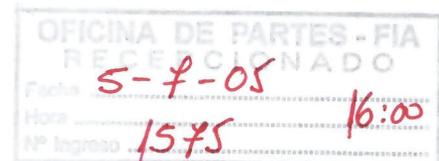
(Valores Reajustados) :

**FINANCIAMIENTO SOLICITADO A FIA:**

(Valores Reajustados) :

FECHA DE INICIO : Enero de 2003  
FECHA DE TERMINO : Enero de 2005

USO INTERNO FIA	
FECHA RECEPCIÓN	





## INDICE GENERAL

---

INDICE GENERAL	2
RESUMEN	3
1. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO	5
1.1 Breve descripci3n de los resultados del proyecto	5
1.2 Breve descripci3n de los impactos del proyecto	7
2. ASPECTOS METODOL3GICOS DEL PROYECTO	9
2.1 Descripci3n de la metodologfa efectivamente utilizada	12
2.2 Problemas metodol3gicos	19
3. ACTIVIDADES Y TAREAS EJECUTADAS	21
4. RESULTADOS DEL PROYECTO	25
5. PROBLEMAS ENFRENTADOS	33
6. DIFUSI3N DE LOS RESULTADOS	34
7. IMPACTOS DEL PROYECTO	35
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	40
10. ANEXOS	42

---



## RESUMEN

---

Una parte importante de la economía del país se basa en la explotación de los recursos pesqueros y de la acuicultura. Sin embargo, el conocimiento biológico de estos recursos y particularmente el genético es muy reducido ó inexistente en algunos casos. Si se quiere continuar explotando dichos recursos de manera sostenida, así como también llevar a cabo una acuicultura sustentable, es de urgente necesidad conocer el estatus genético de las poblaciones naturales, especialmente de aquellas que están siendo explotadas comercialmente. La principal causa del atraso en la implementación de medidas apropiadas de conservación a nivel de recurso genético parece ser el desconocimiento de las implicancias que revisten los estudios básicos de genética poblacional (estructura genética, identificación de poblaciones y stocks), que constituyen uno de los indicadores más importantes del impacto de las actividades de la pesquería, la acuicultura y de las acciones de restauración, incluyendo la repoblación, en las poblaciones naturales sometidas a manejo y conservación.

En este contexto, este estudio tuvo objetivo el contribuir al conocimiento del estatus genético de dos de las principales especies de moluscos sometidas a pesquería intensiva en nuestro país. Usando herramientas biotecnológicas se logró caracterizar a nivel genético poblacional las especies erizo rojo (*Loxechinus albus*) y loco (*Concholepas concholepas*) a lo largo del litoral de nuestro país. De este modo, utilizando las técnicas de electroforesis aloenzimática y análisis de ADN utilizando RAPDs, se analizó un total de 13 y 12 muestras de 100 individuos cada una por especie, lográndose conocer los niveles de variabilidad genética, flujo de genes y el grado de diferenciación poblacional presente en los individuos muestreados.

Este constituye el primer estudio de este tipo realizado en el recurso erizo, en el cual la estructura genética poblacional y la variabilidad genética intra e inter-poblacional se analizó utilizando la variación electromórfica de 6 sistemas enzimáticos codificados por 6 loci genéticos supuestos y 36 loci utilizando partidores RAPDs. La información más relevante obtenida de este estudio es que a pesar de su amplia distribución geográfica *L. albus* se comporta como una sola gran unidad poblacional panmíxica, tal como se sugiere para especies que no evidencian diferenciación interpoblacional ni subdivisión intrapoblacional. A partir de las asociaciones entre las poblaciones de *L. albus* basadas en las distancias genéticas Nei se observan dos ramificaciones principales: una constituida por poblaciones al norte del Canal de Chacao (con la excepción de Pto. Aysén) y otra con poblaciones al sur de este canal, lo cual podría indicar que la dispersión larval a través de las corrientes costeras podría verse interrumpida por el flujo y reflujo de las mareas a través de este hito geográfico y por las corrientes y vientos predominantes.

En el caso de *C. concholepas*, existían reportes contradictorios de la estructura genético poblacional. Como resultado del análisis utilizando la variación electromórfica de 7 sistemas enzimáticos codificados por 7 loci genéticos supuestos y 33 loci utilizando partidores RAPDs, se obtuvieron resultados similares a los encontrados en el recurso erizo, concluyéndose que las muestras obtenidas del recurso loco también pertenecen a una sola gran unidad poblacional panmíxica. Debido a la fuerte presión antrópica ejercida sobre las poblaciones de loco en las últimas décadas, este recurso podría haber experimentado en algún momento un cuello de botella poblacional que daría cuenta de la deficiencia de heterocigotos y la alta similitud genética interpoblacional encontrada.



La relevancia que este tipo de estudios tiene queda de manifiesto al ver los resultados obtenidos para la estructura genético poblacional de ambos recursos, ya que es muy bien conocido en la literatura internacional que el manejo de una especie de valor comercial, debe sin lugar a dudas, contemplar la variabilidad genético-poblacional bajo condiciones naturales (y de explotación) y bajo el supuesto que las variantes alélicas son adaptativas. De esta forma, una potencial reducción de la variabilidad genética debido a una extracción indiscriminada (sobre-explotación), ó un plan de manejo inadecuado, puede resultar en la incapacidad, por parte de los organismos que componen esas poblaciones naturales, de responder a cambios ambientales futuros.

El conocimiento de la variabilidad genética de un recurso (intra e inter-poblacional), permite estimar el estado de conservación genética del recurso a lo largo de su distribución geográfica, permitiendo tomar decisiones adecuadas para correctos planes de manejo, repoblamiento y/o cultivo del recurso.



## 1. CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO

---

### 1.1 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS RESULTADOS

#### a) Caracterización genético poblacional de *Loxechinus albus*

El polimorfismo estimado en *Loxechinus albus* concuerda con los patrones registrados en otras especies de invertebrados marinos (47,05 %). Por su parte la variabilidad genética expresada como heterocigosidad fue como promedio general de 32 %, también dentro del rango para los organismos marinos. Los resultados de la prueba de heterogeneidad interpoblacional estarían indicando que las diferencias en la estructura genética de las poblaciones de erizo, no son significativas, a pesar de las distancias geográficas que las separan y de las diferencias ambientales. Ello se ve corroborado a través de los valores de  $F_{st}$  que predice que solo el 4,07 % de la varianza en las frecuencias alélicas se debe a diferencias inter-poblacionales. Al estimar el flujo génico ( $Nm$ ), su combinación de parámetros indica la fuerza relativa del flujo génico y deriva génica. Como  $Nm$  es mayor a 1 (5,93), la deriva génica es incapaz de producir diferenciación poblacional. Esta afirmación se apoya en la evidencia de altos valores de identidad genética entre poblaciones de erizo analizadas. El valor estimado de  $Nm$ , indica que el número de migrantes por generación entre las poblaciones muestreadas es de 6 individuos aproximadamente. Considerando que se trabajó con 100 individuos como promedio por localidad, el número de migrantes corresponde aproximadamente al 6% por generación.

A pesar de su amplia distribución geográfica *L. albus* se comporta como una sola gran unidad poblacional panmíxica. Según los valores de  $F_{is}$  registrados, se observa un exceso significativo de homocigotos en todos los loci de las 13 poblaciones, tal como se evidencia por los valores del índice de deficiencia de heterocigotos ( $d$ ). El índice de fijación  $F_{st}$  indica que la subdivisión poblacional es muy baja, debido a que no se evidencian variantes alélicas fijadas alternativamente en diferentes poblaciones. En base a estos resultados las bases para el manejo del recurso debe considerar esta especie como genéticamente homogénea a lo largo del litoral chileno.

#### b) Caracterización genético poblacional de *Concholepas concholepas*

La variabilidad genética en *C. concholepas*, expresada como heterocigosidad, alcanzó un valor promedio de 0,442. Este valor es alto comparado con otros gastrópodos, como *Haliotis discus* ( $H_o = 0,123$ ), *Patella aspersa* (0,220) y otros estudios de *C. concholepas* (0,065 y 0,122). Sin embargo, no existe una respuesta o modelo único que puedan explicar estos valores.

Los resultados de las estadísticas  $F$  indican una marcada homogeneidad genética. El bajo valor promedio de  $F_{st}$  (0,065) implica una baja subdivisión poblacional ya que sólo el 6,5% de la varianza en la frecuencia génica es atribuible a las diferencias entre muestras. Según los valores de  $F_{is}$  registrados, se observa un exceso significativo de los homocigotos, que podría deberse a la remoción selectiva de individuos de genotipos heterocigotos que presentan una mayor tasa de crecimiento.

El flujo génico ( $Nm$ ) indica que 3,5 individuos son intercambiados entre las distintas localidades por generación (un valor de  $Nm > 2$  evitará la diferenciación solo por deriva).



Los datos evidencian que no existen poblaciones genéticamente diferentes y que las muestras han sido reclutadas desde una sola gran unidad poblacional panmíxica.

La tasa de migración entre las localidades enfatiza la eficiencia de la dispersión larval para asegurar, que los mismos alelos, a pesar de la presión selectiva de la pesquería del recurso, sean compartidos por los stocks de reproductores a través del tiempo evolutivo. Sin embargo, la dispersión larval y el posterior asentamiento al azar que favorecerían el patrón macrogeográfico de homogeneidad genética se contraponen con la distribución no al azar de genotipos según lo indicado por la existencia de asociación entre distancia geográfica y genética (test de Mantel). A pesar de ser una gran unidad poblacional panmíctica, la existencia de una correlación entre distancia genética y distancia geográfica y la existencia de al menos tres agregados poblacionales, permite proponer que estos agregados sean considerados como unidades independientes para el manejo del recurso.

### **c) Caracterización genética de los reproductores y las cohortes de juveniles de *L. albus* producidas en ambiente controlado.**

Una muestra de 110 individuos producidos bajo condiciones controladas de hatchery fue obtenida desde el Centro Tecnológico para la Acuicultura Putemún (IFOP). Estos individuos fueron producidos en agosto de 1997 y mantenidos en crecimiento en cajas de cultivo suspendidas en long-lines, debidamente identificados según su batch de procedencia. Se utilizaron 13 reproductores como parentales para la producción de estos juveniles, los cuales provenían de una muestra de individuos colectados en la localidad de Carelmapu (X región), de modo que se obtuvo una nueva muestra de esa misma localidad para efectuar las comparaciones del estatus genético de individuos de banco natural y de hatchery.

Los resultados en *L. albus*, al comparar la población donde se obtienen los reproductores a utilizar en el hatchery (Carelmapu) y los individuos producidos en el hatchery permiten establecer que el número de alelos es el mismo, solo que el alelo D en el sistema enzimático GPI observado en los juveniles, no aparece en los individuos de la población de Carelmapu, a su vez el alelo C para el mismo sistema enzimático se observó en la población natural, pero no en los juveniles. Ello podría deberse a la reducción de las presiones selectivas en el hatchery en comparación a la población natural. El promedio de alelos por locus (2,83), se mantiene en los juveniles y en los reproductores de *L. albus* en este análisis. A pesar de estos cambios en la frecuencia alélica entre los juveniles y reproductores, se observó el mismo grado de heterocigosidad observada (0,360) en ambos grupos de *L. albus*, lo cual indica que la heterocigosidad es menos sensitiva que la frecuencia alélica a cambios en los stocks.

También se observó una mayor proporción de heterocigotos en el grupo de juveniles provenientes de hatchery en comparación a la población de reproductores. La población natural de *L. albus* de Carelmapu exhibe una deficiencia de heterocigotos significativa en todos los loci analizados, lo cual está de acuerdo con lo observado por otros autores en otros invertebrados marinos, mientras que el 50% de los loci están en equilibrio Hardy-Weinberg en el grupo de juveniles producidos en el hatchery.

### **d) Evaluación del tipo de impacto de las producciones de hatchery sobre la estructura genética de las poblaciones naturales**

La mantención de la diversidad genética es la meta más importante en el contexto de la conservación de las poblaciones naturales. Algunas de las formas de manipulación que pueden producir pérdidas de la diversidad genética en el recurso erizo son las reproducciones bajo condiciones controladas y el posterior repoblamiento con estos individuos producidos artificialmente. Ambas actividades se desarrollan



actualmente a nivel piloto en nuestro país y aunque son generalmente reconocidas como amenazas, son insuficientemente consideradas en el manejo de las poblaciones naturales.

La evaluación del impacto a partir de las muestras analizadas en este estudio puede ser calificado de neutro, al analizar diferentes criterios de medición de la diversidad genética como los son la heterocigosidad, la riqueza de alelos (o número de alelos) y el grado de diferenciación entre poblaciones. Al analizar la heterocigosidad observada, ésta no presenta cambios entre las muestras de población natural y de hatchery, observándose lo mismo con la riqueza de alelos o número de alelos. Sin embargo, se observa un cambio en las frecuencias alélicas, desapareciendo una variante alélica y apareciendo una nueva, lo cual sería un impacto negativo si se tratara de una especie con poblaciones adaptadas localmente, donde el resultado inmediato de la introgresión sería la ruptura de complejos génicos coadaptados, con una consecuente reducción en la aptitud reproductiva en los descendientes. Este no es el caso del erizo, cuya estructura genética poblacional corresponde a una de tipo panmíctica sin subdivisión poblacional y si además la comparación se extiende a las demás muestras de poblaciones naturales analizadas, en éstas se observan variantes alélicas similares a las observadas en la muestra de hatchery. Finalmente, al analizar la diferenciación genética en el análisis de cluster de UPGMA, las poblaciones más idénticas genéticamente corresponden precisamente a las muestras de hatchery y de Carelmapu, lugar de origen de los reproductores

#### **e) Catastro de la caracterización genética poblacional de los recursos bajo estudio como referencia para futuras investigaciones**

La información genética a nivel poblacional obtenida en este proyecto y presentada en detalle en la sección 5. Resultados del Proyecto (número de alelos, heterocigosidad observada, distancias genéticas, entre otras), constituye el catastro de la caracterización genética de las especies bajo estudio a lo largo del litoral chileno y a su vez, constituyen la línea base que servirá como referencia para futuras investigaciones que deseen conocer si las actuales medidas de manejo aplicadas a estas especies están siendo las adecuadas para la mantención de los actuales niveles de diversidad genética, principal meta en el contexto de conservación de los recursos.

Por tal razón, es importante también que las metodologías aplicadas sean replicables, razón por la cual los aspectos metodológicos del proyecto constituyen un capítulo amplio y detallado.

## **1.2 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS IMPACTOS DEL PROYECTO**

Cuando las poblaciones naturales son afectadas por condiciones ambientales desfavorables, pueden reducirse drásticamente en número y corren el riesgo de extinguirse. Si la reducción es severa, la población experimenta un "cuello de botella" demográfico. Durante este episodio las poblaciones mostrarán bajos niveles de heterocigosidad y una alta similitud genética. Debido a la fuerte presión antrópica ejercida sobre las poblaciones de erizo y loco durante la última década estos recursos podrían haber experimentado en algún momento un cuello de botella poblacional que daría cuenta de la deficiencia de heterocigotos y la alta similitud genética interpoblacional encontrada.

Los individuos genéticamente mejor adaptados poseen un mejor desarrollo ontogénico (altas tasas de crecimiento, fecundidad, fertilidad etc). Producto de la alta extracción de erizos, se está ejerciendo una selección artificial sobre ellos, eliminándose de las poblaciones aquellos individuos mejor adaptados



(heterocigotos con mayor tasa de crecimiento) (Beaumont & Hoara, 2003). A largo plazo, las poblaciones estarán constituidas cada vez mas por individuos con menores capacidades adaptativas, dejando descendientes biológicamente inferiores, distribuidos en hábitats fragmentados posibilitando la extinción local.

A base de los resultados obtenidos, las bases para el manejo del recurso deben considerar las especies en estudio como genéticamente homogénea a lo largo del litoral chileno. Sin embargo, se debe tener presente que a pesar de los bajos niveles de diferenciación poblacional encontrados en ambos recursos, fue posible detectar clusters de los análisis de distancias genéticas que darían cuenta de un quiebre a nivel del Canal de Chacao en el caso de erizo, donde se podría hablar de poblaciones al norte y al sur de este Canal. En el caso del loco, la presencia de tres clusters (extremo sur, sur, y norte-centro) permite proponer que estos agregados sean considerados como unidades independientes para el manejo del recurso.

La relevancia que este tipo de estudios queda de manifiesto al ver los resultados obtenidos para la estructura genético poblacional del recurso *L. albus* y *C. concholepas*, ya que es bien conocido en la literatura internacional que el manejo de una especie de valor comercial, debe sin lugar a dudas, contemplar la variabilidad genético-poblacional bajo condiciones naturales (y de explotación) y bajo el supuesto que las variantes alélicas son adaptativas. De esta forma, una potencial reducción de la variabilidad genética debido a una extracción indiscriminada (sobre-explotación), ó un plan de manejo inadecuado, puede resultar en la incapacidad, por parte de los organismos que componen esas poblaciones naturales, de responder a cambios ambientales futuros.

El conocimiento de la variabilidad genética de un recurso (intra e inter-poblacional), permite estimar el estado de conservación genética del recurso a lo largo de su distribución geográfica, permitiendo tomar decisiones adecuadas para correctos planes de manejo, repoblamiento y/o cultivo del recurso.



### 3. ASPECTOS METODOLOGICOS DEL PROYECTO

---

Se adjunta un Glosario para el mejor entendimiento de la técnicas y los métodos descritos:

#### GLOSARIO

---

1. **Acido nucleico:** ver ADN.
2. **ADN:** ácido presente en todas las células, es el material hereditario que contiene toda la información genética. Al enrollarse con ayuda de las proteínas llamadas histonas, forma los cromosomas.
3. **ADN genómico:** ADN cromosómico nuclear que ha sido aislado directamente de células o tejidos.
4. **Alelo:** cada una de las formas en que puede presentarse un gen en un determinado locus de cromosomas homólogos.
5. **Aloenzimas (isoenzimas):** diferentes formas de una enzima producida por variación genética en la codificación del locus para esa enzima.
6. **Amplificación:** aumento del número de copias de una secuencia de ADN, bien mediante un proceso biológico en la célula, o bien mediante técnicas de laboratorio.
7. **Dendrograma:** ilustración en forma de árbol, usada para mostrar el parentesco genético entre diferentes poblaciones o taxas.
8. **Deriva génica:** consiste en cambios en las frecuencias génicas debidos a que los genes de una generación dada no constituyen una muestra representativa de los genes de la generación anterior.
9. **Distancia genética:** una de las varias medidas del grado de diferenciación genética entre poblaciones, basada sobre las diferencia en frecuencias alélicas
10. **DNTP's:** mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos(dATP, dGTP, dCTP y dTTP), usada en el PCR.
11. **Dominante:** rasgo fenotípico (y el alelo que lo determina) que se expresa en un individuo heterocigoto.
12. **EDTA:** Acido Etileno Diamino Tetracético.
13. **Electroforésis:** Método empleado para separar una mezcla de moléculas grandes, tales como fragmentos de ADN o proteínas, haciendo pasar una corriente eléctrica a través de un gel que contiene las muestras que se desean separar. En un campo eléctrico, las partículas cargadas se mueven a distintas velocidades, dependiendo de su relación carga/masa.
14. **Equilibrio Hardy-Weinberg:** establece que en una población suficientemente grande, en la que los apareamientos se producen al azar y que no se encuentra sometida a mutación, selección o migración, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de una generación a otra, una vez alcanzado un estado de equilibrio que en loci autosómicos se alcanza tras una generación.



15. **Ethidium bromide:** colorante que fluoresce cuando se encuentra unido al ADN de doble cadena.
16. **Frecuencia alélica:** proporción de copias de un gen en una población. La frecuencia génica o frecuencia alélica consiste en la proporción de cada alelo en un locus dado en una población específica.
17. **Frecuencia genotípica:** proporción de un genotipo en una población.
18. **Flujo génico:** es el proceso de transferencia de genes de una población a otra, o entre dos o más poblaciones, e implica la dispersión de nuevas variantes genéticas entre poblaciones diferentes. Se suele estudiar en términos de una o más poblaciones "donantes" y una "receptora" cuyas frecuencias génicas son función de las frecuencias génicas de los donantes y la proporción de migrantes de las poblaciones donantes. Constituye, junto con la mutación, la manera en la cual son introducidos nuevas variantes genéticas en una población.
19. **Gen:** unidad de herencia que ocupa una posición concreta en el genoma (locus) y está constituido por una secuencia de ADN que codifica un ARN funcional.
20. **Genotipo:** Conjunto de la información genética que porta un individuo en uno o más loci.
21. **Heterocigotos:** codificación para dos alelos diferentes en un locus.
22. **Homocigotos:** codificación para dos alelos idénticos en un locus.
23. **Monomorfismo.** Los individuos de una población sin diferencias entre los sexos. También se refiere a una forma genotípica para una característica.
24. **Locus (plural=Loci):** Posición que ocupa un gen en el cromosoma
25. **Marcadores moleculares:** Un segmento de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia se puede rastrear. Un marcador puede ser un gen, o puede ser alguna sección del ADN sin función conocida. Dado que los segmentos del ADN que se encuentran contiguos en un cromosoma tienden a heredarse juntos, los marcadores se utilizan a menudo como formas indirectas de rastrear el patrón hereditario de un gen que todavía no ha sido identificado, pero cuya ubicación aproximada se conoce.
26. **Microsatélites:** Son pequeñas regiones de ADN que contienen múltiples copias de secuencias repetitivas cortas y que se emplean como marcadores genéticos para rastrear la herencia familiar o mapear enfermedades en el genoma.
27. **Panmixia:** Sistema de apareamiento en el que la elección de pareja se realiza al azar.
28. **PCR ( polymerase chain reaction):** técnica rápida y económica para hacer un número ilimitado (millones) de copias cortas (0.1-4.0 kb) de cualquier fragmento del ADN. En otras palabras, es una técnica para la síntesis "in Vitro" de secuencias específicas de DNA con la cual la insuficiente cantidad de ADN ya no es un problema en los procedimientos de Biología Molecular ni en los procedimientos de diagnóstico basados en el estudio de DNA. La reacción en Cadena de la Polimerasa se basa en la repetición de un ciclo formado por tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión.
29. **Polimerasa:** Complejo enzimático que cataliza la síntesis de un poli-desoxirribonucleótido utilizando como molde un ADN (ADN polimerasa ADN-dependiente) o un ARN (ADN polimerasa ARN-dependiente).



30. **Polimorfismo:** Locus genético que está presente en dos o más alelos distintos, de forma que el alelo más raro tiene una frecuencia mayor o igual a 1% (0,01) en la población general.
  31. **Pop-Gene:** Nombre comercial de programa estadístico usado para estudios de variabilidad genética.
  32. **Primer (partidor):** Pequeña cadena de nucleótidos a partir de la cual la ADN polimerasa inicia la síntesis de una molécula nueva de ADN.
  33. **RAPDs:** Los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA - DNA polimórfico amplificado al azar) son un ensayo de polimorfismo basado en la amplificación de segmentos de DNA al azar utilizando varios primers de secuencia arbitraria.
  34. **Recesivo:** Es el término aplicado al miembro de un par alélico imposibilitado de manifestarse cuando el alelo dominante esta presente. Para que este alelo se observe en el fenotipo debe estar presente en doble dosis, proveniente uno de la madre y otro del padre.
  35. **RFLP:** polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción. Son las variaciones en las bases nitrogenadas en el sitio donde una enzima de restricción corta un segmento de ADN. Estas variaciones afectan el tamaño de los fragmentos que resultan del corte. Los RFLP se pueden utilizar como marcadores en la construcción de mapas físicos y de ligamiento.
  36. **Termociclador:** aparato en el que se lleva a cabo la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR, cuya característica principal es realizar los ciclos en los tiempos y temperaturas programadas de forma exacta.
  37. **Tubos Eppendorf:** tubos plásticos autosellables especiales para el almacenamiento de muestras y uso en centrifugas
  38. **UPGMA:** unweighted pair group method with arithmetic averages. Un procedimiento de aglomeración el cual usa la matriz de distancias genéticas para dibujar un dendrograma evolutivo. El principal supuesto de este método es que la tasa de mutación es constante para todas las ramas del dendrograma
  39. **Variabilidad genética:** se refiere a la variación hereditaria dentro y entre poblaciones de organismos, cuya base está en los cromosomas (ADN) y puede ser manipulada por la tecnología tradicional y moderna (biotecnología, ingeniería genética, etc.).
- 

### 3.1 Descripción de la metodología efectivamente utilizada

#### 3.1.1 Caracterización genética poblacional del recurso erizo (*Loxechinus albus*)

##### 3.1.1.1 Animales experimentales

Muestras de 120 individuos de *Loxechinus albus* fueron colectadas en 12 localidades del litoral chileno correspondientes a los principales puertos de desembarque del recurso. Las muestras fueron adquiridas a pescadores artesanales de cada lugar, quienes, mediante buceo autónomo, muestrearon individuos adultos de los bancos naturales de los alrededores de cada lugar de desembarque. La totalidad de las muestras del recurso erizo fueron obtenidas en los periodos de apertura de veda, por lo que en ninguno de los muestreos



se requirió el uso del permiso de pesca de investigación autorizada por la Subsecretaría de Pesca (Resolución N° 2891 del 19/12/2002).

Las localidades muestreadas correspondieron a Iquique (Huaiquique), Antofagasta (Punta Angamos), Tomé (Caleta Tumbes) Valdivia (Morro Gonzalo), Calbuco, Puerto Aysén (Chacabuco), Carelmapu, Hueihue, Isla Laitec, San Pedro, Isla Guafo y Pta Arenas (Figura 1 y Tabla 1)).

La última población incorporada al análisis, correspondió a individuos producidos bajo condiciones controladas en el hatchery del Centro Tecnológico para la Acuicultura Putemún (IFOP). Estos individuos fueron producidos en agosto de 1997, utilizándose en la reproducción 3 machos y 10 hembras. El porcentaje promedio de fecundación observada fue de un 80% y los cultivos larvales se llevaron a cabo en 6 estanques de 500 litros. Las larvas prismas iniciales fueron 1.8 millones y las larvas premetamórficas obtenidas alcanzaron a 0,52 millones. Se observó un 18 % de metamorfosis y se estimó la producción del batch en 97.000 semillas. Estas fueron mantenidas en crecimiento en cajas de cultivo suspendidas en long-lines, debidamente identificadas según su batch de procedencia y alimentadas con macroalgas, según disponibilidad de estas en el medio natural. Una muestra de 110 individuos de este batch fueron utilizados para los análisis genéticos, teniendo al momento del muestreo la edad de 5 años y un diámetro de testa entre 45-60mm.

En el laboratorio, a cada individuo muestreado se le asignó un número correlativo y se registró el diámetro de la testa con calibre vernier precisión 1 mm. Muestras de tejido gonadal, intestino y músculo de la linterna de Aristóteles de cada uno de los 120 especímenes de cada localidad fueron congeladas inmediatamente después de la recolección a  $-197^{\circ}\text{C}$  para los análisis de electroforesis enzimática. Para la identificación de los marcadores RAPDs, las muestras de 50 individuos de cada localidad, de los tejidos previamente descritos, fueron fijadas en etanol 95% en tubos Eppendorf® de 1.5 ml y mantenidas a  $4^{\circ}\text{C}$  a la espera de su análisis. De estos 50 individuos muestreados por población, se tomaron 20 al azar y se les extrajo ADN nuclear.

### 3.1.1.2 Análisis de Aloenzimas.

Seis loci polimórficos fueron analizados: phosphoglucomutase (**PGM**; **EC 2.7.5.10**), glucose phosphate isomerase (**GPI**; **EC 5.3.1.9**), peptidase D (**PEP**; **EC 3.4.13.9**), isocitrate dehydrogenase (**ICD**; **EC 1.1.1.42**), glutathione reductase (**GSR**; **EC 1.6.4.2**), esterase (**EST**; **EC 3.1.1.1**). Un locus genético fue registrado para cada enzima, excepto **PEP**, el cual exhibió dos zonas de actividad en el gel, **PEP-1** y **PEP-2**. Debido a que **PEP-1** fue mayoritariamente monomórfico se utilizó **PEP-2** para los análisis. (Figura 2 a-f)

La electroforesis horizontal fue llevada a cabo sobre geles de almidón (12% almidón Sigma en buffer) de 300 cc. El buffer del gel y electrodo fue Tris – maleico – EDTA, pH 7.4 (0.1 M Tris, 0.1 M ácido maleico, 0.01 M EDTA, 0.01 M Mg Cl<sub>2</sub>, agua destilada) para todos los sistemas enzimáticos excepto **PEP**. Para este locus, el buffer tanto para el gel como para el electrodo fue Tris – ácido bórico – EDTA, pH 9.0 (0.9 M Tris, 0.5 M ácido bórico, 0.02 M EDTA, agua destilada)

El tejido de la gónada de cada erizo fue homogenizado en 30  $\mu\text{l}$  de buffer y luego centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue absorbido en trozos de papel filtro Watman N° 5 (10 x 5 mm<sup>2</sup>), los cuales fueron insertados en una incisión en un extremo del gel. Una muestra de azul de bromofenol fue aplicada a cada gel para actuar como marcador.



Fueron corridas anodalmente 16 muestras, a 105 V a una temperatura de 4° C, hasta que el marcador migrara 5 cm en el gel (aproximadamente 6 h). En el caso de PEP, el voltaje utilizado fue de 135 V por 10 h.

Una vez que la corrida fue concluida, los geles fueron cortados horizontalmente en capas de 3 mm de espesor. Cada capa fue teñida para una enzima específica siguiendo las recetas de Shaw and Prasad (1970).

El alelo con más lenta migración fue designado con la letra A y los subsecuentes alelos de más rápido potencial de migración recibieron la subsecuente designación alfabética.

Las bandas, correspondientes a los alelos, fueron dibujadas y los geles fueron fotografiados con una máquina digital (SONY DSC 70) para referencia.

### 3.1.1.3 Análisis de ADN utilizando RAPDs

#### a) Extracción de ADN

Cada tejido se trozó finamente dejándolo digerir en lysis-buffer (50-mM Tris-HCl (pH 8.0); 1.0% SDS; 25nM EDTA) con 200 µg de proteinasa K (Sigma) a 37 °C durante 16 horas en una estufa incubadora. Posteriormente a cada uno de los tubos con la muestra de tejido digerido con proteinasa K, se le adicionó 500 µl de una solución de fenol-cloroformo-isoamil alcohol (24:24:1). Esta mezcla se agitó en un vortex y se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a 5 °C, para posteriormente sifonear el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo Eppendorf® de 1.5 ml previamente autoclavado. Los ácidos nucleicos se precipitaron con la adición de 1000 µl de etanol a -20 °C (Toro, 1998), y los tubos se mantuvieron en el freezer a -20°C durante 20 minutos previo a su centrifugación a 6.000 rpm por 3 minutos, repitiéndose éste protocolo de precipitación.

Luego el sobrenadante se descartó, y se adicionaron nuevamente 500 µl de etanol a -20 °C, para luego centrifugar a 6000 RPM. Luego de este procedimiento de lavado, se procedió a descartar el sobrenadante por medio de una micropipeta con punta desechable, dejando el pellet de ADN en el fondo del tubo, para luego colocar los tubos en un concentrador (disecador SAVANT DNA 110) de ADN a 37°C hasta que el etanol se evaporase completamente. El pellet de ADN extraído se resuspendió (incubando a 60°C por 10 minutos) en 200 µl de agua bidestilada y se almacenó a -20°C, hasta el momento de la amplificación.

Con éste protocolo optimizado, se realizó la extracción de ADN del tejido de 20 individuos de cada una de las poblaciones.

#### b) Amplificación del ADN

Con el propósito de establecer un número de partidores que generaran un polimorfismo molecular consistente con más de 30 loci, se trabajó en la optimización de las variables para la amplificación del ADN para cada uno de los 48 partidores adquiridos (Tabla 2). Fueron ensayados nueve distintos cocktails de reactivos para la reacción de amplificación en el termociclador y distintos programas de amplificación. Luego de numerosas y sistemáticas pruebas, se seleccionaron tres partidores correspondientes a los N° 3, 10 y 15., los que presentaron 36 loci (figura 4):



Partidor N°	Secuencia	Cocktail de reactivos	Programa termociclador
3	5'-CCGGCCCCAA-3'	N° 2	20
10	5'-GAGCACGGGG-3'	N° 7	21
15	5'-GCGGCTGGAG-3'	N° 7	21

De los nueve distintos cocktails de reactivos para la reacci3n de amplificaci3n en el termociclador, las reacciones n° 2 y n° 7 fueron las utilizadas:

Reacci3n 2 (25 ng)	Reacci3n 7 (25 ng)
ADN 1µL	ADN 1µL
Buffer 2.5µL	Buffer 2.5µL
Mg Cl <sub>2</sub> 0.75µL	Mg Cl <sub>2</sub> 1.75µL
dNTPs 5µL	dNTPs 2.5µL
Enzima 0.2 µL	Enzima 0.2 µL
Primer 3 µL	Primer 4.5 µL
Agua 12.55 µL	Agua 12.55 µL

La reacci3n fue cubierta con una gota de aceite mineral para evitar evaporaci3n y colocada en un termociclador (Amplifitron II, Thermolyne Inc). Los protocolos para la amplificaci3n del ADN en el termociclador fueron los siguientes:

**N° 20:**

94 °C por 3 minutos  
94 °C por 20 segundos  
42 °C por 20 segundos  
72 °C por 2 minutos y mantenido luego a 4°C

} 35 ciclos

**N° 21:**

94 °C por 15 segundos  
94 °C por 30 segundos  
35 °C por 30 segundos  
72 °C por 1 minutos y mantenido luego a 4°C

} 36 ciclos



### c) Electroforesis del producto de la amplificación PCR

La totalidad de los fragmentos de ADN amplificado con los primers utilizados se separaron en geles de agarosa (SIGMA high resolution) al 1.5% en buffer TBE 0.5X (44.5 mM tris base, 44.5 mM ácido bórico, 1M EDTA pH 8) durante 1h 10 min. a 112 volts. Dos escalas estándar de 1Kb (Life Technologies) se corrieron en cada uno de los extremos del gel. Luego de la electroforesis el gel conteniendo los fragmentos RAPD fue teñido con etidium bromide (geles sumergidos durante 15 a 20 minutos) y previo a un lavado de los geles en agua, se observaron en un transiluminador de luz UV, donde fueron fotografiados con una cámara digital Sony según Comesaña et al.(1999); Toro (1999).

#### 3.1.2 Caracterización genética poblacional del recurso loco (*Concholepas concholepas*)

##### 3.1.2.1 Animales Experimentales

Muestras de 110 individuos de *Concholepas concholepas* fueron colectadas en 12 localidades del litoral chileno correspondientes a los principales puertos de desembarque del recurso. Las muestras fueron adquiridas a pescadores artesanales de cada lugar, quienes, mediante buceo autónomo, muestrearon individuos adultos de los bancos naturales de los alrededores de cada lugar de desembarque. La muestras del recurso loco fueron obtenidas con el permiso de pesca de investigación autorizada por la Subsecretaría de Pesca (extensión resolución exenta N° 333 del 30/01/2004 de la Resolución N° 2891 del 19/12/2002).

Las muestras fueron colectadas en Mejillones, Coquimbo (Caleta Hornos), Los Vilos (Pichidangui), San Antonio (El Quisco), Valdivia (Niebla), Maullín, Castro (Dalcabue), Huafo, Corcovado, Quellón, Puerto Aysén (Canal Refugio) y Puerto Natales (Figura 4 y Tabla 3). Los ejemplares fueron trasladados vivos en frío hasta el Laboratorio de Genética Aplicada en Valdivia, dentro de las 12 horas de recolectados. En el laboratorio, los ejemplares fueron medidos en su longitud peristomal con calibre vernier precisión 1 mm. Muestras de tejido gonadal, hepatopáncreas y músculo fueron congeladas inmediatamente después de la recolección a -197° C de cada uno de los 110 especímenes para su posterior análisis de electroforesis enzimática. Para los análisis poblacionales con los marcadores RAPDs, se tomaron muestras de tejido del borde del manto de 30 individuos, aproximadamente 200-400 mg de tejido, los que fueron fijados en etanol 95% y mantenidos a 4° C hasta la extracción del ADN.

##### 3.1.2.2 Análisis de Aloenzimas

Siete loci polimórficos fueron analizados: phosphoglucomutase (*PGM*; *EC 2.7.5.10*), glucose phosphate isomerase (*GPI*; *EC 5.3.1.9*), peptidase D (*PEP*; *EC 3.4.13.9*), isocitrate dehydrogenase (*ICD*; *EC 1.1.1.42*), glutathione reductase (*GSR*; *EC 1.6.4.2*), esterase (*EST*; *EC 3.1.1.1*) y leucine aminopetidase (*LAP*; *EC 3.4.11.1*). Un locus genético fue registrado en *PGM*, *GPI*, *ICD* y *LAP*, mientras que para los restantes tres loci (*PEP*, *GSR* y *EST*) se observaron dos zonas de actividad en el gel (*PEP-1* y *PEP-2*, *GSR-1* y *GSR-2*; *EST-1* y *EST-2*) (Figura 5 a-g). Debido a que *PEP-2* fue mayoritariamente monomórfico se utilizó *PEP-1*. Por el mismo motivo se analizó *EST-2* y en el caso de *GSR*, ambos loci fueron polimórficos, pero por una mejor resolución de bandas a través de las poblaciones, se estudió *GSR-1*.

La electroforesis horizontal fue llevada a cabo sobre geles de almidón (12% almidón Sigma en buffer) de 300 cc. Los distintos buffers y valores de pH determinados para los sistemas enzimáticos seleccionados, se detallan a continuación:



Enzimas	Buffers	Tejido	Voltaje	Tiempo (hr)
<i>Est-2</i>	TEC pH 7.1	Hepatopáncreas	210	4
<i>Icd</i>	TEC pH 7.1	Hepatopáncreas	210	5
<i>Gpi</i>	TEB pH 9.0	Hepatopáncreas	200	6
<i>Gsr-1</i>	TEB pH 9.0	Hepatopáncreas	200	6
<i>Lap</i>	TEB pH 9.0	Hepatopáncreas	200	6
<i>Pgm</i>	TEB pH 9.0	Hepatopáncreas	200	6
<i>Pep-1</i>	TEB pH 9.0	Hepatopáncreas	200	6

### 1. Buffer TEC pH 7.1 (*EST, ICD*).

Electrodo: 16.35g/l Tris, 9.01 g/l Ácido cítrico, 0.46 g/l Na EDTA.

Gel : 16.35g/l Tris, 9.04 g/l Ácido cítrico, 6.9 g/l Na EDTA.

### 2. Buffer TEB pH 9.0 (*PEP, GSR, LAP, PGM, GPI*).

Electrodo y gel: 10.52 g/l Tris  
5.36 g/l Ácido Bórico  
0.276 g/l EDTA

El tejido seleccionado correspondió al hepatopáncreas, el cual fue homogenizado en 30  $\mu$ l de buffer y luego centrifugado a 10.000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue absorbido en trozos de papel filtro Whatman N° 5 (10 x 5 mm<sup>2</sup>), los cuales fueron insertados en una incisi3n en un extremo del gel. Una muestra de azul de bromofenol fue aplicada a cada gel para actuar como marcador.

Fueron corridas anodalmente 16 muestras segun el voltaje indicado en la tabla precedente, a una temperatura de 4° C, hasta que el marcador migrara en el gel 5 cm.

Una vez que la corrida fue concluida, los geles fueron cortados horizontalmente en capas de 3 mm de espesor. Cada capa fue teñida para una enzima especifica siguiendo las recetas de Shaw and Prasad (1970).

El alelo con más lenta migraci3n fue designado con la letra A y los subsecuentes alelos de más rápido potencial de migraci3n recibieron la subsecuente designaci3n alfabética.

Las bandas, correspondientes a los alelos, fueron dibujadas y los geles fueron fotografiados con una maquina digital (SONY DSC 70) para referencia.

### 3.1.2.3 Análisis de ADN utilizando RAPDs

#### a) Extracci3n de ADN

Se extrajo el ADN genómico total de un trozo de tejido del borde del manto (50 - 100 mg) fijado previamente en etanol al 95% y se trozó finamente dejándolo digerir en lysis-buffer (10 mM EDTA; 10 mM Tris; 20 mM NaCl pH 8.5) con 50  $\mu$ L de SDS al 20% y 200  $\mu$ g de proteinasa K (Sigma) a 55 °C durante 1 hora. Luego se le adicionó 500  $\mu$ l de una soluci3n de fenol-cloroformo-isoamil alcohol (24:24:1). Esta mezcla se agitó



manualmente y se centrifugó a 6500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente sifonear el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo Eppendorf® de 1.5 ml estéril.

Posteriormente, se le adicionó 50 µL de acetato de sodio 3.0 M pH 5.5 y los ácidos nucleicos se precipitaron con la adición de 1000 µl de etanol al 95 % a -20 °C (Toro, 1998). Los tubos se mantuvieron en el freezer a -20°C por 20 a 30 minutos previo a su centrifugación a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, luego el sobrenadante se descartó y se procedió a lavar el pellet con etanol al 70% a -20 °C, para luego centrifugar a 6000 RPM.

Luego de este procedimiento de lavado, se procedió a descartar nuevamente el sobrenadante, dejando el pellet en el fondo del tubo y colocando los tubo en un concentrador (disecador SAVANT DNA 110) de ADN a 37 °C hasta que el etanol se evaporara completamente. El pellet de ADN extraído se resuspendió (incubando a 60°C por 10 minutos) en 200 µl de agua bidestilada y se almacenó a -20°C, hasta el momento de la amplificación.

#### b) Amplificación del ADN

Con el propósito de establecer al menos 4 partidores que generen un polimorfismo molecular consistente, se trabajó con 48 partidores (primers: ver tabla 2) en cada reacción PCR (para cada ejemplar) con el fin de evaluar los patrones de banda generados por cada uno de estos marcadores moleculares (figura 6).

Para el procedimiento de amplificación se estableció el siguiente protocolo:

Partidor N°	Secuencia	Cocktail de Reactivos *	Programa Termociclador **
10	5'-GAGCACGGGG-3'	1	21
15	5'-GCGGCTGGAG-3'	1	21
19	5'-CGTCTGCCCG-3'	1	21
41	5'-GCAGGACTGC-3'	1	21

\*\* ver sección 3.1.1.3 (b)

* Reacción 1 (12.5 ng)
ADN 1µL
Buffer 2.5µL
Mg Cl <sub>2</sub> 0.75µL
dNTPs 2.5µL



Enzima 0.2 $\mu$ L
Primer 1.5 $\mu$ L
Agua 16.55 $\mu$ L

### c) Electroforesis del producto de la amplificaci3n PCR

La totalidad de los fragmentos de ADN amplificado con los primers utilizados se separaron en geles de agarosa (Invitrogen high resolution) al 1.5% en buffer TBE 0.5X (44.5 mM tris base, 44.5 mM 3cido b3rico, 1M EDTA pH 8) durante 1h 10 min. a 112 volts. Dos escalas est3ndar de 1Kb (Life Technologies) se corrieron en cada uno de los extremos del gel. Luego de la electroforesis, el gel conteniendo los fragmentos RAPD fue teñido con etidium bromide (geles sumergidos durante 15 a 20 minutos) y previo a un lavado de los geles en agua, se observaron en un transiluminador de luz UV, donde se fotografiaron con una c3mara digital seg3n Comesaña et al.(1999); Toro (1999).

### 3.1.3 An3lisis estadísticos y genéticos

Estos an3lisis son comunes a las caracterizaciones genético poblacionales de los dos recursos en estudio.

#### a) Electroforesis enzimática (Aloenzimas):

El an3lisis se llev3 a cabo utilizando el programa POPGENE 1.32 (Yeh *et al.*, 1997) que entrega el grado de polimorfismo, heterocigosidad, frecuencia alélica, genotípica y equilibrio Hardy-Weinberg. Tambi3n se cuantific3 la relaci3n entre pares de muestras a trav3s de la distancia genética insesgadas de Nei (1978) y an3lisis de cluster (UPGMA). La heterogeneidad de las frecuencias g3nicas se examin3 seg3n Workman y Niswander, 1970; Hart y Clark, 1989. La subdivisi3n poblacional fue examinada a trav3s del an3lisis jerárquico de estructura reproductiva, estadísticas F (Fst, Fit y Fis) (Wright, 1965, 1978), para detectar diferencias poblacionales derivadas de presiones ambientales diferentes como selecci3n y deriva genética (Richardson, 1986, Koehn, 1991). La tasa de flujo g3nico (Nm) fue estimada de la relaci3n  $F_{st} = \frac{1}{4(Nm + 1)}$ . El modelo utilizado es de "aislamiento por distancia", en donde los efectos en cada locus serían independientes ya que existiría una estructura subpoblacional que limita el flujo g3nico en una localidad en particular (Richardson, 1983; Richardson et al., 1986).

#### b) RAPDs:

El an3lisis para los marcadores RAPDs se llev3 a cabo de la siguiente forma: para cada muestra (individuo – poblacion), el patr3n de bandas se determina como presente (1) o ausente (0) para cada uno de los 4 primers a utilizar. Las frecuencias alélicas se generan bajo la asumi3n de la proporci3n Hardy Weinberg utilizando la ecuaci3n  $1 = p^2 + 2pq + q^2$ , donde  $p^2$  es la proporci3n de individuos homocigotos dominantes (expresando 1's para ambos alelos en un mismo loci, teniendo ambos sitios primer),  $2pq$  es la proporci3n de heterocigotos (expresando un 1 y un 0 por cada alelo, teniendo solo uno de los sitios primer), y  $q^2$  es la proporci3n de individuos homocigotos recesivos (expresando 0's para ambos alelos en un mismo loci, faltando en ambos sitios primer). Para realizar los an3lisis RAPDs se cont3 con la informaci3n previa correspondiente a los resultados de los an3lisis de electroforesis enzimática, para determinar si las poblaciones de *L. albus* y *C. concholepas* a analizar se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg. De no



estar las poblaciones en equilibrio HW es necesario incluir el estadístico *F<sub>is</sub>*, una vez llevado a cabo el análisis de los datos de electroforesis enzimática.

Ya establecidos los partidores y optimizadas las condiciones de amplificación para los marcadores moleculares RAPDs se llevó a cabo los análisis para obtener los datos para determinar la siguiente información:

Para cada población: Número observado de alelos, número efectivo de alelos (Kimura & Crow, 1964), diversidad genética (Nie 1973), Índice de información Shannon (Lewontin 1972), número de loci polimórficos y porcentaje de loci polimórficos.

Para todas las poblaciones: frecuencia génica general, flujo génico (McDermott & McDonald, 1993), análisis de diversidad genética en poblaciones subdivididas (Nie, 1987), identidad y distancia genética (Nie, 1972), dendrograma de distancia genética entre poblaciones.

Los análisis genéticos se llevaron a cabo en el programa computacional POPGENE 1.32 (Yeh *et al.*, 1997).

### c) Test de Mantel

El test de Mantel permite establecer el grado de correlación entre matrices de comparaciones pareadas de datos mediante un gran número de permutaciones al azar. Se llevó a cabo este test para establecer el grado de correlación entre la matriz de distancias genéticas de Nei (1978) y la matriz de distancias geográficas (en kilómetros) entre localidades. Este análisis se efectuó en el programa TFPGA y calcula un índice *r* de correlación entre las matrices y un valor de probabilidad a partir de las permutaciones. Las distancias geográficas se obtuvieron trazando una línea recta entre las localidades y midiendo en un mapa a escala la distancia.

### 3.2 Problemas Metodológicos

En general, los problemas enfrentados con la metodología propuesta corresponden a proceso de ajuste de las técnicas utilizadas para cada una de las especies estudiadas.

En el caso de la electroforesis enzimática, la visualización de los productos enzimáticos se consigue por métodos histoquímicos que han sido ampliamente publicados. Sin embargo, cada tejido de cada especie requiere condiciones de pH y de sistemas tampones específicos por lo que sólo a través de pruebas sistemáticas, alternando todas las variables, se puede estandarizar la técnica. Estandarizar la técnica implica que las diferencias en movilidad de las aloenzimas en el gel se reflejen en patrones de bandas fácilmente interpretables y que estas aloenzimas sean polimórficas, es decir, que sea posible identificar homocigotos y heterocigotos.

En particular, el recurso *L. albus* no contaba con información previa de este tipo de estudios, por lo que el proceso de estandarización de la técnica se extendió más de lo esperado. En el caso del recurso loco, a pesar de existir información, en nuestro laboratorio no fue posible replicar de forma inmediata las recetas de tinción conocidas, tomando mucho más tiempo del programado la puesta en marcha de esta técnica. En general, en el caso del erizo se produjo un desfase de tres meses en la actividad de estandarización de la técnica, mientras que en el loco este desfase superó los seis meses.

También, se suma a este desfase, problemas de tipo logístico con la adquisición y abastecimiento de los reactivos necesarios para ejecutar la actividad. Por otro lado, la extensión de la fase de estandarización tuvo un costo asociado que implicó dos solicitudes de reprogramación para paliar el mayor desembolso en



reactivos. Finalmente, dado estos desfases, se solicit3 una extensi3n del periodo del proyecto para la realizaci3n de la actividad de difusi3n de entrega de resultados finales.

La estandarizaci3n de los protocolos para la identificaci3n de marcadores RAPDs tambi3n present3 el mismo tipo de inconvenientes, los cuales eran mas predecibles que para el caso de las electroforesis aloenzimática, puesto que se trata de una t3cnica mucho mas moderna y de la cual no existe por lo tanto, ning3n tipo de informaci3n previa para las especies en estudio. Sin embargo, para la puesta en marcha de esta t3cnica, solo se produjo desfase con respecto a lo programado con el recurso erizo.

La t3cnica de análisis de ADN utilizando RAPDs presenta detractores y defensores y requiere un proceso largo de estandarizaci3n puesto que los productos amplificados pueden variar de acuerdo a muchas condiciones, como la concentraci3n de los primers, la concentraci3n de polimerasa, el tipo de polimerasa, la calidad del ADN, la concentraci3n de ADN, la concentraci3n de magnesio y el programa de utilizado para cada amplificaci3n, donde se puede variar además el periodo de anillamiento, extensi3n y desnaturalizaci3n.

Una de las principales cr3ticas de la t3cnica es la dominancia que presentan los RAPDs y se ha sugerido varias t3cnicas para descartar este rasgo. Sin embargo, es una t3cnica ampliamente usada porque a pesar de sus problemas, los parámetros genéticos obtenidos serían bastante similares a aquellos obtenidos con microsatélites, aloenzimas y RFLP. De este modo, la informaci3n conjunta aportada por ambas metodologías, aloenzimas y RAPDs, aplicada al estudio de las poblaciones de los recursos loco y erizo nos permitieron conocer aspectos importantes de su estructura genética.



## 4. ACTIVIDADES Y TAREAS EJECUTADAS

---

**ACTIVIDAD 1: Ajustar las técnicas de electroforesis enzimática y determinar los marcadores RAPDs a utilizar para ambos recursos en estudio**

### **Programado:**

Estandarización de 8 sistemas enzimáticos y ajuste y optimización de técnicas de extracción y amplificación de ADN de 8 primers.

### **Ejecutado:**

Durante parte del primer y cuarto semestre de ejecución del proyecto se trabajó en el establecimiento de las condiciones óptimas para obtener los sistemas enzimáticos a utilizar en los análisis genético – poblacionales de la especie *Loxechinus albus* (erizo rojo) y *Concholepas concholepas* (loco) respectivamente. El objetivo de esta actividad fue la de establecer el número de sistemas enzimáticos polimórficos con buena resolución de sus alelos que permitirían llevar a cabo los análisis descritos en la metodología (sección 3). Los individuos de *L. albus* utilizados en las numerosas pruebas preliminares de ajuste y optimización, fueron obtenidos en la localidad de Valdivia, mientras que los de *C. concholepas* en la localidad de Canal Refugio (XI región). La fijación y almacenamiento de los tejidos necesarios para los análisis se describen bajo la sección 3 (Metodología) Los 16 sistemas enzimáticos propuestos en el proyecto, fueron sometidos a pruebas de distintas condiciones de pH, y de sistemas de tampones. Para cada uno de estos ensayos se utilizó tres tipos de tejido. Los 16 sistemas enzimáticos analizados fueron los siguientes: PGM (2.7.5.1), GPI (5.3.1.9), ODH (1.5.1.11), XDH (1.2.1.37), PEP (3.4.13.9), ICD (1.1.1.42), GSR (1.6.4.2), EST (3.1.1.1), AAT (2.6.1.1), ME (1.1.1.40), αGPD (1.1.1.8), LAP (3.4.11.1), MDH (1.1.1.37), ADH (1.1.1.1), GD (1.1.1.49), SOD (1.15.1.1).

Finalmente se consiguió estandarizar 8 complejos enzimáticos para la caracterización del recurso erizo que correspondieron a phosphoglucomutase (**PGM; EC 2.7.5.10**), glucose phosphate isomerase (**GPI; EC 5.3.1.9**), peptidase D (**PEP; EC 3.4.13.9**), isocitrate dehydrogenase (**ICD; EC 1.1.1.42**), glutathione reductase (**GSR; EC 1.6.4.2**), esterase (**EST; EC 3.1.1.1**), aspartate aminotransferase (**AAT; EC 2.6.1.1**) y xanthine dehydrogenase (**XDH; EC 1.2.1.37**). Debido al sustancial aumento del costo de los reactivos, desde la presentación de la propuesta a la ejecución (aumento del dólar), los dos últimos sistemas enzimáticos fueron descartados de los análisis para ajustarse al presupuesto, aunque al menos dos poblaciones fueron analizadas para la totalidad de los complejos.

Estos mismos seis complejos mas leucine aminopetidase (**LAP; EC 3.4.11.1**) fueron estandarizados para loco, completándose 7 complejos para este recurso.

A pesar de que no se analizaron los 8 complejos programados, el numero de 6 y 7 complejos estandarizados para erizo y loco respectivamente, se enmarca en el numero de loci frecuentemente reportado en los trabajos de genética poblacional de organismos marinos y los resultados obtenidos a través de ellos son representativos para caracterizar los recursos.

Durante los mismos periodos de la ejecución del proyecto se llevaron a cabo numerosas pruebas para el establecimiento de las condiciones óptimas para la extracción de ADN nuclear de cada tipo de tejido y de las



condiciones óptimas para la amplificación (PCR) de los fragmentos de ADN. Una de las primeras actividades en este contexto fue enviar a confeccionar los 48 partidores de secuencia nucleótida arbitraria que se propusieron en el proyecto (Tabla 2). Nuevamente, es necesario destacar que en las especies *L. albus* y *C. concholepas* no existe precedente de estudios genéticos de esta naturaleza y por ende se requirió bastante tiempo para ajustar las técnicas a utilizar.

El procedimiento optimizado para la extracción de ADN y amplificación utilizando los distintos partidores, se logró, luego de numerosas pruebas con cada uno de los tejidos extraídos y que estaban fijados en etanol al 95%. A través de corridas electroforéticas de ADN genómico en geles de agarosa se determinó que con el tejido de gónada de erizo y con el tejido del borde del manto en loco, se lograba una mayor pureza en la extracción. A partir de ese momento se trabajó solo con esos tipos de tejido optimizando el procedimiento de extracción que se describió en sección 3. Con el propósito de identificar los partidores a utilizar en el estudio, fue necesario primeramente contar con muestras de al menos el 50% de las poblaciones involucradas en el estudio. Ello debido a que estos partidores debían probarse en las distintas poblaciones para determinar su polimorfismo.

Finalmente se logró estandarizar 3 partidores para *L. albus* y 4 para *C. concholepas* lo cual dista de lo 8 primers propuestos inicialmente. Sin embargo, mas que el número de primers analizados, lo importante es el número de loci analizados y en este sentido se observó un alto polimorfismo en cada primer (entre 8 y 14 loci), completándose 36 y 33 loci para erizo y loco respectivamente. En este sentido, el número de loci analizados con esta técnica supera largamente a la técnica de electroforesis enzimática.

## **ACTIVIDAD 2: Obtención de muestras de los recursos en estudio y la respectiva fijación y almacenamiento de tejidos**

### **Programado:**

Obtención de muestras de erizo de 13 localidades y de loco de 12 localidades, completando un total de 1300 y 1200 individuos muestreados respectivamente. Cada muestra obtenida deberá ser rigurosamente identificada y almacenada a la temperatura adecuada

### **Ejecutado:**

Las muestras adquiridas en cada localidad de muestreo fueron mayoritariamente 110 individuos de ambas especies, aunque en algunas localidades se obtuvieron 120, lo cual superó lo programado. Cada muestra almacenada en tubos Eppendorf® fue debidamente rotulada con el lugar de procedencia, tipo de tejido y número de individuo. La capacidad inicial de almacenamiento se vio superada por lo que en una primera instancia fue posible conseguir espacio en un ultra freezer de un académico de otro Instituto dentro de la Universidad. Posteriormente, se reitimizaron algunos fondos para arrendar en forma permanente bidones de nitrógeno líquido, gracias a lo cual fue posible mantener un gran número de muestras sin necesidad de eliminar las ya analizadas.

La obtención de las muestras de estos recursos, que cuentan con periodos de restricción de extracción, se vio garantizada por la autorización para Pesca de Investigación otorgada por la Subsecretaría de Pesca. La autorización para Pesca de Investigación fue otorgada por Resolución N°2891 del 19/12/2002, publicada en el Diario Oficial. El periodo autorizado fue de un año a partir de su publicación, periodo en que no se concretó la obtención del total de muestras de ambos recursos, por lo que se solicitó una extensión del



permiso. La aprobación de la extensión del permiso fue dada por Resolución Exenta N°333 del 30/01/2004 y por un nuevo periodo de 12 meses a contar de la fecha de publicación de la resolución en el Diario Oficial.

### **ACTIVIDAD 3: Análisis genético poblacional de los recursos loco y erizo**

#### ***Programado:***

Estimación de la variabilidad genética, del flujo génico y del grado de diferenciación genética de las muestras obtenidas de los recursos erizo y loco. Además, en el caso del recurso erizo se evaluará la estructura genética de individuos productos de cruzamientos dirigidos (hatchery)

#### ***Ejecutado:***

Los resultados de la estructura genético poblacional de los recursos bajo estudio se entregan en detalle en el punto 5 RESULTADOS. Se dio cumplimiento en su totalidad a los análisis programados, obteniéndose, en el caso del erizo, la primera caracterización a nivel genético poblacional reportada para la especie. En el caso del loco, si bien no es el primer estudio de este tipo, si constituye el primero que abarca todo el litoral chileno bajo un mismo tipo de análisis.

### **ACTIVIDAD 4: Impacto de las poblaciones producidas bajo condiciones controladas sobre las poblaciones naturales de *Loxechinus albus***

#### ***Programado:***

Estimación de la diferenciación genética entre las poblaciones naturales y de hatcheries y determinación del tamaño efectivo poblacional a utilizar en el hatchery

#### ***Ejecutado:***

Se analizó una muestra de individuos producidos bajo condiciones controladas en el hatchery del Centro Tecnológico para la Acuicultura Putemún (IFOP). Estos individuos fueron producidos en agosto de 1997, utilizándose en la reproducción 3 machos y 10 hembras. Se estimó la producción del batch en 97.000 semillas. Estas fueron mantenidas en crecimiento en cajas de cultivo suspendidas en long-lines, debidamente identificadas según su batch de procedencia. Una muestra de 110 individuos de éste batch fue utilizada para los análisis genéticos, teniendo al momento del muestreo la edad de 5 años y un diámetro de testa entre 45-60mm.

Los reproductores utilizados en esta producción fueron extraídos de la localidad de Carelmapu, de modo que para estimar las diferenciaciones genéticas entre la muestra de hatchery y la de banco natural, se obtuvo una nueva muestra de individuos adultos de dicha localidad. Los resultados obtenidos se detallan en el punto 5.1.4 Tamaño poblacional efectivo en hatchery de la sección 5. RESULTADOS.

Para evaluar el tipo de impacto que pudiera tener la introgresión de semillas provenientes de hatchery sobre las poblaciones naturales, actividad desarrollada en el marco de la repoblación de zonas explotadas, se compararon los valores obtenidos de las medidas de diversidad genética de las diferentes muestras. Estos valores (heterocigosidad observada, número alelos, entre otros) no presentaron diferencias entre las



muestras de erizo provenientes de hatchery y banco natural por lo que se considera que el impacto del tipo de manejo llevado a cabo en el hatchery es neutro.

De acuerdo a estos resultados, el número de reproductores utilizados parece ser adecuado, aunque para evitar posibles pérdidas de alelos en futuras reproducciones se ha recomendado a IFOP utilizar al menos el mismo número de hembras y machos y en número mayor según lo reportado (FAO, 1981).

#### **ACTIVIDAD 5: Difusión de los resultados**

##### ***Programado:***

Realización de un seminario taller para la discusión de medidas de manejo y conservación de los recursos en estudio.

***Ejecutado:*** Ver punto 7. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS y ANEXO 3



## 5. RESULTADOS DEL PROYECTO

### 5.1 Caracterización genético poblacional recurso *Loxechinus albus*

Los resultados obtenidos corresponden a los análisis genético-poblacionales completos (por población y multi-poblacional) para el recurso *L. albus*, incluyendo las 12 poblaciones naturales (Figura 1) y la cohorte de juveniles provenientes de hatchery para los 6 sistemas enzimáticos.

#### 5.1.1 Variabilidad Genética en aloenzimas

El número de individuos analizados varía para cada locus y para cada población debido a que en algunos pocos casos hubo mala resolución de bandas, incluso una vez repetido el análisis de esas mismas muestras.

El recuento general de la variabilidad genética por localidad está dado en la Tabla 4 y la frecuencia alélica para las 13 poblaciones se presenta en la Tabla 5. De los 17 loci analizados, 8 (*PGM*, *GPI*, *ICD*, *GSR*, *PEP-2*, *EST*, *AAT*, *ODH*) resultaron ser variables (47.05%) (Tabla 8) en al menos una localidad al considerar las 13 poblaciones. Los loci *AAT* y *ODH* sin embargo, se dejaron fuera de los análisis debido a su falta de resolución en muchas muestras y a los altos costos para el proyecto al repetir esos análisis para numerosas muestras. El 52.95% restante no presentaron variación interpoblacional y evidenciaban fijación alélica, siendo por lo tanto monomórficos.

El número promedio de alelos por locus varió de 2.66 (Tomé, Valdivia, Calbuco y Hueihue) a 3.50 (Pto. Aysén) (Tabla 4). Los valores de heterocigosidad observados fluctuaron entre 24 % en la población de Isla San Pedro a un 40% en la población de Antofagasta. El promedio de heterocigosidad no ponderado de las 13 poblaciones es de 32% (Tabla 8). El valor promedio general esperado según el equilibrio de Hardy-Weinberg corresponde a 48.64% (Tabla 8), valor que indica una diferencia considerable de lo observado con respecto a lo esperado bajo condiciones de equilibrio. Ello está indicando un déficit de individuos heterocigotos, lo cual es posible establecer a través de los valores interpoblacionales del estadígrafo  $d$  (Tabla 6), que presenta en la mayoría de los casos un signo negativo, indicando deficiencia de heterocigotos. Los valores de  $d$  oscilaron entre 0.212 (*PGM*, Antofagasta) y  $-0.723$  (*PGM*, Isla Guafo).

#### 5.1.2 Estadísticas F en aloenzimas

Todos los promedios de  $F_{is}$  fueron positivos y variaron entre 0,277 en el locus *PGM* a 0,430 en el locus *ICD*, indicando que existe un exceso de homocigotos (Tabla 9). El valor promedio general ponderado de  $F_{is}$  fue estimado en 0,342 y señala un déficit de individuos heterocigotos en las 13 poblaciones. Los valores positivos de  $F_{it}$ , que fluctuaron entre 0,305 (*GSR*) y 0.469 (*ICD*), con un valor promedio ponderado de 0,369, indican que se encontró un mayor número de homocigotos en relación a lo esperado (Tabla 9).

Los resultados de los análisis de la varianza estandarizada de las frecuencias alélicas ( $F_{st}$ ) fluctuaron entre 0,012 (*EST*) y 0.067 (*ICD*) con un promedio ponderado de 0,041 (Tabla 9), indicando una escasa subdivisión poblacional que concuerda con los bajos niveles de distancias genéticas registradas (Tabla 10). El promedio general ponderado de  $F_{st}$  indica que el 95,9 % de la varianza total de las frecuencias alélicas es explicada por la variación existente intrapoblacionalmente. Esto equivale a decir que solo el 4,1 % de la varianza total de las frecuencias génicas se debe a diferenciación interpoblacional (Tabla 9).



Al evaluar el flujo génico a través del parámetro  $Nm$  (mediante el reemplazo del valor general ponderado de  $F_{st}$  en la ecuación propuesta por Wright (1943) (Tabla 9), se obtuvo un valor de  $Nm$  de 5,93. Debido a que este valor es mayor que 1, se infiere que la deriva génica es insuficiente para producir diferenciación poblacional por aleatoriedad.

### 5.1.3 Identidad genética en aloenzimas

La identidad genética de Nei (1972) fluctuó entre 0,896 (Tomé – Isla Guafo) y 0,993 (Antofagasta – Pto. Aysén) (Tabla 10). Los valores de identidad de Nei (1972) registrados para *L. albus* se ubican dentro del rango esperado para poblaciones conespecíficas (0,9 – 1,0) (Thorpe, 19785). Estos valores indican diferencias genéticas mínimas entre pares de poblaciones. La identidad es máxima entre Antofagasta y Pto. Aysén. Curiosamente estas poblaciones geográficamente más distantes son casi idénticas, en cambio algunas que se encuentran geográficamente más cercanas muestran mayores diferencias (Tabla 10). Los juveniles producidos en hatchery presentan una alta identidad genética con la población (Carelmapu) de donde generalmente se obtienen los reproductores para los desoves en el laboratorio (0,991) (Tabla 10).

Los valores de distancia genética oscilaron entre 0,006 (Antofagasta – Pto. Aysén) y 0,110 (Tomé – Isla Guafo) (Tabla 10). Estos valores registrados son muy bajos, indican diferencias interpopulacionales mínimas. Las asociaciones entre las poblaciones de *Loxechinus albus* basadas en las distancias genéticas Nei (1972), se presenta en forma de dendrograma en la Figura 7.

Se observan dos ramificaciones principales: una constituida por poblaciones al norte del Canal de Chacao (con la excepción de Pto. Aysén) y otra con poblaciones al sur del canal de Chacao, lo cual podría indicar que la dispersión larval a través de las corrientes costeras se podría ver interrumpida por el flujo y reflujo de las mareas a través del Canal de Chacao que vacía el mar interior de Chiloé durante la marea baja. A su vez, los estudios de corrientes a lo largo de la costa chilena indican que las corrientes derivadas de los vientos predominantes influyen en forma distinta al norte y sur del canal de Chacao (Figura 8), la Deriva del Oeste (West Wind Drift) durante el verano (época de dispersión larval) se separa en dos corrientes frente a la isla de Chiloé, una va hacia el borde costero norte y la otra hacia el sur (Figura 8). Ello podría explicar en cierta medida la agrupación de poblaciones al norte y al sur del Canal de Chacao a base de las distancias genéticas calculadas.

### 5.1.4 Tamaño poblacional efectivo en hatchery

La explotación comercial de bivalvos ha estado tradicionalmente basada en la recolección de animales de bancos naturales, en algunos casos con la adición de algún tipo de manejo, como la puesta de colectores artificiales para incrementar la fijación de semillas. Recientemente la tecnología de hatchery ha permitido la reproducción en cautiverio, en condiciones que maximizan la capacidad reproductiva de los individuos adultos y la sobrevivencia larval. Esto facilita la producción de grandes cantidades de "semillas" que pueden ser utilizadas para cultivo ó repoblamiento.

Desde el punto de vista genético, la utilización de un número relativamente bajo de reproductores puede tener importantes consecuencias. La más importante es que la deriva genética se espera sea mucho más alta que en poblaciones naturales, lo que se traduce en una reducción de la variabilidad genética y en un incremento en la tasa de endogamia de la población en sucesivas generaciones. Además, investigaciones teóricas recientes han demostrado que la distribución de semillas de hatchery en poblaciones naturales para efectos de repoblamiento puede también tener consecuencias indeseables.



La electroforesis enzimática ha sido utilizada frecuentemente para determinar los efectos de la deriva genética en hatcheries. Varios estudios con aloenzimas para determinar la variabilidad genética en poblaciones producidas en hatchery no han demostrado los aparentes efectos de las prácticas de hatchery en la variación alo-enzimática. Sin embargo, estudios recientes han estado dirigidos a estimar el tamaño poblacional efectivo ( $N_e$ ) a utilizar como reproductores en el hatchery. Dado a que *L. albus* es una especie en la cual la producción de "semilla" en hatchery es una práctica común para efectos de repoblamiento principalmente, es que es necesario estimar si los actuales métodos utilizados en el hatchery ( $N_e$ ) podrían estar acarreando problemas de deriva genética y por ende tener un impacto sobre las poblaciones naturales en donde se distribuyen los juveniles para fines de repoblamiento.

Los resultados en *L. albus*, al comparar la población donde se obtienen los reproductores a utilizar en el hatchery (Carelmapu) y los juveniles producidos en el hatchery permiten establecer que el número de alelos es el mismo, solo que el alelo D en el sistema enzimático GPI observado en los juveniles, no aparece en los individuos de la población de Carelmapu, a su vez el alelo C para el mismo sistema enzimático se observó en la población natural, pero no en los juveniles. Ello podría deberse a la reducción de las presiones selectivas en el hatchery en comparación a la población natural. El promedio de alelos por locus (2,83), se mantiene en los juveniles y en los reproductores de *L. albus* en este análisis (Tabla 4). A pesar de estos cambios en la frecuencia alélica entre los juveniles y reproductores, se observó el mismo grado de heterocigosidad observada (0,360) en ambos grupos de *L. albus*, lo cual indica que la heterocigosidad es menos sensitiva que la frecuencia alélica a cambios en los stocks (Tabla 4). Esto se compara con otros estudios en invertebrados en donde tampoco se ha visto una reducción de la heterocigosidad en juveniles obtenidos en hatchery tales como choritos (Gosling, 1982), almejas (Dillon and Manzi, 1987), ostras (Wada, 1986, 1993). Una explicación para la mantención de la heterocigosidad en individuos producidos en hatchery se debe a que la heterocigosidad no solo se debe al número de alelos por locus, si no que a su relativa frecuencia, que es lo que contribuye mayoritariamente a la heterocigosidad.

Frecuencias alélicas similares en un locus determinará la heterocigosidad más alta, mientras que frecuencias alélicas muy diferentes en un locus determinará una muy baja heterocigosidad. Ello implica que frecuencias alélicas muy diferentes en un determinado locus en la población base (reproductores) va a tender a producir frecuencias alélicas mas similares en los juveniles de hatchery, para los alelos que al azar son retenidos ahí.

De esta forma la heterocigosidad no solo es retenida, si no que posiblemente incrementada. Sin embargo, en el caso de pérdida de un alelo en un locus bi-alélico, determinará una dramática perdida de heterocigosidad (= 0). Otra explicación alternativa para la mantención y/o incremento de la heterocigosidad en individuos producidos en hatchery puede generarse a través de la selección por tamaño de las larvas en los sucesivos cambios del tamaño de entre-malla usada al realizar los cambios de agua en los estanques.

A través de esta práctica se van seleccionando los individuos con una tasa de crecimiento mas alta, y existe en la literatura evidencia que sustenta que existe una correlación positiva entre los individuos heterocigotos para multiple locus (multi locus heteocigosity = MLH). De esta forma mayor cantidad de individuos heterocigotos son mantenidos entre los juveniles de hatchery.

De la Tabla 6 se puede apreciar que existe una mayor proporción de heterocigotos en el grupo de juveniles provenientes de hatchery en comparación a la población de reproductores. La población natural de *L. albus* de Carelmapu exhibe una deficiencia de heterocigotos significativa en todos los loci analizados, lo cual esta



de acuerdo con lo observado por otros autores en otros invertebrados marinos, mientras que el 50% de los loci est3n en equilibrio Hardy-Weinberg en el grupo de juveniles producidos en el hatchery.

La mayor proporci3n de heterocigotos en las generaciones de hatchery tambi3n ha sido descrita en otros estudios similares en invertebrados (Wada, 1993), sin embargo, la causa a3n no es muy clara. Ya se mencion3 en el p3rrafo anterior, dos potenciales fuentes de mantenci3n de la heterocigosidad, pero algunos autores tambi3n han propuesto un efecto de selecci3n a trav3s de: a) elecci3n de los reproductores – por lo general , la selecci3n de los reproductores se realiza en base a caracter3sticas cuantitativas, tama3o del individuo, bajo un criterio fisiol3gico como madurez de las g3nadas 3 la elecci3n de individuos mas saludables y b) el cambio de las presiones selectivas en un ambiente artificial.

En relaci3n al tama3o poblacional efectivo ( $N_e$ ) en el caso de *L. albus*, actualmente se est3 trabajando con un  $N_e = 15$ , al utilizar 15 hembras y 5 machos para cada batch de juveniles producidos en el hatchery (IFOP). Dado a que  $N_e$  es muy sensible a la proporci3n entre machos y hembras utilizados, es recomendable para asegurar la mantenci3n de la variabilidad gen3tica de la poblaci3n base se utilicen igual n3mero de hembras y machos en un n3mero total no inferior a 50 (FAO, 1981). Es decir 25 hembras (=  $N_h$ ) y 25 machos (=  $N_m$ ):

$$N_e = \frac{4 N_h N_m}{N_h + N_m}$$

Actualmente  $N_e = \frac{4 \times 15 \times 5}{15 + 5} = \frac{300}{20} = 15$

Sugerido  $N_e = \frac{4 \times 25 \times 25}{25 + 25} = \frac{2500}{50} = 50$

### 5.1.5 Variabilidad Gen3tica en RAPDs

El n3mero de loci obtenidos en las 13 poblaciones fueron 36:

ERI3-1 ERI3-2 ERI3-3 ERI3-4 ERI3-5 ERI3-6 ERI3-7 ERI3-8 ERI3-9 ERI3-10 ERI3-11 ERI3-12  
ERI10-1 ERI10-2 ERI10-3 ERI10-4 ERI10-5 ERI10-6 ERI10-7 ERI10-8 ERI10-9 ERI10-10 ERI10-11  
ERI10-12 ERI10-13 ERI10-14  
ERI15-1 ERI15-2 ERI15-3 ERI15-4 ERI15-5 ERI15-6 ERI15-7 ERI15-8 ERI15-9 ERI15-10

Cada uno de 3 partidores se analiz3 en cada una de las muestras de ADN extra3do de las distintas poblaciones, para establecer el n3mero total de loci presentes para cada partidor. Una vez conocidos la totalidad de loci involucrados en los individuos muestreados de las 13 poblaciones de erizo (36), se comenz3 a realizar los an3lisis gen3ticos estadisticos. Ello, permiti3 analizar la variabilidad gen3tica y establecer relaciones entre las distintas poblaciones muestreadas, como a su vez tambi3n correlacionar los datos obtenidos a trav3s de 3sta t3cnica con los datos obtenidos a trav3s de la electroforesis enzim3tica.

El resumen de la variaci3n gen3tica para todos los 36 loci en las 13 poblaciones de *L. albus* se presenta en la tabla 11. Se puede observar que el valor promedio general de diversidad gen3tica es de 18,5 %. Es muy dif3cil realizar comparaciones de este valor ya que no existen en la literatura muchos datos con RAPDs de invertebrados marinos hasta el momento. Sin embargo, estos an3lisis permitir3n en el futuro contrastar con



nuevos estudios de diversidad genética con el fin de conocer la evolución de la variabilidad genética poblacional en *L. albus*. El valor de  $G_{st} = 0.501$  (Tabla 12) está indicando que la variabilidad intrapoblacional (50%) es similar a la varianza interpoblacional, es decir existiría una notable diferencia con los datos obtenidos a través de electroforesis enzimática, sin embargo estos valores se deben tomar con cautela al no existir hasta el momento datos comparativos obtenidos con la misma técnica de RAPDs en otros invertebrados sometidos a explotación.

### 5.1.6 Flujo génico en RAPDs

El flujo génico estimado utilizando los 36 loci RAPDs (Tabla 12) entrega un valor  $N_m = 0.5$ , que es mucho mas bajo que el obtenido con los datos de electroforesis enzimática ( $N_m = 5.93$ ). El valor estimado de  $N_m$ , indica que el número de migrantes por generación entre las poblaciones muestreadas es de 0.5 individuos aproximadamente. Considerando que se trabajó con 20 individuos como promedio por localidad, el número de migrantes corresponde aproximadamente al 2.5 % por generación. En este caso, con el valor  $N_m$  obtenido utilizando RAPDs, la deriva génica tendría una mayor importancia, sin embargo, ello no se refleja en los valores de distancia genética, los cuales son muy similares a los obtenidos con electroforesis enzimática (Tabla 13).

Los valores de identidad genética oscilaron entre 0.752 y 0.981, valores que están dentro de lo esperado para una población conespecífica. A su vez, los valores de distancia genética oscilaron entre 0.019 y 0.284, valores que permiten decir que prácticamente no existe una subdivisión poblacional para el recurso *L. albus*.

Los valores de distancia genética  $N_{ei}$  se grafican en el dendrograma de la Figura 9, apreciándose claramente una mayor grado de variabilidad que la detectada con electroforesis enzimática. Ello se ve reflejado en el agrupamiento de las localidades Isla Guafo, Isla Laitec y San Pedro, las cuales fueron seleccionadas para establecer si existía alguna distribución poblacional a micro-escala, al estar localizadas geográficamente cercanas entre sí en relación al resto de las localidades, separando a su vez en forma mas clara las localidades mas alejadas geográficamente como, Antofagasta, Calbuco, Pto. Aysén, Carelmapu, Pta Arenas y Valdivia.

Llama la atención el bajo valor de distancia genética entre las localidades de Iquique, Hatchery y Hueihue, lo cual es más difícil de explicar, sin embargo, la producción masiva de juveniles de hatchery llevada a cabo en la localidad de Hueihue, podría influir en un mayor flujo génico entre estas dos poblaciones, así también posibles traslados de juveniles de hatchery para fines de repoblamiento a los alrededores de Iquique, podrían explicar estos bajos valores de distancia génica entre éstas localidades y los juveniles provenientes de hatchery. De todas formas, estos datos necesitan un análisis mucho más acabado, que se irá realizando a través de la preparación de algunos manuscritos para su publicación en revistas de corriente principal.

Finalmente el Test de Mantel indicó que la correlación entre distancia genética y distancia geográfica no mostró un valor significativo ( $r = 0.019$ ;  $p > 0.05$ ), lo cual indica que la distancia geográfica no es la responsable de las diferencias en las frecuencias alélicas encontradas entre las poblaciones, sino que mas bien éstas se deberían a otras causas, como barreras geográficas (corrientes, accidentes geológicos etc.).



## 5.2 Caracterización genético poblacional recurso *Concholepas concholepas*

Los resultados obtenidos corresponden a los análisis genético-poblacionales completos (por población y multi-poblacional) para el recurso *C. concholepas*, incluyendo las 12 poblaciones naturales (Figura 4).

### 5.2.1 Variabilidad Genética en aloenzimas

El número de individuos analizados varía para cada locus y para cada población debido a que en algunos pocos casos hubo mala resolución de bandas, incluso una vez repetido el análisis de esas mismas muestras.

El recuento general de la variabilidad genética por localidad está dado en la Tabla 14 y la frecuencia alélica para las 12 poblaciones se presenta en la Tabla 15. De los 17 loci inicialmente analizados, 7 (*PGM*, *GPI*, *ICD*, *GSR-1*, *PEP-1*, *EST-2*, *LAP*) resultaron ser variables (41.1%) en al menos una localidad al considerar las 13 poblaciones. El 58,9% restante no presentaron variación interpoblacional y evidenciaban fijación alélica, siendo por lo tanto monomórficos.

El número promedio de alelos por locus varió de 2,60 (Coquimbo) a 2,83 (Mejillones y Los Vilos) (Tabla.14). Los valores de heterocigosidad observados fluctuaron entre 34 % en la muestra de Coquimbo a un 49% en la población de Los Vilos. El promedio de heterocigosidad no ponderado de las 12 poblaciones es de 42% (Tabla 16). El valor promedio general esperado según el equilibrio de Hardy-Weinberg corresponde a 44.26% (Tabla 16), valor que indica una diferencia considerable de lo observado con respecto a lo esperado bajo condiciones de equilibrio. Ello está indicando un déficit de individuos heterocigotos.

### 5.2.2 Estadísticas F en aloenzimas

El valor promedio de  $F_{is}$  fue de 0,062 y las estimaciones individuales por locus no revelan una forma generalizada de inbreeding puesto que se observan valores negativos y positivos (Tabla 17). Los valores positivos de  $F_{it}$ , que fluctuaron entre 0,034 (*PEP*) y 0,328 (*LAP*) con un valor promedio ponderado de 0,1242, indican que se encontró un mayor número de homocigotos en relación a lo esperado con excepción de *GPI* (-0,106) (Tabla 17).

Los resultados de los análisis de la varianza estandarizada de las frecuencias alélicas ( $F_{st}$ ) fluctuaron entre 0,011 (*GPI*) y 0,233 (*GSR*) con un promedio ponderado de 0,066 (Tabla 19), indicando una escasa subdivisión poblacional que concuerda con los bajos niveles de distancias genéticas registradas (Tabla 18). El promedio general ponderado de  $F_{st}$  indica que el 93,4 % de la varianza total de las frecuencias alélicas es explicada por la variación existente intrapoblacionalmente. Esto equivale a decir que sólo el 6,6 % de la varianza total de las frecuencias génicas se debe a diferenciación interpoblacional (Tabla 17).

Al evaluar el flujo génico a través del parámetro  $N_m$  (mediante el reemplazo del valor general ponderado de  $F_{st}$  en la ecuación propuesta por Wright (1943) (Tabla 17), se obtuvo un valor de  $N_m$  de 3,56. Debido a que este valor es mayor que 1, se infiere que la deriva génica es insuficiente para producir diferenciación poblacional por aleatoriedad y que un total de 3,56 individuos se están intercambiando por generación.



### 5.2.3 Identidad genética en aloenzimas

La identidad genética de Nei (1972) fluctuó entre 0,8175 (Coquimbo – Los Vilos) y 0,999 (Valdivia – Pto. Aysén) (Tabla 18). Los valores de identidad de Nei (1972) registrados para *C. Concholepas* se ubican dentro del rango esperado para poblaciones conespecíficas (0.9 – 1.0) (Thorpe, 19785). Estos valores indican diferencias genéticas mínimas entre pares de poblaciones. La identidad es máxima entre Valdivia y Pto. Aysén. Sin embargo, en general, no se puede concluir nada importante a través del análisis de diferencias genéticas entre pares de poblaciones, estableciéndose solo que los valores registrados son muy bajos, indicado diferencias interpoblacionales mínimas.

### 5.2.4 Variabilidad Genética en RAPDs

El número de loci obtenidos en las 12 poblaciones fueron 33:

LOCO10-1	LOCO10-2	LOCO10-3	LOCO10-4	LOCO10-5	LOCO10-6
LOCO10-7	LOCO10-8				
LOCO15-1	LOCO15-2	LOCO15-3	LOCO15-4	LOCO15-5	LOCO15-6
LOCO15-7	LOCO15-8				
LOCO19-1	LOCO19-2	LOCO19-3	LOCO19-4	LOCO19-5	LOCO19-6
LOCO19-7	LOCO19-8				
LOCO41-1	LOCO41-2	LOCO41-3	LOCO41-4	LOCO41-5	LOCO41-6
LOCO41-7	LOCO41-8	LOCO41-9			

Cada uno de éstos 4 partidores se analizó en cada una de las muestras de ADN extraído de las distintas poblaciones, para establecer el número total de loci presentes para cada partidore. Una vez conocidos la totalidad de loci involucrados en los individuos muestreados de las 12 poblaciones de loco (33), se comenzó a realizar los análisis genéticos estadísticos. Ello, permitió analizar la variabilidad genética y establecer relaciones entre las distintas poblaciones muestreadas, como a su vez también correlacionar los datos obtenidos a través de ésta técnica con los datos obtenidos a través de la electroforesis enzimática.

El resumen de la variación genética para todos los 33 loci en las 12 poblaciones de *C. concholepas* se presenta en la tabla 19. Se puede observar que el valor promedio general de diversidad genética es de 29,9 %. Es muy difícil realizar comparaciones de este valor ya que no existen muchos datos con RAPDs en la literatura de invertebrados marinos hasta el momento. Sin embargo, estos análisis permitirán en el futuro contrastar con nuevos estudios de diversidad genética con el fin de conocer la evolución de la variabilidad genética poblacional en loco.

El valor de  $Gst = 0,20$  (Tabla 20) está indicando que la variabilidad intrapoblacional (20%) es menor a la varianza interpoblacional, es decir existiría una similitud con los datos obtenidos a través de electroforesis enzimática, aunque en este último caso las diferencia es mucho mayor. Sin embargo estos valores se deben tomar con cautela al no existir hasta el momento datos comparativos obtenidos con la misma técnica de RAPDs en otros invertebrados sometidos a explotación.

### 5.2.5 Flujo génico en RAPDs

El flujo génico estimado utilizando los 33 loci RAPDs (Tabla 20) entrega un valor  $Nm = 1.93$  que es mas bajo que el obetnido con los datos de electroforesis enzimática ( $Nm = 3.56$ ). El valor estimado de  $Nm$ , indica que el número de migrantes por generación entre las poblaciones muestreadas es de 1,93 individuos



aproximadamente. Considerando que se trabajó con 20 individuos como promedio por localidad, el número de migrantes corresponde aproximadamente al 9,65 % por generación. En este caso, con el valor Nm obtenido utilizando RAPDs, la deriva génica tendría una mayor importancia, sin embargo, ello no se refleja en los valores de distancia genética, los cuales son muy similares a los obtenidos con electroforesis enzimática (Tabla 21).

Los valores de identidad genética oscilaron entre 0,853 (Aysén y Guafo) y 0,996 (Mejillones-San Antonio) valores que están dentro de lo esperado para una población conespecífica. Los valores de distancia genética Nei se grafican en el dendrograma de la Figura 10, apreciándose claramente un mayor grado de claridad que la detectada con electroforesis enzimática. Ello se ve reflejado en el agrupamiento de las localidades de Pto. Aysén y Pto. Natales conformando un cluster, luego Isla Guafo, Mejillones, Los Vilos, San Antonio y Coquimbo en un segundo cluster y finalmente Corcovado, Valdivia, Castro, Maullín y Quellón en un tercer cluster.

De este modo se podría hablar de un cluster Extremo Sur, uno cluster Sur y un tercer cluster Norte-Centro. Este patrón fue confirmado por el Test de Mantel que arrojó una correlación positiva y significativa entre la distancia geográfica y la distancia genética ( $r=0,371$ ,  $p<0.01$ )



## **6. PROBLEMAS ENFRENTADOS**

---

En general, el proyecto presentó un bajo nivel de problemas, enmarcándose estos en problemas de tipo técnico y de administración.

En el punto 3.2 se dio cuenta en detalle de los problemas de tipo técnico metodológicos enfrentados. Por otro lado, en la administración y logística de la ejecución del proyecto, hubo algunos inconvenientes originados por el desfase en la cancelación de algunos compromisos con proveedores. Este problema originó en su momento la retención de cuotas de aporte FIA por el alto saldo existente.

La última retención de cuota se ha producido a raíz del no pago de los montos programados como incentivos del Coordinador General, cuyas razones forman parte de acciones de tipo administrativas internas del Instituto.



## 7. DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

---

Una primera actividad de difusión fue la asistencia al Seminario "Proyectos de I&D e Innovación en Biotecnología Silvoagropecuaria: Situación Actual Chilena", realizado el 18 y 19 de Julio en la Sede CEPAL (Santiago, Chile), ocasión en la cual fue presentado el panel "Caracterización genética poblacional para el manejo y la conservación de recursos marinos de importancia para la acuicultura y la pesquería" de los autores Vergara, A.M., Toro, J.E., Ojeda, J.A. y R.B. Olate. Se adjunta una lámina reducida del panel (Anexo 3).

Por otro lado, según lo programado, se contempló la realización de un seminario taller con el fin de dar a conocer los resultados del proyecto y a su vez generar una discusión entre los asistentes para difundir y respaldar las recomendaciones que se generan a partir de los resultados obtenidos.

Este Seminario Taller de clausura del proyecto, se llevó a cabo en la ciudad de Puerto Montt el día Miércoles 23 de Marzo a las 10:00 h. Entre los asistentes, además del Sr. Tomás García Huidobro (Fundación para la Innovación Agraria) y expositores, hubo personeros de Subsecretaría de Pesca (SUBPESCA), del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), Consultoras privadas que trabajan en áreas de manejo, Investigadores de otras Universidades y estudiantes de postgrado.

No asistieron al evento personeros de la Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA) y del Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA), quienes habían confirmado su asistencia. En el seminario expusieron el Dr. Gonzalo Gajardo (Universidad de Los Lagos) "Estado de la conservación de los recursos genéticos en Chile", Dr. Jorge Toro Y. (Universidad Austral de Chile) "Caracterización genético-poblacional del recurso *Loxechinus albus*" y Ana María Vergara M. (Instituto de Fomento Pesquero) "Caracterización genético-poblacional del recurso *Concholepas concholepas*". Se adjuntan las presentaciones (Anexo 3).

Además, el proyecto contempla la publicación en revistas indexadas de los resultados obtenidos en ambos recursos. Los respectivos manuscritos están en elaboración y se espera que en los próximos meses, al menos dos publicaciones ya se encuentren enviadas a los respectivos comités editoriales. Una de ellas conteniendo los resultados obtenidos para el recurso *Loxechinus albus* (erizo rojo) y la otra con los resultados del recurso *Concholepas concholepas* (Loco).

Según la literatura revisada, Conservation Biology, Genetics and Molecular Biology, y Marine Ecology PSZN son las revistas que presentan una mayor cantidad de publicaciones en el área del presente estudio. Se enviará en un primer término ambas publicaciones a Conservation Biology, pero se tendrán como segunda y tercera opción las otras dos mencionadas, dado que, el publicar en revistas de mayor impacto, como Conservation Biology, resulta muchas veces un proceso extremadamente lento.

Los temas que serán abordados en las publicaciones, corresponden a los resultados totales del proyecto y los títulos tentativos son: "Genetic structure of population of wild and hatchery chilean sea urchin, *Loxechinus albus*" y "Genetic structure of population of the chilean abalone *Concholepas concholepas* along the chilean coast: relevance for management and conservation".



## 8. IMPACTOS DEL PROYECTO

---

Los resultados del presente proyecto, a pesar de solo constituir el estudio de la estructura genético poblacional correspondientes a las líneas base para ambas especies (ya que no existen estudios previos), representa el más importante trabajo de caracterización genética realizado en ambos recursos (Loco y Erizo) de importancia económica. Sin duda, que estos resultados tendrán un gran impacto en la generación de políticas de manejo en ambos recursos, sin embargo, se espera que en un futuro próximo, (4 años con el fin de muestrear distintas generaciones a las ya estudiadas), se pueda llevar a efecto un estudio similar, con el fin de contrastar los resultados obtenidos.

El hecho de que los resultados obtenidos demuestren que la subdivisión poblacional en ambas especies es casi inexistente, confirma que el flujo génico generado por una parte a través del prolongado estado larval pelágico (25-30 días en el erizo y 3 ó mas meses en el loco) en ambas especies, y por otro lado a la transferencia de juveniles para efectos de repoblamiento, es bastante significativo. La mantención de la identidad poblacional debe ser uno de los objetivos en el manejo de ambas especies, con el fin de mantener una variabilidad genética que permita que la pesquería del recurso sea sustentable en el tiempo.

Es importante eso sí recalcar que este estudio representa una "fotografía" de estructura genético-poblacional en ambas especies y que es muy necesario (lo cual fue también una de las conclusiones del Seminario Taller realizado) llevar a cabo una nueva investigación en un lapso de tiempo no superior a los 4 años, para de esta forma describir la dinámica (y no solo estática) de la estructura genético poblacional. Esto último tendría un impacto mayor, ya que las políticas de manejo no solo se basarían en un estudio (línea base), si no que en una mayor evidencia sostenida por la inclusión de nuevas generaciones. Es importante destacar esto, ya que los ejemplares muestreados durante este proyecto podrían haber sido reclutados durante condiciones ambientales fuera de lo común (fenómeno del Niño, reducción en la surgencia costera, etc), tratándose así de una muestra no representativa (sujeta a mortalidades diferenciales y condiciones de reclutamiento anormales) y por ende la generación de políticas a partir de ello podría ser inadecuado.

Como uno de los principales objetivos del presente estudio es apoyar la toma de decisiones del manejo de las especies estudiadas, es importante revisar las actuales medidas de manejo que están siendo aplicadas. El recurso loco, es la especie con un mayor número y diversidad de regulaciones pesqueras, entre las que se cuentan; vedas extractivas y reproductivas, talla mínima legal, áreas de manejo, cuotas totales de extracción regionales, cuotas individuales intransferibles, cierre de registros artesanales, entre otras. A partir de 1998 se pone en práctica el régimen de Áreas de Manejo y Explotación de Recursos Bentónicos (Art.48, letra d de la Ley de Pesca), el cual constituye, la herramienta de manejo más efectiva que dispone la Autoridad Pesquera en la actualidad. Con la implementación de esta medida, se inició una profunda transformación estructural y funcional de las pesquerías artesanales de recursos bentónicos, cuyo propósito está orientado a lograr una recuperación del sector, a través del cumplimiento de cinco objetivos básicos: 1) conservación de los recursos bentónicos (invertebrados), 2) sustentabilidad de la actividad económica artesanal mediante la asignación de "bancos naturales", 3) mantener o incrementar la productividad biológica de estos recursos bentónicos, 4) incrementar el conocimiento del funcionamiento del ecosistema bentónico, 5) incentivar y promover el manejo participativo (Estado – sector Pesquero Artesanal).

En la práctica la implementación de la medida anteriormente señalada, significó el término de la fijación de las cuotas totales e individuales de extracción a partir de 1999, siendo en la actualidad entre la I y XI región el único régimen en aplicación. De este modo, el recurso loco se encuentra bajo una veda



extractiva de la I a la XI Región, desde junio del 2000 a la fecha. Además, la zona norte cuenta con una veda reproductiva entre el 16 julio y el 31 de enero de cada año, periodo en el cual, las áreas de manejo de recursos bentónicos que cuenten con planes de manejo aprobados por la Subpesca, pueden realizar extracción del recurso

A la fecha, el proceso de aplicación de esta nueva medida de administración puede considerarse exitoso entre la III a V Regiones, mientras que en las regiones I, II y VI a XI, este proceso se ha desarrollado más lentamente y su éxito deberá ser evaluado en la medida que avance el proceso de implementación.

En el marco de la medida administrativa de Áreas de Manejo y Explotación de Recursos Bentónicos para el recurso objetivo loco, los resultados obtenidos en el presente proyecto proporcionarían la línea base para determinar, en un futuro cercano, si este régimen de explotación de los bancos naturales está siendo efectivo en el cumplimiento de la conservación del recurso, según el primer objetivo de la medida administrativa. Aunque, tal vez, la conservación del recurso haya sido pensada a un nivel poblacional y/o ecosistémico, en el presente estudio se ha proporcionado evidencia suficiente para que la evaluación del estado de conservación de un recurso sea hecho también a nivel de genes.

En relación al recurso erizo, cuenta con la regulación pesquera de veda reproductiva que se extiende desde el 15 de octubre al 15 de enero, con una talla mínima legal de extracción de 70 mm. También el recurso erizo ha sido visualizado como uno de los principales recursos objetivos en las Áreas de Manejo.

Sin embargo, lo que representa una mayor amenaza a la pérdida de diversidad genética en el recurso erizo, lo constituye la producción de semillas en hatchery y el posterior repoblamiento de áreas naturales sobreexplotadas o áreas de manejo.

A pesar que el reglamento de áreas de manejo contempla actividades de repoblación (Art. 16, letra e), sólo recientemente se ha repoblado con semillas de erizo áreas de manejo de la III, V y X (Proyecto Fondef D011142), sin contarse aún con una evaluación del éxito de este repoblamiento en términos productivos. En general, las experiencias de repoblación mediante siembras de estados juveniles, es una práctica relativamente reciente en el mundo. De acuerdo a lo informado por la Subsecretaria de Pesca, (junio, 2001) las proyecciones de producción de las áreas de manejo dejan en evidencia la importancia de fomentar y fortalecer la investigación en temas de acuicultura y repoblación, con el objeto de incrementar su producción

En este contexto, una vez mas los resultados del presente proyecto, proporcionarían la línea base para evaluar si las producciones realizadas en hatchery, están siendo lo suficientemente responsables (adecuado tamaño efectivo de reproductores) como para que su uso en repoblación no cause una introgresión negativa.

Finalmente, y en otro contexto, el proyecto tuvo un impacto positivo en la generación de nuevas capacidades técnicas, con la formación de dos técnicos entrenados en técnicas genéticas de laboratorio. Estas personas corresponden a Johana Ojeda Palma y Rosella Olate Diaz.



## 9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

---

El polimorfismo encontrado en las poblaciones naturales de invertebrados alcanza niveles muy altos, siendo los invertebrados los que alcanzan los mayores niveles (43% a 73 %). Considerando estos valores, los valores de 47,05 % estimados en *Loxechinus albus* y 41,1% en *Concholepas concholepas* concuerdan con los patrones registrados en otras especies de invertebrados marinos. Por su parte la variabilidad genética expresada como heterocigosidad fue como promedio general de 32 % y 42 % dentro del rango para los organismos marinos.

Los resultados de la prueba de heterogeneidad interpoblacional estarían indicando que las diferencias en la estructura genética de las poblaciones de erizo y loco, no son significativas, a pesar de las distancias geográficas que las separan y de las diferencias ambientales. Ello sugiere altas tasas de migración entre ellas, en este caso a través de la dispersión larval ya que el periodo larval pelágico de erizo es de aproximadamente 30 días, mientras que el del loco supera los 90 días, lo que acompañado de las corrientes costeras podría potencialmente impedir una diferenciación local. Ello se ve corroborado a través de los valores de  $F_{st}$  que predice que solo el 4,07 % de la varianza en las frecuencias alélicas se debe a diferencias inter-poblacionales en erizo mientras que este valor es de 6,6% en loco.

La homogeneidad genética interpoblacional ha sido teóricamente explicada a través de la hipótesis de la amplitud del nicho y/o efectos de cuello de botella por las que han pasado las poblaciones. Sin embargo, independiente de la interpretación selectiva ó aleatoria de la homogeneidad genética observada entre algunas poblaciones, el sistema de corrientes a lo largo de la costa chilena y la prolongada vida larval pelágica del erizo y del loco, promueve el intercambio genético entre poblaciones.

La cuantificación del flujo génico es difícil, especialmente en organismos con etapas de vida larval pelágica y por ende solo es posible utilizar métodos indirectos, a través de la estima de frecuencias alélicas (Slatkin, 1987). Se ha descrito en la literatura que un escaso flujo génico es suficiente para mantener homogeneidad genética entre poblaciones conespecíficas (Slakin, 1987; Koehn, 1985; Beaumont & Hoare, 2003). Al estimar  $Nm$ , su combinación de parámetros indica la fuerza relativa del flujo génico y deriva génica. Como  $Nm$  es mayor a 1 para ambas especies (5.93 y 3.56 para erizo y loco respectivamente), la deriva génica es incapaz de producir diferenciación poblacional (Hartl & Clark, 1989, Beaumont & Hoara, 2003). Esta afirmación se apoya en la evidencia de altos valores de identidad genética entre poblaciones de erizo analizadas. El valor estimado de  $Nm$ , indica que el número de migrantes por generación entre las poblaciones muestreadas es de 6 individuos aproximadamente en erizo y de 4 en loco. Considerando que se trabajó con 100 individuos como promedio por localidad, el número de migrantes corresponde aproximadamente a al 6% y 4% por generación.

A pesar de su amplia distribución geográfica *L. albus* y *C. concholepas* se comportan como una sola gran unidad poblacional panmixica, tal como se sugiere por Slakin (1981) para especies que no evidencian diferenciación interpoblacional ni subdivisión intrapoblacional. Los valores de  $F_{is}$  en la mayoría de las poblaciones naturales son cercanos a cero (Hartl & Clark, 1989). El índice de fijación  $F_{st}$  en ambas especies indica que la subdivisión poblacional es muy baja, debido a que no se evidencian variantes alélicas fijadas alternativamente en diferentes poblaciones. En otras palabras, la tasa de migración entre las localidades enfatiza la eficiencia de la dispersión larval para asegurar, que los mismos alelos, a pesar de la presión selectiva de la pesquería del recurso, serán compartidos por los stocks de reproductores a través del tiempo evolutivo.



En el caso del loco, sin embargo, la dispersión larval y el posterior asentamiento al azar que favorecerían el patrón macrogeográfico de homogeneidad genética se contraponen con la distribución no al azar de genotipos según lo indicado por la existencia de asociación entre distancia geográfica y genética (test de Mantel).

Cuando las poblaciones naturales son afectadas por condiciones ambientales desfavorables, pueden reducirse drásticamente en número y corren el riesgo de extinguirse. Si la reducción es severa, la población experimenta un "cuello de botella" demográfico. Durante este episodio las poblaciones mostrarán bajos niveles de heterocigosidad y una alta similitud genética. Debido a la fuerte presión antrópica ejercida sobre las poblaciones de erizo y loco durante la última década estos recursos podrían haber experimentado en algún momento un cuello de botella poblacional que daría cuenta de la deficiencia de heterocigotos y la alta similitud genética interpoblacional encontrada.

Los individuos genéticamente mejor adaptados poseen un mejor desarrollo ontogénico (altas tasas de crecimiento, fecundidad, fertilidad etc). Producto de la alta extracción de erizos, se está ejerciendo una selección artificial sobre ellos, eliminándose de las poblaciones aquellos individuos mejor adaptados (heterocigotos con mayor tasa de crecimiento) (Beaumont & Hoara, 2003). A largo plazo, las poblaciones estarán constituidas cada vez más por individuos con menores capacidades adaptativas, dejando descendientes biológicamente inferiores, distribuidos en habitats fragmentados posibilitando la extinción local.

A base de estos resultados las bases para el manejo del recurso debe considerar esta especie como genéticamente homogénea a lo largo del litoral chileno. Sin embargo, se debe tener presente que a pesar de los bajos niveles de diferenciación poblacional encontrados en ambos recursos, fue posible detectar clusters de los análisis de distancias genética que darían cuenta de un quiebre a nivel del Canal de Chacao en el caso de erizo, donde se podría hablar de poblaciones al norte y al sur de este Canal. En el caso del loco, la presencia de tres clusters (extremo sur, sur, y norte-centro) permite proponer que estos agregados sean considerados como unidades independientes para el manejo del recurso.

La relevancia que este tipo de estudios queda de manifiesto al ver los resultados obtenidos para la estructura genético poblacional del recurso *L. albus* y *C. concholepas*, ya que es muy bien conocido en la literatura internacional que el manejo de una especie de valor comercial, debe sin lugar a dudas, contemplar la variabilidad genético-poblacional bajo condiciones naturales (y de explotación) y bajo el supuesto que las variantes alélicas son adaptativas. De esta forma, una potencial reducción de la variabilidad genética debido a una extracción indiscriminada (sobre-explotación), ó un plan de manejo inadecuado, puede resultar en la incapacidad, por parte de los organismos que componen esas poblaciones naturales, de responder a cambios ambientales futuros.

Las medidas de manejo propuestas, dados los resultados obtenidos apuntarían a:

- Determinar como unidades de manejo las poblaciones Norte-Centro-Sur de erizo (del norte al canal de Chacao) y Sur-Extremo-Sur (desde el canal de Chaco al sur)
- Determinar como unidades de manejo para el recurso loco la zona Norte-Centro (hasta la V región), zona Sur (X región) y zona Extremo Sur (XI y XII regiones).



- No permitir el traslado de individuos para repoblación u otros fines, entre las unidades de manejo propuestas
- Permitir la repoblación con semillas producidas en hatchery siempre y cuando se garantice que el tamaño efectivo de reproductores haya sido el recomendado.
- Utilizar reproductores de las unidades de manejo propuestas para producir semillas que serán utilizadas para repoblar las mismas zonas.



## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

---

- Ayala F.J.; D. Hedgecock; G.S. Zumwalt and J.M. Valentine. 1972. Genetic variation in *Tridacna maxima*, in ecological analog of some unsuccessful evolutionary lineages. *Evolution*, 27:177 - 191.
- Baruffi, G., Damiani, G., Guglielmino, C.R., Bandi, C., Malacrida, A.R. & G. Gasperi. 1995. Polymorphism within and between populations of *Ceratitis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis. *Heredity*, 74: 425-437
- Buffery, C. 1995. The polymerase chain reaction. pp. 51-62. In: J.M. Walker & E.B. Gingold (eds) *Molecular Biology and Biotechnology*. Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Comesaña, A.S., J.E. Toro, D.J. Innes and R.J. Thompson. 1999. A molecular approach to the ecology of a mussel (*Mytilus edulis* - *M. trossulus*) hybrid zone on the east coast of Newfoundland, Canada. *Mar. Biol.*, 133: 213-221.
- Harris H., Hopkinson D.A., 1976, *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North Holland Publ. Co., Amsterdam, 283pp
- Kimura, M. & J. F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-738.
- Hartl D.L. & A.G. Clarck. 1989. *Principles of population genetics*. 2<sup>nd</sup>. Ed. Sinauer Associates, Southerland, MA.
- Koehn R.K., 1991, The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. *Aquaculture* 94,125-145.
- Lewontin, R.C.. 1964. The interaction of selection and linkage. I. General considerations, heterotic models. *Genetics*, 49: 450-472
- Nie, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106: 283-292
- Nie, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci.*, 70: 3321-3323
- Nei M. 1978 Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- Nie, M. 1987. *Molecular and evolutionary Genetics*, Columbia University Press, N.Y. 176-187 pp.
- Richardson, B.J.; P.R. Baverstock and M. Adams. 1986. *Allozyme Electrophoresis*. 3a.ed. Academic Press Australia, Australia.
- Rohlf, F.J. 1992. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Version 1.70. Exeter software, New York.



- Roff, D.A and Bentzen. 1989. The statistical analysis of mtDNA polymorphisms:  $X^2$  and the problem of small samples. *Molecular Biology Evolution*, 6: 537-547
- Rogers, J. 1972. Measure of genetics similarity and genetics distance. University Texas Publishing, 7213: 145 - 153.
- Shaw C.R., Prasad R., 1970, Starch gel electrophoresis of enzymes – a compilation of recipes. *Biochem. Genet.* 4, 297-320.
- Toro J.E. 1998. PCR-based nuclear and mtDNA markers and shell morphology as an approach to study the taxonomic status of the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Bivalvia). *Aquatic Living Resources* 11, 347-353.
- Toro, J.E. 1999. Life history variation in *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) and *M. trossulus* (Gould, 1850) in a hybrid zone on the east coast of Newfoundland. Memorial University, Ph.D. Thesis. 163 pp.
- Torres, R. 1992. Variación alozímica de *Concholepas concholepas* (Bruguiere, 1789) (Gastrópoda: Muricidae) en tres localidades de la zona centro sur de Chile. Tesis, Universidad Austral de Chile, Valdivia, 55 pp.
- Wilkinson L. 1991. SYSTAT. The system for statistics, Systat Inc., Evaston, Illinois, 676 pp.
- Workman P.L. and J.B. Niswander. 1970. Population studies on southwestern indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *American journal Human Genetics*, 22: 24-49.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to System of mating. *Evolution*, 19: 395 - 420.
- Wright, S. 1978. variability within and among natural populations. Vol. 4. The Univ. of Chicago Press, Chicago.
- Yeh F.C., Boyle T.J.B., 1997, Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belg. J. Bot.* 129, 157.



## **10. ANEXOS**

---

Anexo 1. TABLAS

Anexo 2. FIGURAS

Anexo 3. PRESENTACIONES

## Anexo **1**: Tablas

---

**Tabla 1.** Centros de desembarque y ubicación geográfica de los sitios de muestreo del recurso *Loxechinus albus*

LOCALIDAD	REGION	UBICACIÓN GEOGRÁFICA
Huaiquique (Iquique)	I Región	20° 13' S ; 70° 09'W
Punta Angamos (Antofagasta)	II Región	23° 38' S ; 70° 24'W
Caleta Tumbes (Tomé)	VIII Región	36° 05' S ; 72° 58'W
Morro Gonzalo (Valdivia)	X Región	39° 48' S ; 73° 24'W
Carelmapu	X Región	41° 44' S ; 73° 42'W
Calbuco	X Región	41° 45' S ; 73° 08'W
Hueihue	X Región	41° 52' S ; 73° 31'W
Dalcahue (Castro)	X Región	42° 22' S ; 73° 39'W
Isla Laitec	X Región	43° 12' S ; 73° 36'W
San Pedro	X Región	43° 20' S ; 73° 42'W
Isla Guafo	X Región	43° 32' S ; 74° 41'W
Puerto Aysén	XI Región	45° 23' S ; 72° 43'W
Punta Arenas	XII Región	53° 09' S ; 70° 55'W

Tabla 2. Partidores (primers) utilizados en pruebas para marcadores RAPDs.

Primer N°	Secuencia 5' - 3'	Primer N°	Secuencia 5' - 3'
1	CCTGGGTTTG	25	AGAGGGTTCT
2	ACAGGGCTCA	26	TGTCGGTTGC
3	CCGGCCCCAA	27	ATGTGTTGCG
4	TTCCCCGCC	28	GTGCGTCCTC
5	GAGGGCGTGA	29	AGCAGCGTGG
6	GAGGGCGAGC	30	GGAGGCTCTG
7	GAGGGCGAGG	31	GAGTCACGAG
8	GAGCACCAGG	32	CCAAGATGCT
9	GAGCTCGTGT	33	ACTGCTACAG
10	GAGCACGGGG	34	CCAATTCACG
11	GGGCTCGTGG	35	ACGACGTAGG
12	GGGCGCGAGT	36	TGACCCCTCC
13	ATCCTGCCAG	37	AACGGGCAGC
14	ATCGGGTCCG	38	ATGACGACGG
15	GCGGCTGGAG	39	GTGCGTCGCT
16	GGTGGGGACT	40	AGAATCCGCC
17	GGGCAATGAT	41	GCAGGACTGC
18	CTCGGGTGGG	42	GAGCACTTAC
19	CGTCTGCCCC	43	CGGTTTGAA
20	TAGCCCGCTT	44	ACGGCCGACC
21	TACGATGACG	45	GCACCGAGAG
22	GCGGTATAGT	46	GAAGCGCGAT
23	AACACACGAG	47	GCTGCGTGAC
24	GGTCTCTCCC	48	CGAACGGCGG

**Tabla 3.** Centros de desembarque y ubicación geográfica de los sitios de muestreo del recurso *Concholepas concholepas*.

LOCALIDAD	REGION	UBICACIÓN GEOGRÁFICA
Mejillones	II Región	23°05' S ; 70° 27'W
Caleta Hornos (Coquimbo )	IV Región	29° 30' S ; 71° 15'W
Pichidangui (Los vilos)	IV Región	32°08' S ; 71°37' W
El Quisco (San Antonio)	V Región	33° 23' S ; 71°44'W
Niebla (Valdivia)	X Región	39°50' S ; 73°26' W
Mauñin (Calbuco)	X Región	41° 37' S ; 73°37'W
Dalcahue (Castro)	X Región	42° 22'S ; 73° 37'W
Huafo	X Región	43°33' S ; 74° 50' W
Quellón	X Región	43°06' S ; 73° 42' W
Corcovado	X Región	43°31' S ; 73° 46' W
Canal Refugio (Pto aysén)	XI Región	43° 58'S ; 73° 05' W
Puerto natales	XII Región	51° 44' S ;72° 31'W

**TABLA 4:** Frecuencias alélicas para los seis loci polimórficos resueltos en las 12 poblaciones provenientes de 12 localidades y en los juveniles de hatchery de *Loxechinus albus*.

		Poblaciones												
		Iquique	Antofagasta	Tomé	Valdivia	Calbuco	Hatchery	Pto. Aysén	Huelihue	Pta. Arenas	I. Guafo	I. Laitec	San Pedro	Carelimapu
n	Locus													
	<b>PGM</b>													
A		.089	.064	.082	.077	.118	.070	.061	.076	.116	.415	.268	.225	.131
B		.504	.596	.706	.612	.668	.688	.684	.745	.722	.386	.629	.610	.695
C		.326	.314	.207	.291	.202	.220	.240	.179	.162	.199	.103	.165	.165
D		.072	.026	.005	.020	.013	.022	.015	.000	.000	.000	.000	.000	.009
E		.009	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	<b>GPI</b>													
A		.473	.306	.223	.298	.302	.233	.355	.170	.127	.163	.225	.211	.210
B		.527	.694	.745	.697	.698	.762	.591	.797	.585	.567	.495	.711	.681
C		.000	.000	.032	.005	.000	.000	.050	.034	.259	.270	.280	.078	.109
D		.000	.000	.000	.000	.000	.005	.004	.000	.028	.000	.000	.000	.000
	<b>ICD</b>													
A		.387	.332	.488	.587	.216	.328	.282	.086	.142	.189	.209	.163	.220
B		.604	.663	.512	.413	.784	.662	.636	.768	.602	.660	.694	.658	.706
C		.009	.005	.000	.000	.000	.010	.078	.146	.239	.151	.097	.179	.075
D		.000	.000	.000	.000	.000	.000	.004	.000	.017	.000	.000	.000	.000
	<b>GSR</b>													
A		.365	.208	.192	.183	.329	.197	.272	.113	.237	.254	.149	.164	.248
B		.539	.620	.692	.606	.637	.697	.558	.658	.582	.686	.703	.701	.646
C		.096	.172	.116	.211	.034	.106	.170	.230	.181	.060	.148	.136	.106
D		.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	<b>PEP</b>													
A		.538	.617	.734	.600	.573	.458	.558	.452	.544	.438	.564	.289	.434
B		.462	.383	.266	.400	.427	.542	.428	.548	.428	.546	.417	.687	.566
C		.000	.000	.000	.000	.000	.000	.014	.000	.028	.017	.019	.024	.000
D		.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
	<b>EST</b>													
A		.471	.390	.329	.451	.361	.413	.333	.351	.365	.505	.397	.372	.312
B		.519	.605	.671	.549	.630	.587	.652	.649	.600	.495	.603	.628	.688
C		.005	.005	.000	.000	.009	.000	.015	.000	.035	.000	.000	.000	.000
D		.005	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
Prom. Alelos/locus		3.17	2.83	2.66	2.66	2.66	2.83	3.50	2.66	3.33	2.83	2.83	2.83	2.83
Prom. Heterocigosidad		0.34	0.40	0.33	0.35	0.33	0.36	0.31	0.29	0.34	0.25	0.26	0.24	0.36

**TABLA 5.** Frecuencia alélica para las 13 poblaciones de *Loxechinus albus*:

Allele \ Locus	PGM	GPI	ICD	GSR	PEP	EST
Allele A	0.1428	0.2527	0.2709	0.2277	0.5188	0.3872
Allele B	0.6309	0.6561	0.6488	0.6375	0.4729	0.6069
Allele C	0.2115	0.0885	0.0786	0.1348	0.0084	0.0055
Allele D	0.0141	0.0028	0.0016			0.0004
Allele E	0.0007					

**Tabla 6.** Coeficiente de deficiencia ó exceso de heterocigotos por locus (d) en 12 poblaciones naturales y una muestra de juveniles producidos en hatchery de *Loxechinus albus*. Significación estadística utilizando Chi<sup>2</sup> (\* = p< 0.05, NS= no significativo).

IQUIQUE

Locus	Heterocigotos observados	Heterocigotos esperados	d
PGM	56	73.16	-0.235 *
GPI	38	56.08	-0.322 *
ICD	16	25.98	-0.384 *
GSR	33	65.45	-0.496 *
PEP-2	45	52.44	-0.142 NS
EST	19	52.10	-0.635

ANTOFAGASTA

PGM	62	51.17	0.212 NS
GPI	32	41.84	-0.235 *
ICD	26	44.32	-0.413 *
GSR	47	52.39	-0-103 NS
PEP-2	32	44.66	-0.284 *
EST	26	41.73	-0.377 *

TOME

PGM	37	42.48	-0.130 *
GPI	26	37.27	-0.302 *
ICD	23	42.72	-0.462 *
GSR	33	36.92	-0.106 *
PEP-2	27	30.28	-0.108 NS
EST	24	37.77	-0.365 *

PTO. AYSÉN

PGM	34	46.38	-0.267 *
GPI	31	57.72	-0.462 *
ICD	26	52.78	-0.463 *
GSR	43	60.60	-0.290 *
PEP-2	33	52.83	-0.375 *
EST	26	47.51	-0.453 *

HUEIHUE

PGM	24	43.31	-0.446 *
GPI	34	39.76	-0.144 *
ICD	23	42.12	-0.453 *
GSR	42	55.96	-0.249 *
PEP-2	40	57.22	-0.300 *
EST	34	50.82	-0.331 *

**Tabla 6.** Coeficiente de deficiencia ó exceso de heterocigotos por locus (d) en 12 poblaciones naturales y una muestra de juveniles producidos en hatchery de *Loxechinus albus*. Significación estadística utilizando Chi<sup>2</sup> (\* = p< 0.05, NS= no significativo). **Continuación**

PTA ARENAS

Locus	Heterocigotos observados	Heterocigotos esperados	d
PGM	23	47.58	-0.517 *
GPI	48	61.05	-0.213 *
ICD	25	49.53	-0.495 *
GSR	49	66.68	-0.265 *
PEP-2	29	47.03	-0.383 *
EST	34	50.80	-0.331 *

VALDIVIA

PGM	46	52.57	-0.125 *
GPI	17	42.31	-0.598 *
ICD	29	47.76	-0.393 *
GSR	30	50.22	-0.403 *
PEP-2	46	43.44	0.059 NS
EST	24	35.40	-0.322 *

CALBUCO

PGM	54	59.61	-0.094 *
GPI	42	49.09	-0.144 NS
ICD	20	34.67	-0.423 *
GSR	47	56.99	-0.175 *
PEP-2	38	54.88	-0.308 *
EST	24	51.31	-0.532 *

HATCHERY

PGM	44	44.15	-0.003 NS
GPI	35	37.75	-0.072 NS
ICD	33	46.54	-0.291 *
GSR	31	33.15	-0.065 *
PEP-2	28	29.53	-0.052 NS
EST	14	44.85	-0.687 *

ISLA GUAFO

PGM	21	75.74	-0.723 *
GPI	31	69.77	-0.557 *
ICD	24	53.83	-0.554 *
GSR	33	53.81	-0.387 *
PEP-2	27	61.49	-0.561 *
EST	35	53.24	-0.343 *

**Tabla 6.** Coeficiente de deficiencia ó exceso de heterocigotos por locus (d) en 12 poblaciones naturales y una muestra de juveniles producidos en hatchery de *Loxechinus albus*. Significación estadística utilizando Chi<sup>2</sup> (\* = p< 0.05, NS= no significativo). **Continuación**

ISLA LAITEC

Locus	Heterocigotos observados	Heterocigotos esperados	d
PGM	29	58.65	-0.506 *
GPI	31	68.50	-0.547 *
ICD	25	48.13	-0.481 *
GSR	27	46.85	-0.424 *
PEP-2	19	52.08	-0.635 *
EST	31	51.47	-0.398 *

SAN PEDRO

PGM	29	60.21	-0.518 *
GPI	27	48.59	-0.444 *
ICD	24	50.05	-0.520 *
GSR	22	49.82	-0.558 *
PEP-2	23	46.33	-0.504 *
EST	23	46.04	-0.500 *

CARELMAPU

PGM	43	55.96	-0.232 *
GPI	42	57.42	-0.266 *
ICD	38	48.18	-0.211 *
GSR	38	50.69	-0.250 *
PEP-2	32	41.01	-0.219 *
EST	32	47.00	-0.319 *

**TABLA 7.** Variación genética: resumen para todos los loci. Nei (1987) Molecular Evolutionary Genetics (p. 176-187)

\*\*\*\*\*

Locus	Tamaño muestral	na*	ne*	I*
PGM	2766	5.0000	2.1583	0.9624
GPI	2826	4.0000	1.9918	0.8553
ICD	2506	4.0000	1.9976	0.8447
GSR	2640	3.0000	2.0990	0.8941
PEP	2506	3.0000	2.0293	0.7347
EST	2554	4.0000	1.9294	0.7021
Mean	2633	3.8333	2.0342	0.8322
St. Dev		0.7528	0.0822	0.0979

\* na = Número observado de alelos

\* ne = Número efectivo de alelos [Kimura and Crow (1964)]

\* I = Índice de Shannon [Lewontin (1972)]

**TABLA 8.** Resumen de las estadísticas de heterocigosidad para todos los loci en las 13 poblaciones analizadas.

\*\*\*\*\*

Locus	Muestra	Hom. Obs	Het. Obs	Hom Esp.*	Het Esp*	Nei**	Het Prom
PGM	2766	0.6370	0.3630	0.4631	0.5369	0.5367	0.5096
GPI	2826	0.6929	0.3071	0.5019	0.4981	0.4979	0.4685
ICD	2506	0.7350	0.2650	0.5004	0.4996	0.4994	0.4686
GSR	2640	0.6417	0.3583	0.4762	0.5238	0.5236	0.5109
PEP	2506	0.6656	0.3344	0.4926	0.5074	0.5072	0.4847
EST	2554	0.7291	0.2709	0.5181	0.4819	0.4817	0.4759
Promedio	2633	0.6835	0.3165	0.4921	0.5079	0.5078	0.4864
D. S.		0.0425	0.0425	0.0197	0.0197	0.0197	0.0194

\* Homocigosidad y heterocigosidad esperada se calculó de acuerdo a Levene (1949)

\*\* Heterosigosidad esperada Nei (1973)

El número loci polimórficos es de : 6  
 El porcentaje de loci polimórficos es de : 47.06

**Tabla 9.** Resumen para las estadísticas F y flujo génico para todos los loci. Nei (1987)  
Molecular Evolutionary Genetics (p. 159-164)

---

Locus	Sample Size	Fis	Fit	Fst	Nm*
PGM	2766	0.2775	0.3092	0.0438	5.4528
GPI	2826	0.3462	0.3823	0.0552	4.2768
ICD	2506	0.4307	0.4691	0.0675	3.4514
GSR	2640	0.2910	0.3054	0.0202	12.0985
PEP	2506	0.2927	0.3231	0.0429	5.5836
EST	2554	0.4290	0.4363	0.0129	19.1952
Mean	2633	0.3425	0.3691	0.0405	5.9277

\* Nm = Flujo génico estimado a partir de  $F_{st} = 0.25(1 - F_{st})/F_{st}$ .

TABLA 10. Matriz de similitud genética y/o coeficientes de distancia. Nei (1972) Am. Nat. 106: 283-292

Pobl. ID	Iquique	Antofagasta	Tomé	Valdivia	Calbuco	Hatchery	Pto. Aysén	Hueihue	Pla. Arenas	Isla Guafo	Isla Laitec	San Pedro	Carelmapu
Iquique	***												
Antofagasta	0.0197	***											
Tomé	0.0542	0.0166	***										
Valdivia	0.0334	0.0202	0.0161	***									
Calbuco	0.0293	0.0112	0.0352	0.0551	***								
Hatchery	0.0351	0.0113	0.0308	0.0307	0.0127	***							
Pto. Aysén	0.0206	0.0066	0.0265	0.0335	0.0097	0.0153	***						
Hueihue	0.0814	0.0332	0.0645	0.0811	0.0267	0.0175	0.0286	***					
Pta. Arenas	0.0764	0.0415	0.0547	0.0764	0.0361	0.0374	0.0252	0.0243	***				
Isla Guafo	0.0768	0.0734	0.1100	0.1074	0.0620	0.0612	0.0746	0.0720	0.0527	***			
Isla Laitec	0.0660	0.0400	0.0544	0.0753	0.0338	0.0392	0.0314	0.0396	0.0171	0.0289	***		
San Pedro	0.0757	0.0531	0.0901	0.0876	0.0410	0.0218	0.0434	0.0174	0.0383	0.0377	0.0400	***	
Carelmapu	0.0500	0.0242	0.0470	0.0608	0.0120	0.0086	0.0136	0.0112	0.0192	0.0485	0.0236	0.0120	***

Coefficientes de similitud Nei (sobre la diagonal) y distancia genética (bajo la diagonal)

**TABLA 11.** Variación genética: resumen para todos los loci RAPDs.

Nei (1987) Molecular evolutionary Genetics (p. 176-187)

\*\*\*\*\*

Locus	Tamaño muestral	na*	ne*	h*	I*
ERI15-1	294	2.0000	1.0442	0.0423	0.1044
ERI15-2	294	2.0000	1.0406	0.0391	0.0977
ERI15-3	294	2.0000	1.5422	0.3516	0.5364
ERI15-4	294	2.0000	1.5302	0.3465	0.5306
ERI15-5	294	2.0000	1.0139	0.0137	0.0413
ERI15-6	294	2.0000	1.0249	0.0243	0.0663
ERI15-7	294	2.0000	1.0514	0.0489	0.1172
ERI15-8	294	2.0000	1.0761	0.0707	0.1574
ERI15-9	294	2.0000	1.3127	0.2382	0.4017
ERI15-10	294	2.0000	1.1290	0.1143	0.2293
ERI10-1	341	2.0000	1.2923	0.2262	0.3863
ERI10-2	341	2.0000	1.0030	0.0030	0.0111
ERI10-3	341	2.0000	1.0030	0.0030	0.0111
ERI10-4	341	2.0000	1.0259	0.0252	0.0684
ERI10-5	341	2.0000	1.9842	0.4960	0.6892
ERI10-6	341	2.0000	1.0059	0.0059	0.0202
ERI10-7	341	2.0000	1.0564	0.0534	0.1257
ERI10-8	341	2.0000	1.0153	0.0150	0.0446
ERI10-9	341	2.0000	1.0243	0.0237	0.0650
ERI10-10	341	2.0000	1.2547	0.2030	0.3561
ERI10-11	341	2.0000	1.3728	0.2715	0.4430
ERI10-12	341	2.0000	1.0150	0.0148	0.0438
ERI10-13	341	2.0000	1.0090	0.0089	0.0288
ERI10-14	341	2.0000	1.0059	0.0059	0.0202
ERI3-1	266	2.0000	1.1781	0.1511	0.2845
ERI3-2	266	2.0000	1.7621	0.4325	0.6240
ERI3-3	266	2.0000	1.9923	0.4981	0.6912
ERI3-4	266	2.0000	1.9956	0.4989	0.6920
ERI3-5	266	2.0000	1.9113	0.4768	0.6698
ERI3-6	266	2.0000	1.6683	0.4006	0.5902
ERI3-7	266	2.0000	1.6437	0.3916	0.5805
ERI3-8	266	2.0000	1.0713	0.0665	0.1499
ERI3-9	266	2.0000	1.5777	0.3662	0.5526
ERI3-10	266	2.0000	1.7997	0.4443	0.6364
ERI3-11	266	2.0000	1.3985	0.2850	0.4592
ERI3-12	266	2.0000	1.0038	0.0038	0.0138
Mean	303	2.0000	1.3010	0.1850	0.2928
St. Dev		0.0000	0.3431	0.1832	0.2533

\*\*\*\*\*

\* na = Número observado de alelos  
 \* ne = Número efectivo de alelos [Kimura and Crow (1964)]  
 \* h = Diversidad genética [Nei's (1973)]  
 \* I = Índice de Shannon [Lewontin (1972)]

**TABLA 12.** Análisis de diversidad génica en las 13 poblaciones .

Nei (1987) Molecular Evolutionary Genetics (p. 187-192)

Locus	Sample Size	Ht	Hs	Gst	Nm*
ERI15-1	294	0.0470	0.0349	0.2574	1.4424
ERI15-2	294	0.0440	0.0319	0.2766	1.3077
ERI15-3	294	0.3529	0.2822	0.2002	1.9972
ERI15-4	294	0.3481	0.2860	0.1784	2.3025
ERI15-5	294	0.0123	0.0120	0.0252	19.3469
ERI15-6	294	0.0246	0.0234	0.0499	9.5293
ERI15-7	294	0.0519	0.0477	0.0816	5.6237
ERI15-8	294	0.0796	0.0600	0.2466	1.5278
ERI15-9	294	0.2539	0.0593	0.7665	0.1523
ERI15-10	294	0.1281	0.0145	0.8866	0.0639
ERI10-1	341	0.2383	0.1826	0.2339	1.6377
ERI10-2	341	0.0029	0.0028	0.0173	28.4349
ERI10-3	341	0.0037	0.0036	0.0223	21.9342
ERI10-4	341	0.0306	0.0259	0.1551	2.7232
ERI10-5	341	0.4859	0.1099	0.7738	0.1462
ERI10-6	341	0.0061	0.0060	0.0168	29.2216
ERI10-7	341	0.0639	0.0518	0.1889	2.1466
ERI10-8	341	0.0147	0.0139	0.0585	8.0536
ERI10-9	341	0.0242	0.0234	0.0320	15.1480
ERI10-10	341	0.2103	0.1695	0.1942	2.0741
ERI10-11	341	0.2350	0.1025	0.5637	0.3869
ERI10-12	341	0.0145	0.0143	0.0199	24.6402
ERI10-13	341	0.0113	0.0109	0.0353	13.6700
ERI10-14	341	0.0069	0.0067	0.0194	25.2940
ERI3-1	266	0.1503	0.1191	0.2081	1.9033
ERI3-2	266	0.4261	0.1111	0.7394	0.1763
ERI3-3	266	0.4985	0.1409	0.7174	0.1970
ERI3-4	266	0.4983	0.1699	0.6589	0.2588
ERI3-5	266	0.4790	0.2127	0.5560	0.3993
ERI3-6	266	0.4034	0.1370	0.6603	0.2572
ERI3-7	266	0.3847	0.1195	0.6894	0.2252
ERI3-8	266	0.0649	0.0525	0.1911	2.1170
ERI3-9	266	0.3667	0.2365	0.3552	0.9078
ERI3-10	266	0.4447	0.3148	0.2921	1.2116
ERI3-11	266	0.2862	0.1437	0.4979	0.5041
ERI3-12	266	0.0039	0.0038	0.0234	20.8507
Mean	303	0.1860	0.0927	0.5018	0.4965
St. Dev		0.0329	0.0082		

\* Nm = Flujo génico estimado partir de Gst, Nm = 0.5(1 - Gst)/Gst

**TABLA 13** Matriz de similitud genética y/o coeficientes de distancia. Nei (1972) Am.Nat.106:283-292

Pobl. ID	Iquique	Antofagasta	Tomé	Valdivia	Calbuco	Hueihue	Isla Guafo	Isla Laitec	San Pedro	Pto. Aysén	Pta. Arenas	Hatchery	Caremapu
Iquique	***	0.7966	0.9577	0.9090	0.8378	0.9694	0.9367	0.9382	0.9599	0.8805	0.9282	0.9810	0.8906
Antofagasta	0.2274	***	0.8203	0.8127	0.8085	0.7890	0.8097	0.8015	0.7772	0.7524	0.8577	0.8058	0.8606
Tomé	0.0432	0.1981	***	0.9015	0.8422	0.9630	0.9415	0.9015	0.9256	0.9133	0.9256	0.9777	0.8916
Valdivia	0.0954	0.2074	0.1037	***	0.8744	0.8726	0.9246	0.9041	0.9258	0.8795	0.9535	0.8882	0.9424
Calbuco	0.1770	0.2126	0.1717	0.1342	***	0.8299	0.8887	0.8591	0.8793	0.8549	0.8235	0.8088	0.8576
Hueihue	0.0310	0.2369	0.0377	0.1363	0.1864	***	0.9136	0.9175	0.9284	0.9042	0.9016	0.9733	0.8684
Isla Guafo	0.0653	0.2111	0.0603	0.0784	0.1179	0.0904	***	0.9226	0.9490	0.8935	0.9135	0.9314	0.8698
Isla Laitec	0.0638	0.2212	0.1037	0.1008	0.1519	0.0861	0.0806	***	0.9769	0.8408	0.8650	0.9127	0.8368
San Pedro	0.0409	0.2520	0.0774	0.0771	0.1286	0.0743	0.0523	0.0233	***	0.8646	0.8878	0.9352	0.8572
Pto. Aysén	0.1273	0.2845	0.0907	0.1284	0.1568	0.1007	0.1126	0.1734	0.1454	***	0.9030	0.8894	0.8883
Pta. Arenas	0.0745	0.1536	0.0773	0.0476	0.1942	0.1036	0.0905	0.1451	0.1190	0.1020	***	0.9379	0.9586
Hatchery	0.0192	0.2159	0.0226	0.1186	0.2122	0.0271	0.0711	0.0914	0.0670	0.1172	0.0641	***	0.8826
Caremapu	0.1159	0.1501	0.1147	0.0593	0.1536	0.1411	0.1395	0.1782	0.1541	0.1185	0.0423	0.1249	***

Coefficientes de similitud Nei (sobre la diagonal) y distancia genética (bajo la diagonal)

**TABLA 14:** Frecuencias alélicas para los seis loci polimórficos resueltos en las 12 muestras provenientes de 12 localidades en *Concholepas concholepas*

Locus	Valdivia	Mauñín	Castro	Quellón	Corcovado Huafo	Pto Aysén	Mejillones	Coquimbo	Los Vilos	San		Pto. Natales
										Antonio	Natales	
<b>EST</b>												
A	0,501	0,602	0,669	0,559	0,606	0,585	0,500	0,608	0,454	0,515	0,540	
B	0,494	0,397	0,331	0,441	0,394	0,415	0,500	0,392	0,546	0,485	0,460	
<b>GPI</b>												
A	0,761	0,057	0,064	0,106	0,070	0,075	0,099	0,046	0,056	0,085	0,097	
B	0,679	0,728	0,792	0,706	0,650	0,774	0,753	0,815	0,736	0,705	0,660	
C	0,244	0,214	0,144	0,188	0,280	0,151	0,148	0,139	0,208	0,210	0,243	
<b>ICD</b>												
A	0,083	0,100	0,132	0,088	0,085	0,044	0,200	0,148	0,134	0,103	0,040	
B	0,799	0,788	0,735	0,753	0,717	0,777	0,815	0,829	0,312	0,629	0,523	
C	0,117	0,111	0,132	0,159	0,198	0,179	0,065	0,023	0,554	0,268	0,438	
<b>GSR</b>												
A	0,094	0,101	0,245	0,059	0,091	0,110	0,141	0,051	0,051	0,108	0,099	
B	0,751	0,691	0,591	0,706	0,682	0,726	0,728	0,628	0,628	0,659	0,680	
C	0,155	0,207	0,155	0,235	0,227	0,164	0,131	0,289	0,234	0,221	0,221	
<b>LAP</b>												
A	0,405	0,492	0,513	0,478	0,482	0,313	0,483	0,392	0,466	0,500	0,296	
B	0,594	0,507	0,487	0,522	0,518	0,688	0,506	0,608	0,534	0,500	0,704	
C							0,012					
<b>PEP</b>												
A	0,083	0,023	0,151	0,080	0,156	0,089	0,057	0,038	0,121	0,015	0,1402	
B	0,776	0,717	0,176	0,691	0,630	0,761	0,727	0,802	0,667	0,718	0,744	
C	0,141	0,258	0,124	0,228	0,214	0,150	0,217	0,160	0,212	0,1287	0,116	
D												
prom alelos/locus	2,660	2,660	2,660	2,660	2,660	2,667	2,833	2,600	2,830	2,666	2,660	
prom heterocigosidad	0,389	0,428	0,428	0,426	0,402	0,444	0,384	0,347	0,495	0,461	0,469	

**TABLA 15.** Frecuencia alélica para las 12 poblaciones de *Concholepas concholepas*

Alelo\ Locus	EST	GPI	ICD	GSR	LAP	PEP
Alelo A	0.5491	0.0729	0.0953	0.1094	0.4353	0.0980
Alelo B	0.4509	0.7211	0.7084	0.6937	0.5636	0.7303
Alelo C	0.2060	0.1963	0.1943	0.0011	0.1717	
Alelo D			0.0026			

**TABLA 16.** Resumen de las estadísticas de heterocigosidad para todos los loci en las 12 poblaciones analizadas.

\*\*\*\*\*

Locus	Sample Size	Obs_Hom	Obs_Het	Exp_Hom*	Exp_Het*	Nei**	Ave_Het
AA	2116	0.5539	0.4461	0.5046	0.4954	0.4952	0.4871
..	2180	0.5257	0.4743	0.5675	0.4325	0.4323	0.4227
BC	2318	0.6040	0.3960	0.5492	0.4508	0.4506	0.4100
BB	1920	0.5333	0.4667	0.5308	0.4692	0.4690	0.4283
AB	1854	0.6731	0.3269	0.5069	0.4931	0.4928	0.4840
BC	2184	0.5870	0.4130	0.5722	0.4278	0.4276	0.4233
Mean	2095	0.5795	0.4205	0.5385	0.4615	0.4612	0.4426
St. Dev		0.0550	0.0550	0.0293	0.0293	0.0293	0.0339

\* Homocigosidad y heterocigosidad esperada se calculó de acuerdo a Levene (1949)

\*\* Heterocigosidad esperada Nei (1973)

El número loci polimórficos es de : 6  
 El porcentaje de loci polimórficos es de: 47.06

**Tabla 17.** Resumen para las estadísticas F y flujo génico para todos los loci. Nei (1987) Molecular Evolutionary Genetics (p. 159-164)

---

Locus	Sample Size	Fis	Fit	Fst	Nm*
AA	2116	0.0843	0.0983	0.0153	16.1320
..	2180	-0.1193	-0.1062	0.0118	21.0250
BC	2318	0.0298	0.1232	0.0963	2.3465
BB	1920	-0.0012	0.2320	0.2330	0.8231
AB	1854	0.3146	0.3282	0.0198	12.3656
BC	2184	0.0198	0.0346	0.0150	16.4004
Mean	2095	0.0627	0.1242	0.0656	3.5626

\* Nm = Flujo génico estimado a partir de  $F_{st} = 0.25(1 - F_{st})/F_{st}$ .

**Tabla 18.** Matriz de similitud genética y/o coeficientes de distancia

pop ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	****	0.9904	0.9757	0.9930	0.9877	0.9922	0.9978	0.9933	0.8994	0.9240	0.9868	0.9671
2	0.0096	****	0.9859	0.9972	0.9929	0.9856	0.9884	0.9937	0.9089	0.9230	0.9850	0.9532
3	0.0246	0.0142	****	0.9823	0.9827	0.9783	0.9769	0.9820	0.9197	0.9159	0.9812	0.9475
4	0.0071	0.0028	0.0179	****	0.9954	0.9882	0.9909	0.9936	0.8993	0.9382	0.9918	0.9648
5	0.0124	0.0071	0.0174	0.0046	****	0.9828	0.9868	0.9839	0.8898	0.9402	0.9912	0.9680
6	0.0079	0.0145	0.0219	0.0118	0.0174	****	0.9878	0.9847	0.9076	0.9271	0.9814	0.9764
7	0.0022	0.0117	0.0234	0.0091	0.0133	0.0122	****	0.9924	0.8965	0.9322	0.9902	0.9673
8	0.0067	0.0063	0.0182	0.0065	0.0162	0.0154	0.0076	****	0.9048	0.9154	0.9833	0.9468
9	0.1060	0.0955	0.0837	0.1061	0.1167	0.0969	0.1093	0.1001	****	0.8156	0.8897	0.8599
10	0.0790	0.0801	0.0879	0.0638	0.0617	0.0757	0.0702	0.0884	0.2039	****	0.9650	0.9721
11	0.0133	0.0151	0.0190	0.0082	0.0088	0.0188	0.0099	0.0168	0.1168	0.0356	****	0.9788
12	0.0334	0.0479	0.0539	0.0358	0.0325	0.0239	0.0333	0.0547	0.1509	0.0283	0.0215	****

1. Valdivia 2. Maullín 3. Castro 4. Quellón 5. Corcovado 6. Isla Guafo 7. Pto. Aysén 8. Mejillones 9. Coquimbo 10. Los Vilos 11. San Antonio 12. Pto. Natales

**TABLA 19.** Variación genética: resumen para todos los loci RAPDs. Nei (1987)

Molecular evolutionary Genetics (p. 176-187)

\*\*\*\*\*

Locus	Sample Size	na*	ne*	h*	I*
LOCO10-1	360	2.0000	1.3094	0.2363	0.3993
LOCO10-2	360	2.0000	1.0318	0.0308	0.0806
LOCO10-3	360	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
LOCO10-4	360	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
LOCO10-5	360	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
LOCO10-6	360	2.0000	1.1788	0.1516	0.2852
LOCO10-7	360	2.0000	1.0704	0.0658	0.1486
LOCO10-8	360	2.0000	1.0704	0.0658	0.1486
LOCO15-1	356	2.0000	1.7756	0.4368	0.6286
LOCO15-2	356	2.0000	1.7529	0.4295	0.6209
LOCO15-3	356	2.0000	1.8286	0.4531	0.6455
LOCO15-4	356	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
LOCO15-5	356	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
LOCO15-6	356	2.0000	1.5544	0.3567	0.5420
LOCO15-7	356	2.0000	1.1680	0.1439	0.2739
LOCO15-8	356	2.0000	1.3427	0.2552	0.4230
LOCO19-1	360	2.0000	1.7688	0.4346	0.6263
LOCO19-2	360	2.0000	1.7240	0.4199	0.6108
LOCO19-3	360	2.0000	1.9233	0.4801	0.6731
LOCO19-4	360	2.0000	1.9024	0.4743	0.6673
LOCO19-5	360	2.0000	1.0445	0.0426	0.1050
LOCO19-6	360	2.0000	1.9869	0.4967	0.6898
LOCO19-7	360	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
LOCO19-8	360	2.0000	1.6835	0.4060	0.5960
LOCO41-1	358	2.0000	1.9663	0.4914	0.6846
LOCO41-2	358	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
LOCO41-3	358	2.0000	1.0299	0.0290	0.0767
LOCO41-4	358	2.0000	1.3134	0.2386	0.4022
LOCO41-5	358	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
LOCO41-6	358	2.0000	1.0085	0.0085	0.0275
LOCO41-7	358	2.0000	1.1959	0.1638	0.3025
LOCO41-8	358	1.0000	1.0000	0.0000	0.0000
LOCO41-9	358	2.0000	1.1314	0.1162	0.2322
Mean	358	1.7273	1.3261	0.1948	0.2997
St. Dev		0.4523	0.3645	0.1940	0.2716

a = Número observado de alelos  
 \* ne = Número efectivo de alelos [Kimura and Crow (1964)]  
 \* h = Diversidad genética [Nei's (1973)]  
 \* I = Índice de Shannon [Lewontin (1972)]

**TABLA 20:** Análisis de diversidad génica en las 12 poblaciones. Nei (1987) Molecular Evolutionary Genetics (p. 187-192)

Locus	Sample Size	Ht	Hs	Gst	Nm*
LOCO10-1	360	0.2363	0.2262	0.0428	11.1918
LOCO10-2	360	0.0308	0.0298	0.0334	14.4775
LOCO10-3	360	0.0000	0.0000	****	****
LOCO10-4	360	0.0000	0.0000	****	****
LOCO10-5	360	0.0000	0.0000	****	****
LOCO10-6	360	0.1516	0.1347	0.1119	3.9698
LOCO10-7	360	0.0658	0.0596	0.0936	4.8399
LOCO10-8	360	0.0658	0.0596	0.0936	4.8399
LOCO15-1	356	0.4343	0.4096	0.0568	8.3063
LOCO15-2	356	0.4269	0.4009	0.0608	7.7216
LOCO15-3	356	0.4507	0.3528	0.2173	1.8011
LOCO15-4	356	0.0000	0.0000	****	****
LOCO15-5	356	0.0000	0.0000	****	****
LOCO15-6	356	0.3586	0.3092	0.1378	3.1291
LOCO15-7	356	0.1514	0.1179	0.2212	1.7604
LOCO15-8	356	0.2683	0.1252	0.5333	0.4375
LOCO19-1	360	0.4346	0.3116	0.2832	1.2656
LOCO19-2	360	0.4199	0.2835	0.3249	1.0388
LOCO19-3	360	0.4801	0.3886	0.1904	2.1255
LOCO19-4	360	0.4743	0.3401	0.2830	1.2671
LOCO19-5	360	0.0426	0.0397	0.0682	6.8282
LOCO19-6	360	0.4967	0.3299	0.3359	0.9887
LOCO19-7	360	0.0000	0.0000	****	****
LOCO19-8	360	0.4060	0.3447	0.1510	2.8120
LOCO41-1	358	0.4915	0.4393	0.1062	4.2099
LOCO41-2	358	0.0000	0.0000	****	****
LOCO41-3	358	0.0292	0.0265	0.0896	5.0800
LOCO41-4	358	0.2395	0.1490	0.3777	0.8239
LOCO41-5	358	0.0000	0.0000	****	****
LOCO41-6	358	0.0085	0.0083	0.0241	20.2151
LOCO41-7	358	0.1636	0.1551	0.0521	9.1035
LOCO41-8	358	0.0000	0.0000	****	****
LOCO41-9	358	0.1174	0.0782	0.3343	0.9956
Mean	358	0.1953	0.1552	0.2055	1.9331
St. Dev		0.0376	0.0244		

\* Nm = Flujo génico estimado partir de Gst, Nm = 0.5(1 - Gst)/Gst

**TABLA 21.** Matriz de similitud genética y/o coeficientes de distancia. Nei (1972) Am.Nat.106:283-292

pop ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	****	0.8535	0.9299	0.9156	0.8681	0.8650	0.8585	0.8670	0.9131	0.9737	0.9093	0.9072
2	0.1584	****	0.9578	0.9238	0.9893	0.9879	0.9951	0.9902	0.9672	0.9000	0.9695	0.9227
3	0.0727	0.0431	****	0.9579	0.9595	0.9600	0.9546	0.9563	0.9854	0.9644	0.9873	0.9724
4	0.0882	0.0793	0.0430	****	0.9243	0.9311	0.9197	0.9263	0.9739	0.9520	0.9612	0.9556
5	0.1414	0.0107	0.0413	0.0787	****	0.9948	0.9946	0.9966	0.9698	0.9111	0.9796	0.9354
6	0.1450	0.0121	0.0408	0.0714	0.0052	****	0.9949	0.9951	0.9722	0.9072	0.9774	0.9331
7	0.1525	0.0050	0.0465	0.0837	0.0054	0.0051	****	0.9967	0.9647	0.9015	0.9708	0.9228
8	0.1428	0.0098	0.0447	0.0765	0.0034	0.0049	0.0033	****	0.9672	0.9113	0.9767	0.9351
9	0.0909	0.0334	0.0147	0.0264	0.0306	0.0282	0.0359	0.0334	****	0.9510	0.9897	0.9691
10	0.0266	0.1053	0.0363	0.0492	0.0931	0.0974	0.1037	0.0929	0.0503	****	0.9494	0.9507
11	0.0951	0.0309	0.0128	0.0396	0.0206	0.0228	0.0296	0.0236	0.0104	0.0519	****	0.9807
12	0.0973	0.0804	0.0280	0.0454	0.0668	0.0692	0.0803	0.0671	0.0314	0.0506	0.0195	****

1. Pto. Aysén 2. Isla Guafo 3. Corcovado 4. Quellón 5. Mejillones 6. Coquimbo 7. Los Vilos 8. San Antonio 9. Valdivia 10. Pto. Natales 11. Castro 12. Maullín

## Anexo **2**: Figuras

---

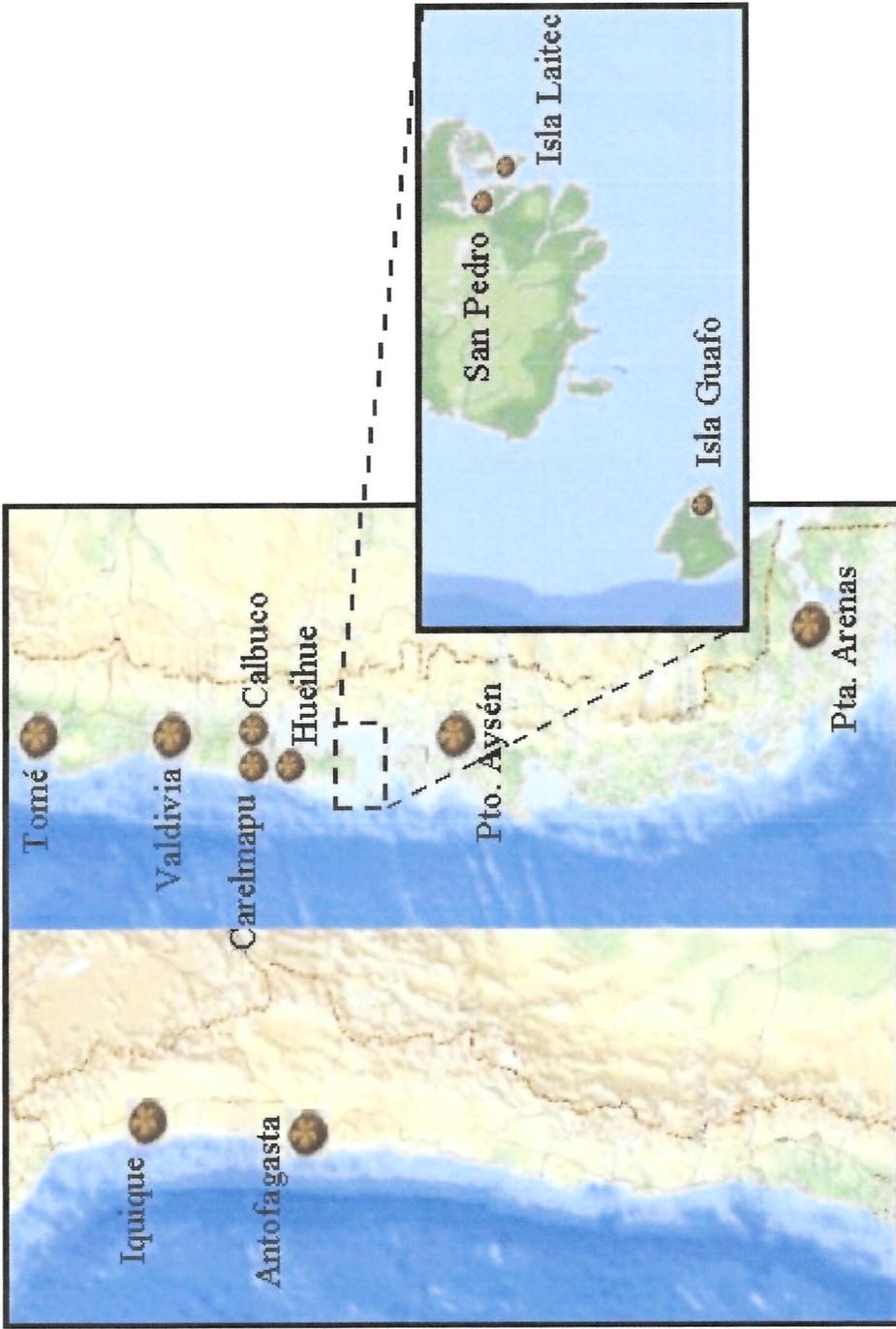
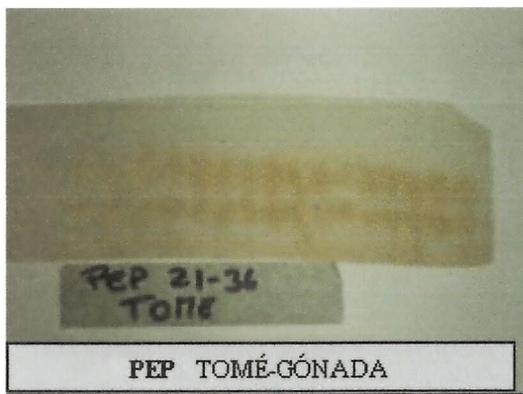
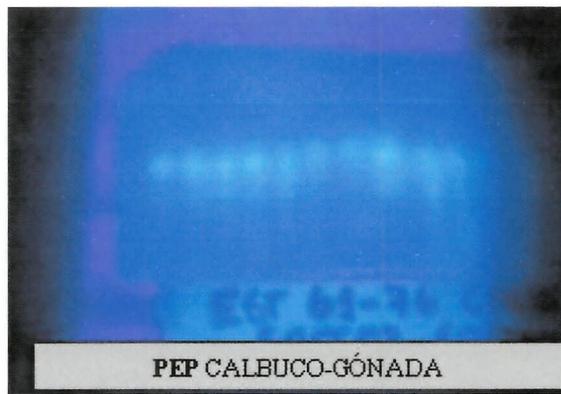


Figura 1. Lugares de obtención de muestras de la especie *Loxechinus albus* (🌐).



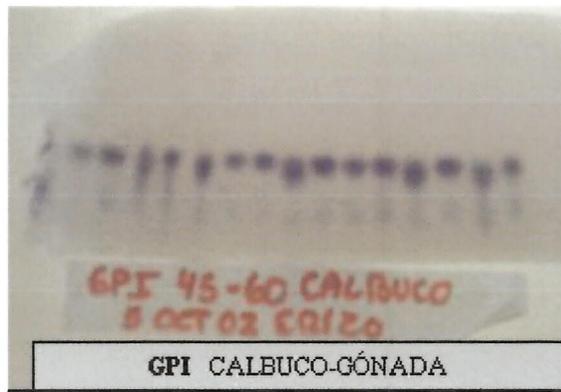
PEP TOMÉ-GÓNADA



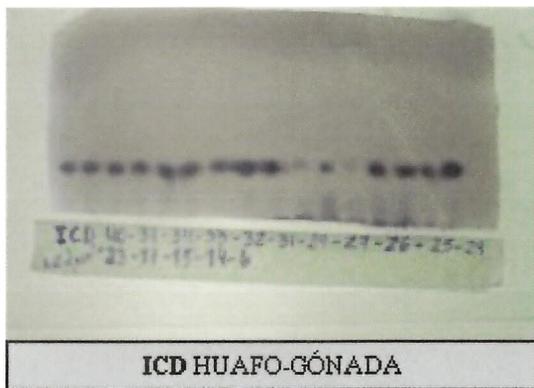
PEP CALBUCO-GÓNADA



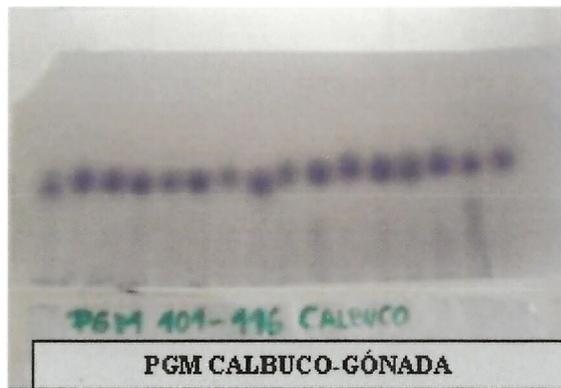
GSR ANTOFAGASTA-GÓNADA



GPI CALBUCO-GÓNADA

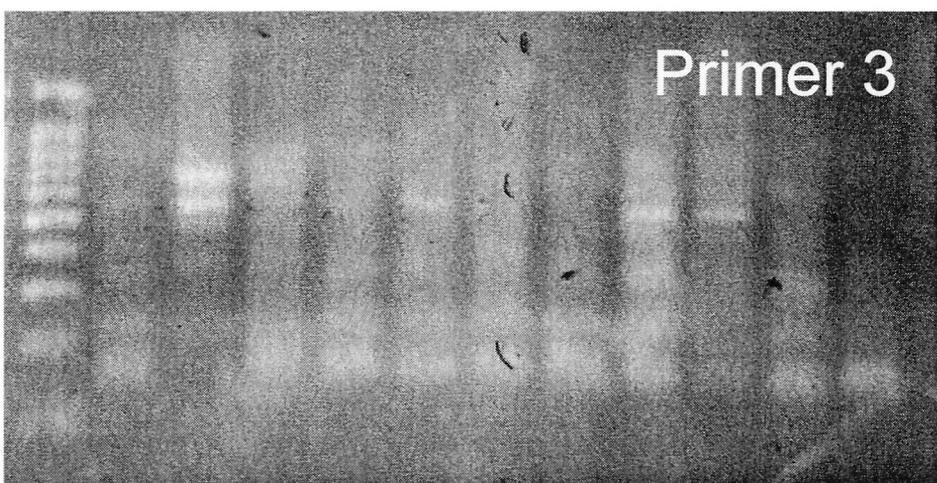
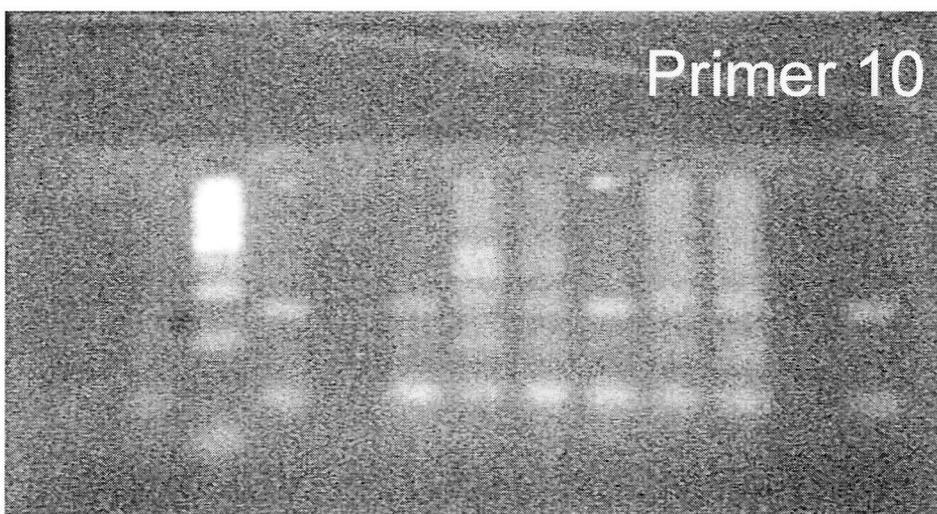
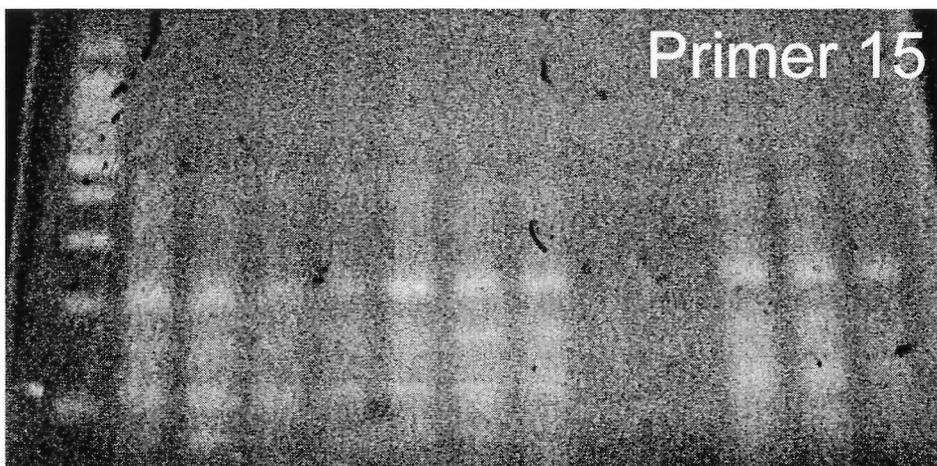


ICD HUAFO-GÓNADA



PGM CALBUCO-GÓNADA

Figura 2. Fotografías de los geles de seis sistemas enzimáticos estandarizados para *L. albus*



**Figura 3.** Fotografías de los geles con los patrones de amplificación de cada uno de los tres partidores RAPD seleccionados para el recurso *Loxechinus albus*

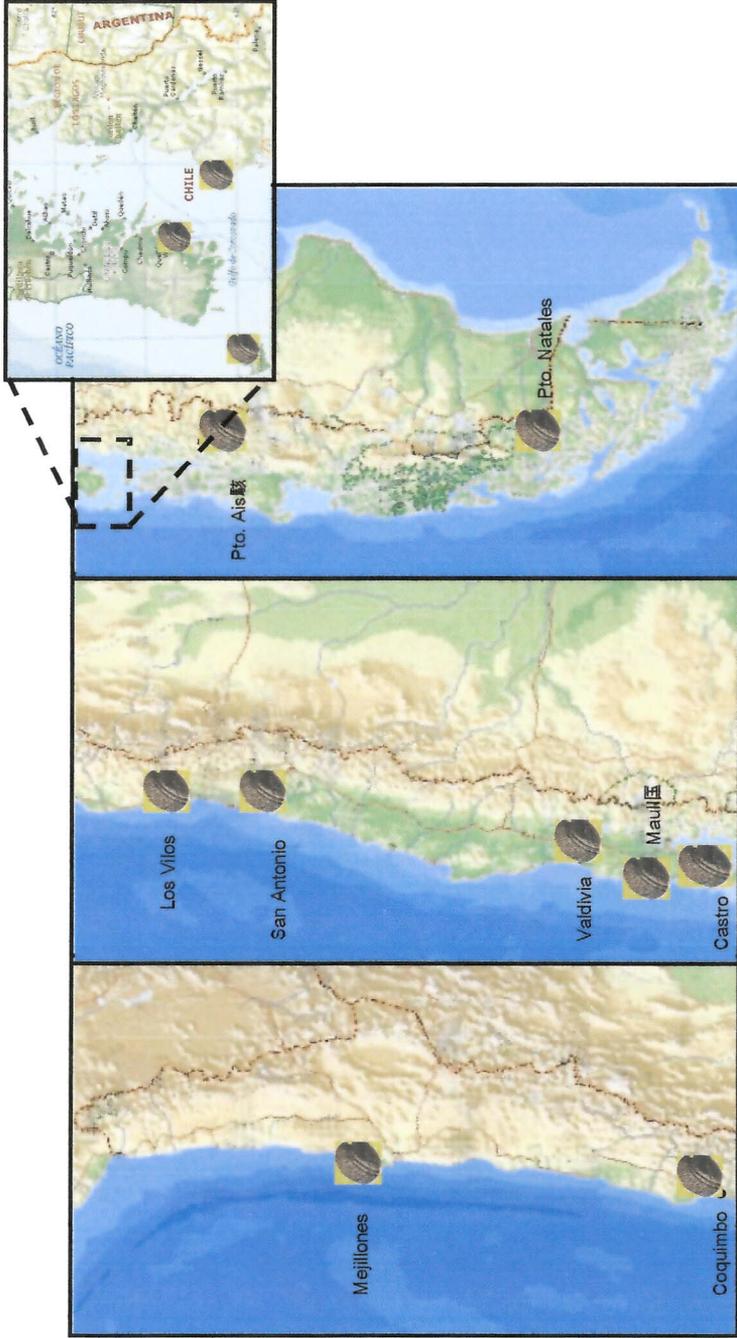
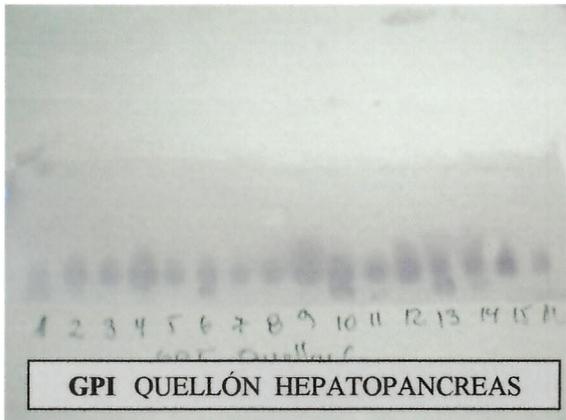
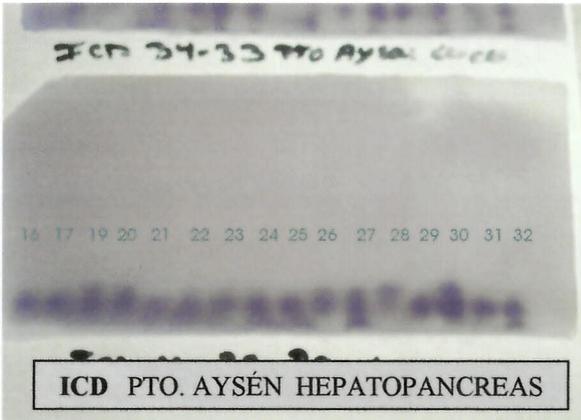


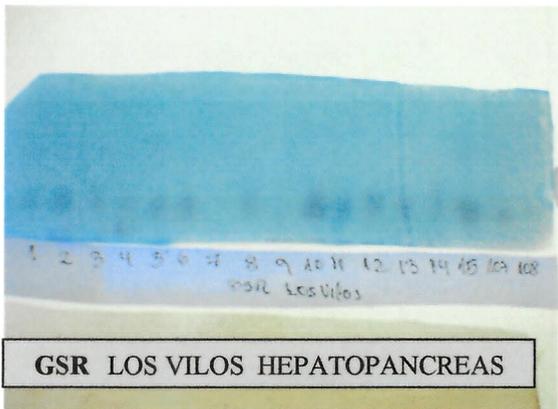
Figura 4. Lugares de obtención de muestras de la especie *Concholepas concholepas*



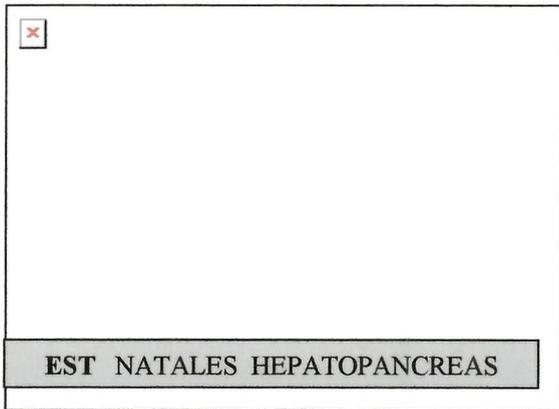
**GPI QUELLÓN HEPATOPANCREAS**



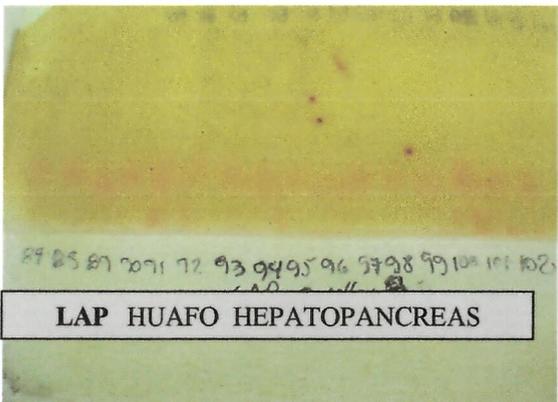
**ICD PTO. AYSÉN HEPATOPANCREAS**



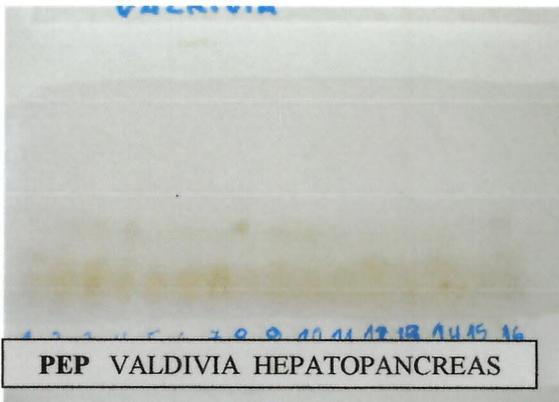
**GSR LOS VILOS HEPATOPANCREAS**



**EST NATALES HEPATOPANCREAS**

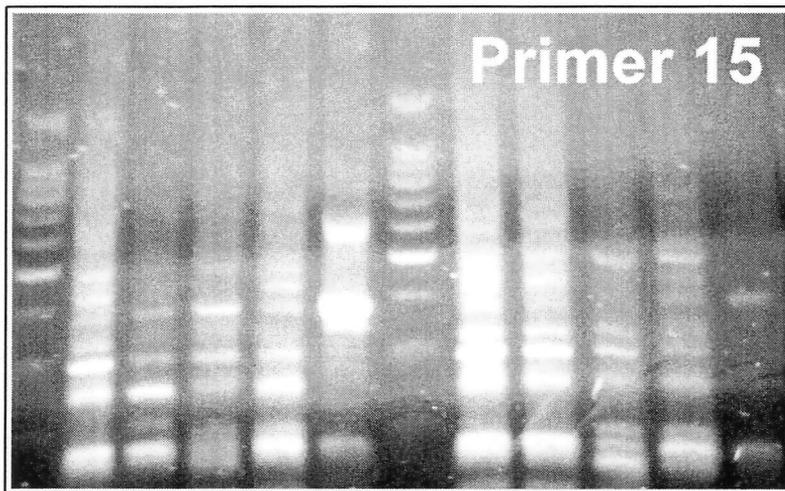
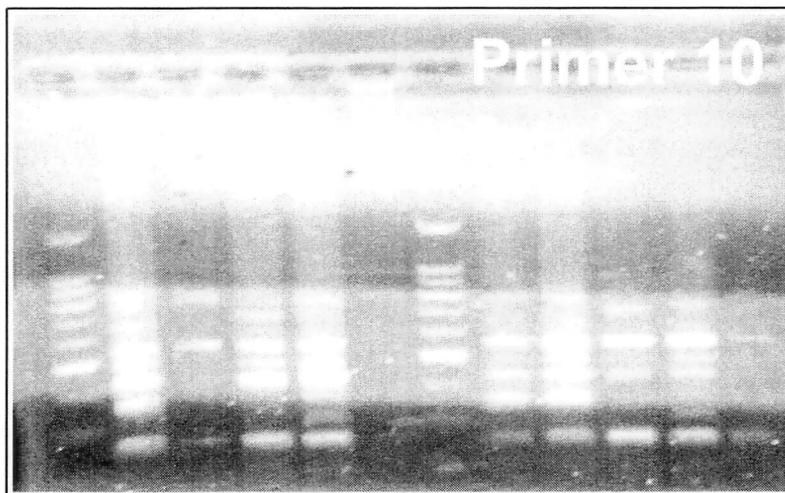


**LAP HUAFO HEPATOPANCREAS**

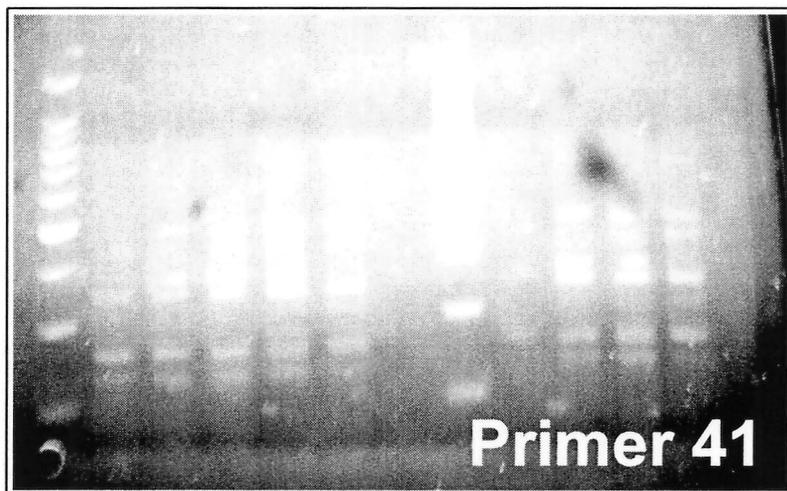
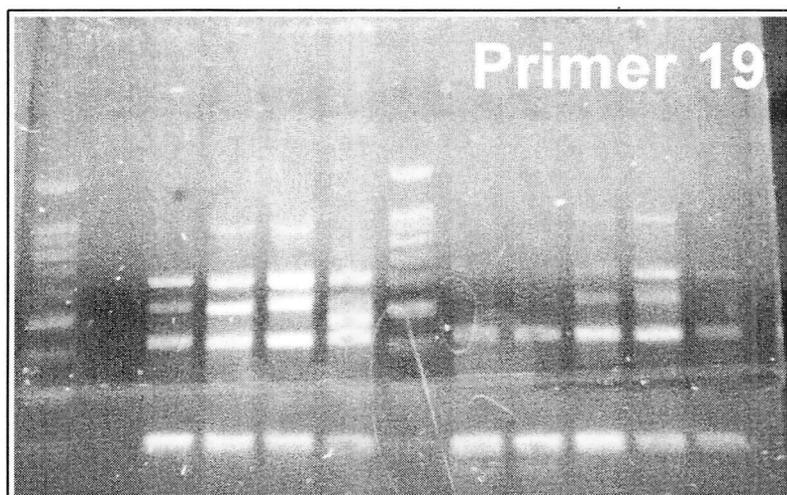


**PEP VALDIVIA HEPATOPANCREAS**

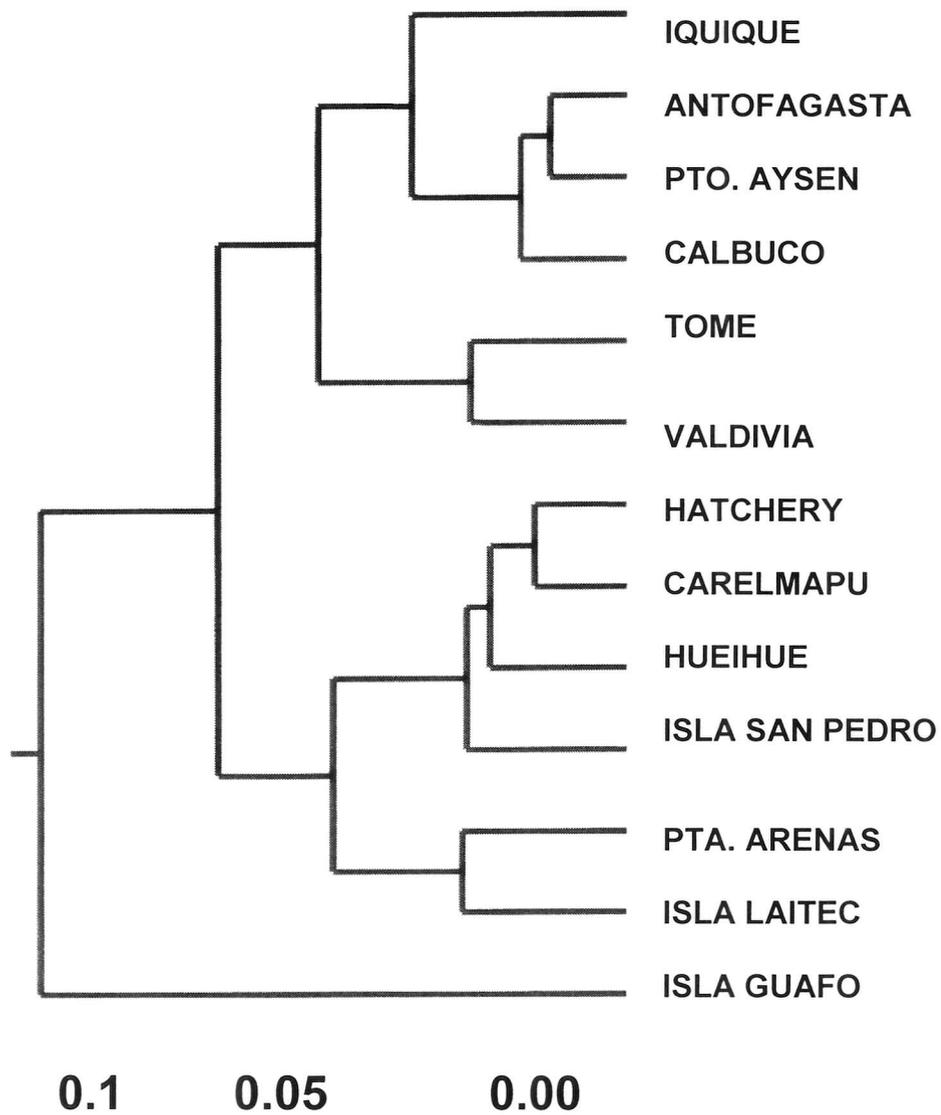
**Figura 5.** Fotografías de los gels de seis sistemas enzimáticos estandarizados para *C. concholepas*.



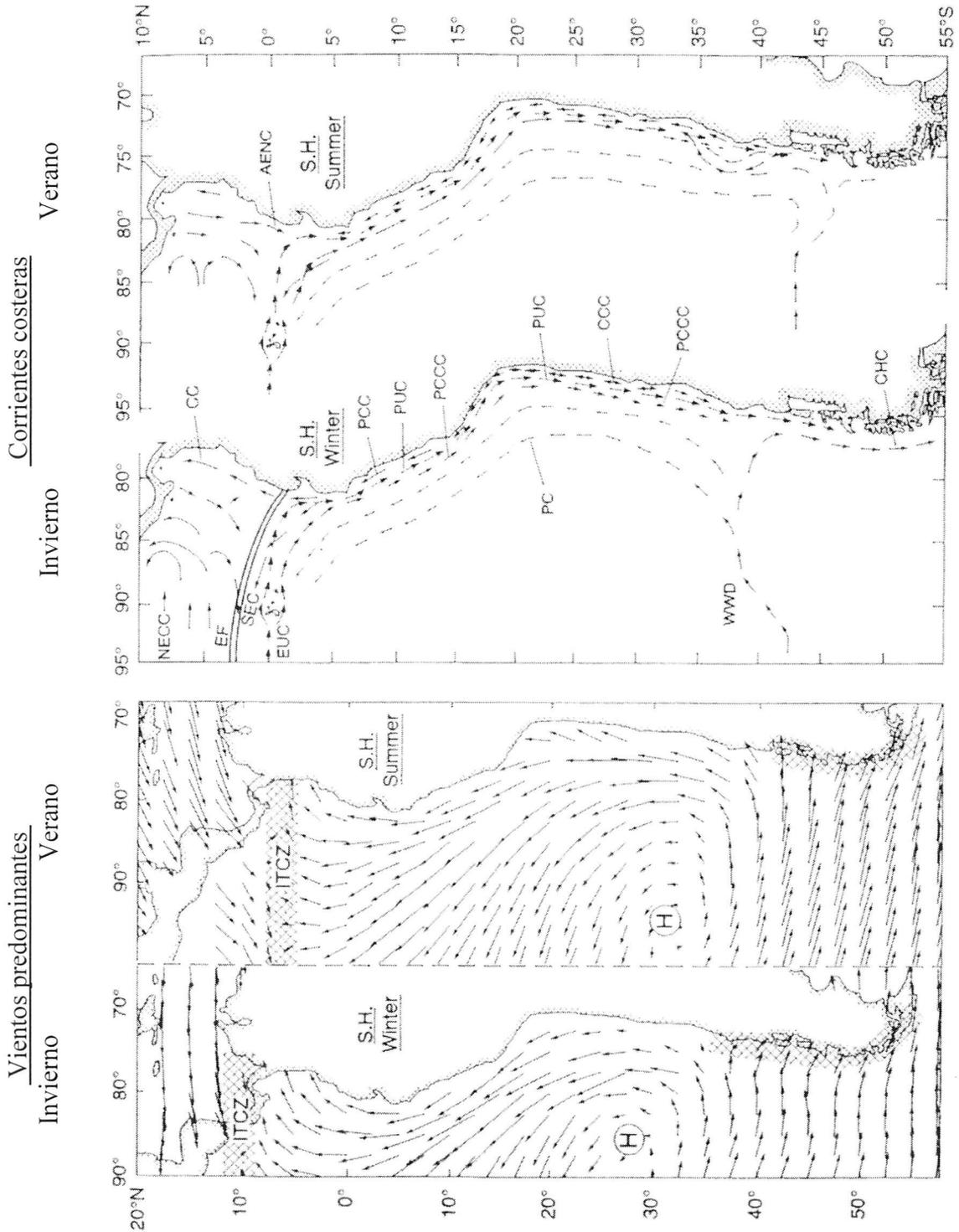
**Figura 6.** Fotografías de los geles con los patrones de amplificación de cada uno de los cuatro partidores RAPD seleccionados para el recurso *Concholepas concholepas*



**Figura 6.** Fotografías de los geles con los patrones de amplificación de cada uno de los cuatro partidores RAPD seleccionados para el recurso *Concholepas concholepas* (Continuación)



**Figura 7:** Distancia genética ( Electroforésis enzimática)



**Figura 8:** Vientos y corrientes (superficiales y subsuperficiales). Principales corrientes: West Wind Drift (WWD), Perú Current (PC), Perú-Chile Countercurrent (PCCC), Poleward undercurrent (PUC), Peru Coastal Current (PCC) Chile coastal current (CCC) y Cape Horn Current (CHC). From Strub & Mesías (1998).

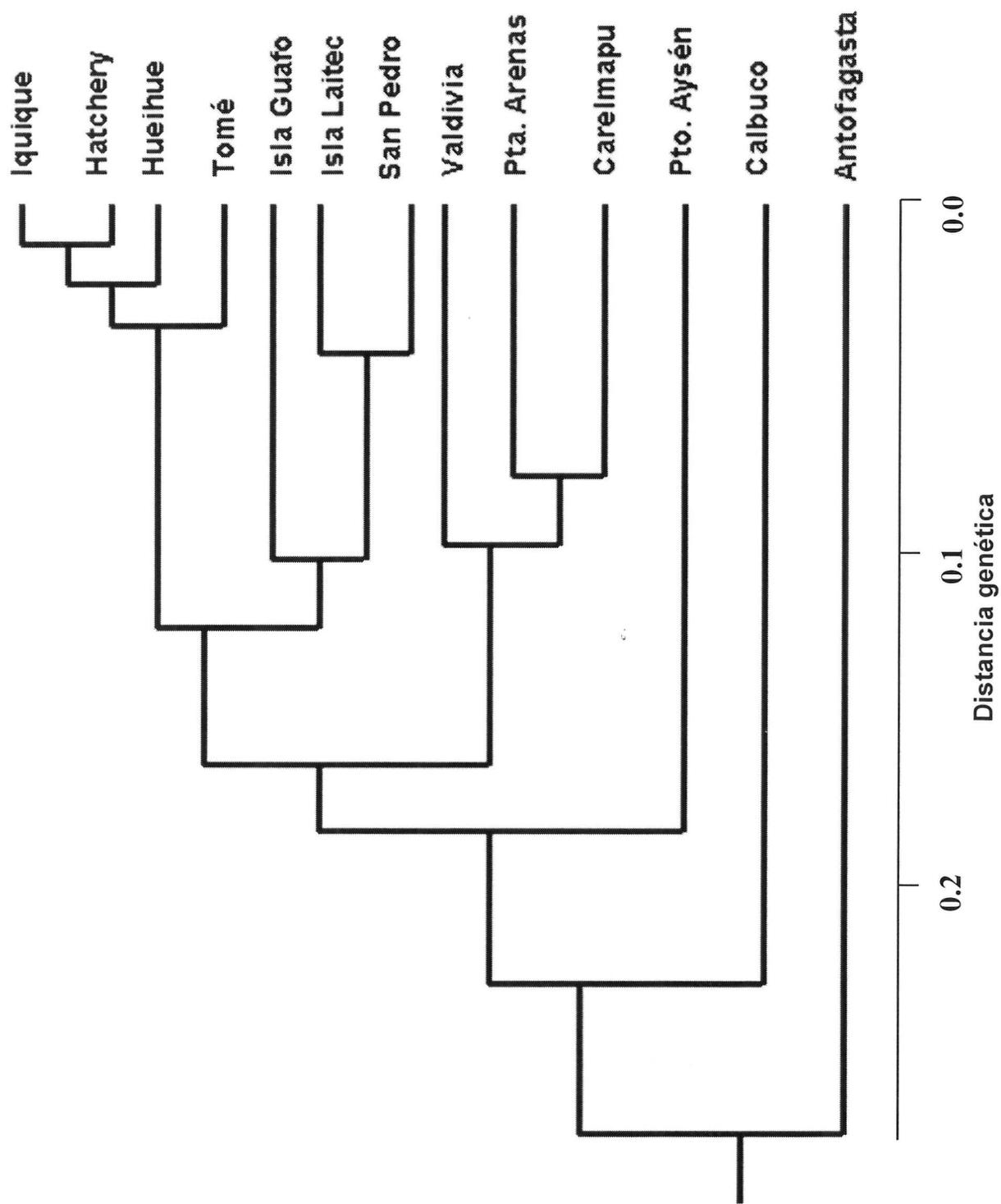
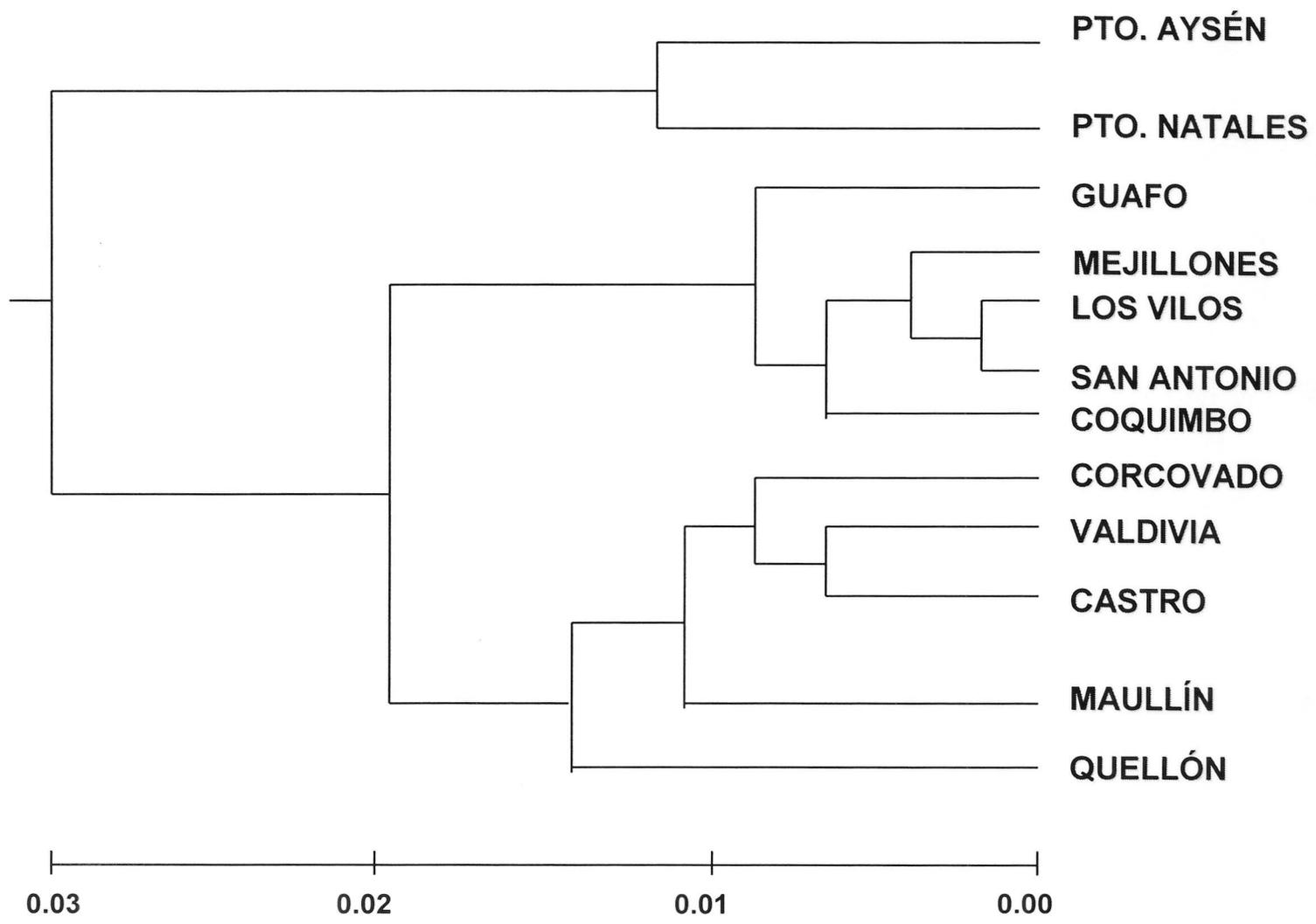


Figura 9: Distancia genética estimada utilizando Random Amplified Polimorphic DNA (RAPDs)



**Nei's I (1978)**

**Figura 10:** Distancia genética estimada utilizando Random Amplified Polimorfic DNA (RAPds)

Anexo **3**: Presentaciones y  
Panel

---

**Presentación 1:** Caracterización genético – poblacional del recurso *Concholepas concholepas*

**Presentación 2:** Estructura genética poblacional de *Loxechinus albus* (Molina 1782) a lo largo de la costa chilena, utilizando análisis de electroforesis enzimática y RAPDs.

**Presentación 3:** Estado de la caracterización de recursos genéticos acuáticos

**Panel:** Caracterización Genética poblacional para el manejo y la conservación de recursos marinos de importancia para la acuicultura y pesquería

**Presentación 1:** Caracterización genético – poblacional  
del recurso *Concholepas concholepas*

---



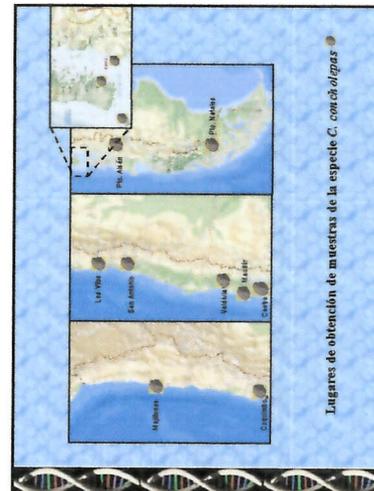
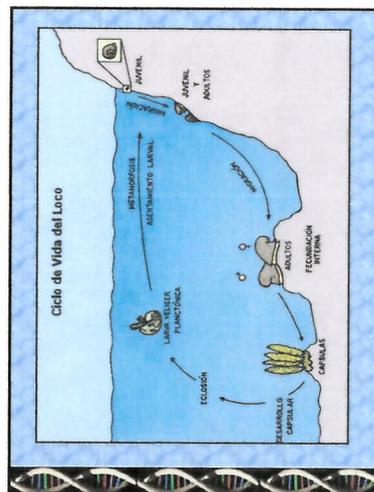
**Caracterización genético – poblacional del recurso  
Concholepas concholepas**

La regulación del uso de los recursos se ha basado en aspectos ecológicos, demográficos y de historia natural

Se ha dirigido poca atención a los aspectos genéticos de las especies recursos (identificación de "unidades de manejo", de especies en peligro, manejo de reproductores)

**Objetivo**

Caracterizar a nivel genético poblacional el recurso bentónico *Concholepas concholepas* a lo largo del litoral chileno



Muestras	II Región
Calleja Homos (Coquimbo)	23° 05' S ; 70° 27' W
Pichidangui (Los Vilos)	29° 30' S ; 71° 15' W
Quintay (San Antonio)	32° 08' S ; 71° 37' W
Niebla (Malleco)	33° 11' S ; 71° 44' W
Mallín (Cautín)	39° 50' S ; 73° 26' W
Dalcahue (Cautín)	41° 37' S ; 73° 37' W
Quilón	42° 22' S ; 73° 42' W
Huilo	43° 33' S ; 74° 50' W
Cococardo	43° 31' S ; 75° 48' W
Canal Bahía (Pto. Varas)	43° 58' S ; 73° 08' W
Puerto Varas	41° 44' S ; 72° 31' W

**Ubicación geográfica de poblaciones muestreadas**



Partidor Nº	Secuencia	Cocktail de reactivos	Programa termociclador
10	5'-GAGGACGGG3'	1	21
15	5'-GGGGCTGGG3'	1	21
19	5'-CGTCTGGG3'	1	21
41	5'-GCAAGACTGG3'	1	21

(1) Mezcla de Ransoon (25 µL)  
 ADI genómico 10 µL (50-100 ng/µL)  
 MCL 2.5 µL (25 mM)  
 dNTPs 7.5 µL (2 mM)  
 Enzimas 0.2 µL (5 unidades)  
 Agua destilada Estéril 8.05 µL

**Variación genética: resumen para todos los loci RAPDs**

Locus	Sampla nº*	nr*	N*	P
LCO0081	309	2000	1294	0.245
LCO0082	309	2000	1294	0.245
LCO0083	309	2000	1294	0.245
LCO0084	309	2000	1294	0.245
LCO0085	309	2000	1294	0.245
LCO0086	309	2000	1294	0.245
LCO0087	309	2000	1294	0.245
LCO0088	309	2000	1294	0.245
LCO0089	309	2000	1294	0.245
LCO0090	309	2000	1294	0.245
LCO0091	309	2000	1294	0.245
LCO0092	309	2000	1294	0.245
LCO0093	309	2000	1294	0.245
LCO0094	309	2000	1294	0.245
LCO0095	309	2000	1294	0.245
LCO0096	309	2000	1294	0.245
LCO0097	309	2000	1294	0.245
LCO0098	309	2000	1294	0.245
LCO0099	309	2000	1294	0.245
LCO0100	309	2000	1294	0.245

**Variación genética: resumen para todos los loci RAPDs (continuación)**

Locus	Sampla nº*	nr*	N*	P
LCO0101	309	2000	1294	0.245
LCO0102	309	2000	1294	0.245
LCO0103	309	2000	1294	0.245
LCO0104	309	2000	1294	0.245
LCO0105	309	2000	1294	0.245
LCO0106	309	2000	1294	0.245
LCO0107	309	2000	1294	0.245
LCO0108	309	2000	1294	0.245
LCO0109	309	2000	1294	0.245
LCO0110	309	2000	1294	0.245
LCO0111	309	2000	1294	0.245
LCO0112	309	2000	1294	0.245
LCO0113	309	2000	1294	0.245
LCO0114	309	2000	1294	0.245
LCO0115	309	2000	1294	0.245
LCO0116	309	2000	1294	0.245
LCO0117	309	2000	1294	0.245
LCO0118	309	2000	1294	0.245
LCO0119	309	2000	1294	0.245
LCO0120	309	2000	1294	0.245

\* nr = número de bandas de ADN  
 \* N = número de individuos de cada población  
 \* P = probabilidad de obtener el mismo patrón de bandas por casualidad (P < 0.05)

**Análisis de diversidad genética en las 12 poblaciones de C. concholepas**

Pop ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LCO0081	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0082	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0084	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0085	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0086	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0087	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0088	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0089	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0090	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0091	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0092	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

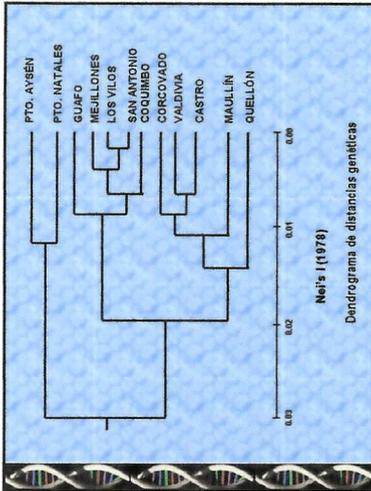
**Análisis de diversidad genética en las 12 poblaciones de C. concholepas (continuación)**

Pop ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
LCO0093	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0094	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0095	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0096	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0097	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0098	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0099	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0100	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0101	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0102	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
LCO0103	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

**Matriz de similitud genética y/o distancia genética de Nei utilizando marcadores RAPDs**

Pop ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1.000											
2	0.984	1.000										
3	0.972	0.947	1.000									
4	0.982	0.915	0.945	1.000								
5	0.948	0.915	0.948	0.974	1.000							
6	0.938	0.900	0.897	0.904	0.901	1.000						
7	0.908	0.825	0.815	0.814	0.814	0.824	1.000					
8	0.878	0.803	0.802	0.801	0.801	0.802	0.803	1.000				
9	0.855	0.789	0.789	0.789	0.789	0.789	0.789	0.789	1.000			
10	0.831	0.765	0.765	0.765	0.765	0.765	0.765	0.765	0.765	1.000		
11	0.807	0.741	0.741	0.741	0.741	0.741	0.741	0.741	0.741	0.741	1.000	
12	0.783	0.717	0.717	0.717	0.717	0.717	0.717	0.717	0.717	0.717	0.717	1.000

1. Pto. Ajusco 2. Ista Quez. 3. Cuauhtémoc 4. Cuauhtémoc 5. Cuauhtémoc 6. Cuauhtémoc 7. Los Olivos 8. San Antonio 9. Yudifita 10. Pto. México 11. Centro 12. Insular



**TEST DE MANTEL**  
r = 0.371  
p = 0.01

Localidad	Coquimbo	Los Vilos	San Antonio	Corcovado	Valdivia	Castro	Maullin	Quellon	Aysen	Natales	Guafu	Mejillones
Coquimbo	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Los Vilos	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
San Antonio	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Corcovado	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Valdivia	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Castro	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Maullin	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
Quellon	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01
Aysen	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	0.01
Natales	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01
Guafu	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01
Mejillones	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00

**CONCLUSIONES**

La variabilidad genética en *C. concholepas*, expresada como heterocigosidad, alcanzó un valor promedio de 0.442. Este valor es alto comparado con otros gastrópodos como *Helix* ( $H_o = 0.123$ ), *Patalia aspersa* (0.220) y otros estudios de *C. concholepas* (0.065 y 0.122). Sin embargo, no existe una respuesta o modelo único que puedan explicar estos valores.

Los resultados de las estadísticas F indican una marcada homogeneidad genética. El bajo valor promedio de  $F_{ST}$  (0.0065) implica una baja subdivisión poblacional ya que solo el 0.5% de la varianza en la frecuencia génica es atribuible a las diferencias entre muestras. Según los valores de  $F_{IS}$  registrados, se observa un exceso de los homocigositos, que podría deberse a la selección selectiva de individuos de genotipos heterocigositos que presentan una mayor tasa de crecimiento.

El flujo génico ( $Nm$ ) indica que 4.5 individuos son intercambiados entre las distintas localidades por generación (un valor de  $Nm > 1$  evitará la diferenciación solo por deriva).

Los datos evidencian que no existen poblaciones genéticamente diferentes y que las muestras han sido reclutadas desde una sola gran unidad poblacional panmictica.

La tasa de migración entre las localidades enfatiza la eficiencia de la dispersión larval para asegurar que los mismos alleles, a pesar de la presión selectiva de la pesquería del recurso, serán compartidos por los stocks de reproductores a través del tiempo evolutivo.

Sin embargo, la dispersión larval y el posterior asentamiento al azar que favorecerían el patrón macrogeográfico de homogeneidad genética se contraponen con la distribución no al azar de genotipos según lo indicado por la existencia de asociación entre distancia geográfica y genética (test de Mantel).

A pesar de ser una gran unidad poblacional panmictica, la existencia de una correlación entre distancia genética y distancia geográfica y la existencia de al menos tres agregados poblacionales, permite proponer que estos agregados sean considerados como unidades independientes para el manejo del recurso.

**Presentación 2:** Estructura genética poblacional de *Loxechinus albus* (Molina 1782) a lo largo de la costa chilena, utilizando análisis de electroforesis enzimática y RAPDs.

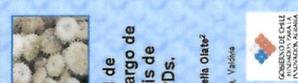
---

**Estructura genética poblacional de *Loxechinus albus* (Molina 1782) a lo largo de la costa chilena, utilizando análisis de electroforesis enzimática y RAPDs.**

Jorge E. Toro<sup>1</sup>, A.M. Vergara<sup>2</sup>, Johana A. Ojeda<sup>1</sup> y Rosalva Ollave<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Marina "Dr. Jürgen Wirtler", Universidad Austral de Chile, Valdivia  
<sup>2</sup> Instituto de Fomento Pesquero

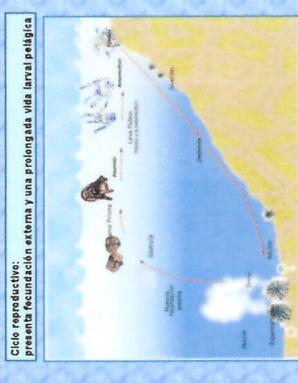
Financiamiento: Proyecto EIA BIOT-01-AC-068




El erizo comestible *Loxechinus albus* se distribuye aproximadamente entre paralelos 37° 53' S), hasta las últimas islas al sur del continente (65° 52' S).

Se encuentra desde el intermareal hasta los 3400 m de profundidad sobre fondos duros (Larraín, 1985).

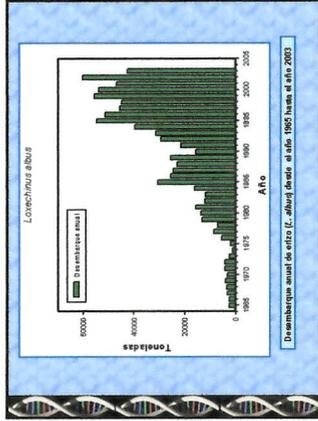
**Ciclo reproductivo: presenta fecundación externa y una prolongada vida larval pelágica**




Este recurso ha estado sometido a una intensa presión de extracción.

Debido a esta gran presión extractiva sobre el recurso, se han implementado regulaciones de tipo biológicas para controlar su extracción, tales como la talla mínima y vedas reproductivas.

Sin embargo, la combinación de factores como el libre acceso a la pesquería, la débilidad del sistema de fiscalización y el auge de la exportación hace que estas medidas no sean del todo efectivas.

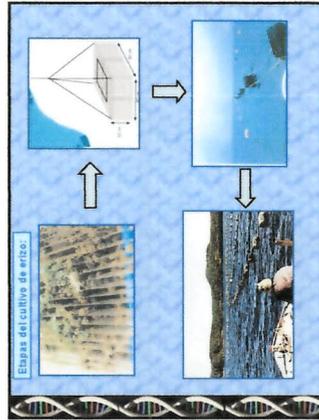


El desembarco anual del erizo comestible (*Loxechinus albus*) incrementó de 31.300 t en 1983 a 80.188 t en 2007 con una baja del 23 % en el 2009.

Es por lo tanto un recurso muy importante. Además, en las últimas 10 años se ha observado un incremento en el comercio con un consumo cercano al 25% del desembarque mundial de erizos, constituyéndose *L. albus* en la especie con más alto volumen de extracción en el mundo.

En Chile, el desembarco proviene casi exclusivamente de la región de antofagasta (42.650 t en el año 2003), basado en un sistema de etapas de producción basado en su cultivo (2 t en el año 2003).

Actualmente el cultivo del erizo representa menos del 0,01% de la producción total de la acuicultura en Chile.



A pesar de la importancia económica del recurso, se conoce muy poco acerca de la ecología y genética poblacional de esta especie.

Para la mayor parte de los ejemplares encargados de fijar las políticas de manejo, el término CONSERVACION es aplicable sólo cuando le especie está en peligro de extinción, y no para preservar la diversidad genética intrapoblacional de un determinado recurso renovable en explotación.

Gusado y Casella (1987) y Bustos et al. (1997) demostraron que *L. albus* posee una etapa de vida larval pelágica que dura entre 24 y 30 días.

Esta especie posee un gran potencial para migración a grandes distancias a lo largo de la costa chilena.

Sin embargo, procesos oceanográficos y dispersión a través de procesos mar adentro por el viento podrían estar afectando fuertemente los niveles de variación genética en las distintas poblaciones a lo largo de la costa chilena.

Un ejemplo es el repoblamiento a través de juveniles trasladados desde una población a otra o bien por juveniles producidos en el hatchery, lo cual a la larga puede causar una pérdida de diversidad genética.

La caracterización de los bancos extensivos del recurso, basados en las estadísticas de desembarco, ha sido mayor en la zona norte del país.

Actualmente el 97% del desembarco proviene de los puertos de desembarco ubicados entre la XI y XII regiones. Además, el análisis de profundidad es por ello que se ha considerado realizar un estudio con el fin de generar las bases para el manejo de este recurso.

Recientemente se han desarrollado métodos moleculares basados en la amplificación directa del ADN y estos han servido de herramienta para estudiar la estructura genética-poblacional de los organismos.

Los marcadores e RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) permite detectar la variación genética multilocus utilizando patrones consecutivos aleatorios.

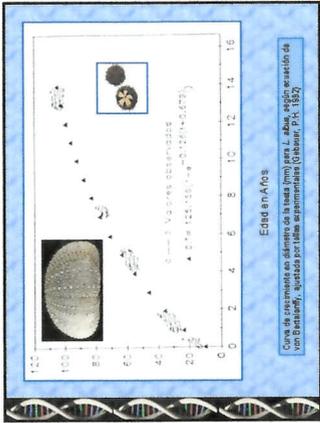
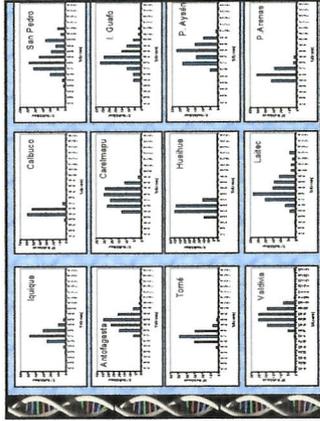
En el presente proyecto examinamos la estructura genético-poblacional de *L. albus* en Chile, a lo largo de la costa chilena (4800 km) utilizando electroforesis enzimática y RAPD-PCR, con el fin de establecer el grado de flujo genético y niveles de diferenciación genética.





**Test de Mantel**

La correlación entre distancia genética y distancia geográfica no muestra un valor significativo ( $r = 0.019$ ,  $p > 0.05$ ), lo cual indica que la distancia geográfica no es la responsable de las diferencias genéticas observadas entre las 13 poblaciones, sino que más bien éstas se deberían a otras causas, como barreras geográficas (cortinas...)



**Resultados resumidos:**

El número promedio de alelos por locus varió de 2.66 (Tomé, Valdivia, Calbuco y Huilches) a 3.50 (P. Aysén). Los valores de heterocigosidad observados fluctúan entre 24.1% en la población de San Pedro y a un 40% en la población de Carelmasu. El promedio de heterocigosidad no ponderado de las 13 poblaciones es de 34.84%, valor que indica una diferencia considerable de lo observado con respecto a lo esperado bajo condiciones de equilibrio.

El análisis de los estadísticos según el sustrato de Hardy-Weinberg correspondió a 49.84%, valor que indica una diferencia considerable de lo observado con respecto a lo esperado bajo condiciones de equilibrio.

Ello indica un déficit de individuos heterocigotos, lo cual es posible establecer a través de los valores inaprobables del estadístico D, que presenta en la mayoría de los casos un signo negativo, indicando deficiencia de heterocigotos.

Los valores de D oscilaron entre 0.212 (P.G.M. Antofagasta) y -0.723 (P.C.M. Isla Guata).

Todos los promedios de  $F_{st}$  fueron positivos y variaron entre 0.277 en el locus PGM a 0.430 en el locus ICD, indicando que existe un exceso de homocigotos. El valor promedio general ponderado de  $F_{st}$  fue estimado en 0.342 y señala un déficit de individuos heterocigotos en las 13 poblaciones.

Los valores positivos de  $F_{st}$  que fluctúan entre 0.305 (GSR) y 0.488 (ICD), con un valor promedio ponderado de 0.388, indican que se encontró un mayor número de homocigotos en relación a lo esperado.

Los resultados de los análisis de la variancia estandarizada de las frecuencias alélicas ( $F_{st}$ ) fluctuaron entre 0.012 (EST) y 0.087 (ICD), con un promedio ponderado de 0.041, indicando una escasa subdivisión poblacional que concuerda con los bajos niveles de distancias geográficas registradas.

El promedio general ponderado de  $F_{st}$  indica que el 86.9% de la variancia total de las frecuencias alélicas es explicada por la variancia existente intrapoblacionalmente. Esto equivale a decir que solo el 4.1% de la variancia total de las frecuencias alélicas se deba a diferenciación interpoblacional.

Al comparar la población donde se obtienen los reproductores a utilizar en el hatchery (Carelmasu) y los juveniles producidos en el hatchery el número promedio de alelos por locus (2.83), se mantiene en los juveniles y en los reproductores de L. abus.

A pesar de los cambios en la frecuencia alélica entre los juveniles y reproductores, al observar el mismo grado de heterocigosidad en los juveniles y reproductores, se puede concluir que la heterocigosidad se mantuvo constante en los stocks.

Esto se compara con otros estudios en donde se ha visto una reducción de la heterocigosidad en juveniles obtenidos en hatchery, tales como choritos (Gosling, 1982), almejas (Ollon and Manu, 1987), ostras (Wells, 1986, 1988).

Una explicación para la mantención de la heterocigosidad en individuos producidos en hatchery se deba a que la heterocigosidad no solo se puede mantener en poblaciones de reproducción, sino que también puede mantenerse en poblaciones de selección.

Otra explicación alternativa para la mantención y/o incremento de la heterocigosidad en los juveniles producidos en el hatchery de L. abus, es a través de la selección por tamaño de las larvas en los sucesivos cambios del tamaño de estirpe usada al realizar los cultivos de agua en los estanques.

A través de esta práctica se van seleccionando los individuos con una tasa de crecimiento más alta, y existe en la literatura evidencia que sugiere que existe una correlación positiva entre los individuos heterocigotos para múltiples locos (muchos locos heterocigotos = HLI).

De esta forma mayor cantidad de individuos heterocigotos son mantenidos en las 13 juveniles de hatchery.

En relación al tamaño poblacional efectivo ( $N_e$ ), actualmente se está trabajando con un  $N_e = 15$  (al utilizar 15 hembras y 5 machos para cada lote de juveniles producidos en el hatchery de P.G.M.).

Dado que  $N_e$  es muy sensible a la proporción entre machos y hembras utilizados, se recomienda para asegurar la mantención de la variancia genética de la población base se utilicen igual número de machos y hembras y machos en un número total no inferior a 50. Es decir 25 hembras ( $= N_h$ ) y 25 machos ( $= N_m$ ).

$N_e = \frac{4 \times N_h \times N_m}{N_h + N_m}$	$4 \times 15 \times 5$	$300$
	$15 + 5$	$20$
		$15 \times 5$
		$75$
		$75$
		$150$
		$75$
		$150$
		$75$
		$150$

El valor promedio aritmético de diversidad genética obtenida por RAPDs es de 18,5 %. Es muy difícil realizar comparaciones de este valor ya que no existen muchos datos con RAPDs en la literatura de inventarios de mariscos hasta el momento.

Sin embargo, estos análisis permitirán en el futuro, constatar con nuevos estudios de diversidad genética con el fin de conocer la evolución de la variabilidad genética poblacional en *L. albus*.

El valor de  $G_{ST}$  0,501 indica que la variabilidad intra-poblacional (50%) es similar a la variación inter-poblacional.

Existe una notable diferencia con los datos obtenidos a través de microsatélites en *L. albus* (0,13) (López et al., 2007) y con los datos de la misma técnica de RAPDs en otros inventarios somerados a explotación.

El flujo génico, estimado utilizando los 36 loci RAPDs  $N_m = 0,5$ , es más bajo que el obtenido con los datos de electrodiosis enzimática ( $N_m = 5,33$ ).

Los valores de distancia genética oscilaron entre 0,018 y 0,264, valores que permiten decir que prácticamente no existe una subdivisión poblacional para el recurso *L. albus*.

Los valores de distancia genética. Nel presentaron un mayor grado de variabilidad que la detectada con electrodiosis enzimática. Ello se ve reflejado en el agrupamiento de las localidades Isla Cuero, Isla Lamecy y San Pablo (las localidades más cercanas) al estar localizadas geográficamente cercanas entre sí en relación al resto de las localidades, separando a su vez en forma más clara las localidades más alejadas geográficamente como, Antofagasta, Chacuco, Pico Ayeján, Chaitimpu, Pico Aristas y Yallina.

Existe un bajo valor de distancia genética entre las localidades de Lirque, Hachery y Huehuin, lo cual es más difícil de explicar, sin embargo, la producción masiva de juveniles de hachery llevada a cabo en la localidad de Huehuin, podría haber favorecido la migración de juveniles de hachery por el poblamiento a los alrededores de Lirque, podrían explicar estos bajos valores de distancia genética entre estas localidades y los juveniles provenientes de hachery.

**CONCLUSIONES**

El polimorfismo con valores de 47,05 % estimados en *Lovechinus albus* con los patrones registrados en otras especies de invertebrados marinos.

Por su parte, la variabilidad genética expresada como heterocigosidad fue como promedio general de 32 %, dentro del rango para los organismos marinos.

Los resultados de la prueba de heterocigosidad inter-poblacional indican de esto, no son significativas, a pesar de las distancias geográficas que las separan y de las diferencias ambientales. Ello se ve corroborado a través de los valores de  $G_{ST}$  0,501, el cual indica que el 50% del genotipo en las frecuencias alélicas se debe a diferencias inter-poblacionales.

El valor estimado de  $N_m$  indica que el número de migrantes por generación entre las poblaciones muestradas es de 6 individuos aproximadamente.

A pesar de su amplia distribución geográfica *L. albus* se comporta como una sola gran unidad poblacional panmictica.

Según los valores de  $F_{ST}$  registrados, se observa un exceso significativo de homocigos en todos los loci de las 13 poblaciones, tal como se evidencia por los valores del índice de deficiencia de heterocigos ( $D$ ).

El índice de fijación  $F_{IS}$  indican, variando entre 0,05 a 0,15, que existe una alta homocigosidad en las poblaciones.

Producto de la alta extracción de ejemplares se está ejerciendo una selección artificial sobre ellas eliminándose de las poblaciones aquellos individuos mejor adaptados (heterocigos con mayor tasa de crecimiento).

A largo plazo, las poblaciones estarán constituidas cada vez más por individuos con menores capacidades adaptativas, dejando descendientes biológicamente inferiores, distribuidos en habitats fragmentados estableciendo la subdivisión local.

En base a estos resultados se basas para el manejo del recurso se debe considerar un enfoque como genéticamente homogénea a lo largo del litoral chileno.

Es necesario resaltar que en base a la distribución de frecuencias por locus, subgenio (H=120/población), se puede constatar que las poblaciones que están sometidas a una mayor presión de extracción, ya que la frecuencia de alelos se desplaza hacia la izquierda.

Se puede apreciar que aquellas poblaciones geográficamente alejadas de centros poblados (los Cueros, Isla Lamecy, San Pablo, etc.) presentan un rango de alelos más amplio y desplazado hacia la derecha.

La relevancia que este tipo de estudios tiene queda de manifiesto al ver los resultados obtenidos para la estructura genética poblacional del recurso *L. albus*, ya que es muy bien conocido en la literatura internacional que el manejo de una especie de valor comercial debe ser en lugar a dudas, (y en especial en el ámbito de la acuicultura) un asunto que requiere de un enfoque adaptativo.

De esta forma, una potencial reducción de la variabilidad genética debido a una extracción indiscriminada (sobrepesca), ó un plan de manejo inadecuado, puede resultar en la incapacidad, por parte de los organismos que componen esas poblaciones naturales, de responder a cambios ambientales futuros.

El conocimiento de la variabilidad genética de un recurso (frente e interior) es un requisito indispensable para el manejo del recurso, permitiendo tomar decisiones adecuadas para correctas planes de manejo, repoblamiento y/o cultivo del recurso.

**Conservación genética: *Lovechinus albus***

**Riesgos genéticos:**

**Pérdida de identidad poblacional:**

- La larva posee una larga vida planctotónica (20 - 25 días).
- Los juveniles (hatchery) utilizados para fines de cultivo generalmente provienen de una o dos poblaciones de bancos naturales específicas.
- Siempre que poblaciones aisladas son repobladas con un gran número de ejemplares introducidos -reemplazando translocos hacia áreas de manejo.
- La producción de juveniles en el hatchery, utilizando un bajo tamaño poblacional puede generar un efecto de cuello de botella, reduciendo la diversidad genética, por ende, pérdida de diversidad genética y/o reduciendo más grados de endogamia ó consanguinidad.
- Sobre-explotación:

Si las larvas reducidas se sobre-explotan y el cultivo de juveniles se reduce o intermite críticamente, el problema lleva a crear efectos de deriva génica y depuración genotípica.

Si las condiciones, las especies de repobladas o reemplazados sufren un fracaso económico, la extracción por sobre explotación es un elemento poco probable, debido a que la presión de pesca generalmente se reduce cuando la base es poco rentable y a poco tiempo se agota el recurso. Sin embargo, el riesgo de sobre explotación puede ser un número reducido de ejemplares de la especie para mantener una estructura genética por viable población.



La relevancia que este tipo de estudios tiene queda de manifiesto al ver los resultados obtenidos para la estructura genética poblacional del recurso *L. albus*, ya que es muy bien conocido en la literatura internacional que el manejo de una especie de valor comercial debe ser en lugar a dudas, (y en especial en el ámbito de la acuicultura) un asunto que requiere de un enfoque adaptativo.

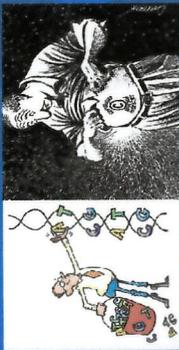
De esta forma, una potencial reducción de la variabilidad genética debido a una extracción indiscriminada (sobrepesca), ó un plan de manejo inadecuado, puede resultar en la incapacidad, por parte de los organismos que componen esas poblaciones naturales, de responder a cambios ambientales futuros.

El conocimiento de la variabilidad genética de un recurso (frente e interior) es un requisito indispensable para el manejo del recurso, permitiendo tomar decisiones adecuadas para correctas planes de manejo, repoblamiento y/o cultivo del recurso.

**Presentación 3:** Estado de la caracterización de  
recursos genéticos acuáticos

---

## Estado de la caracterización de recursos genéticos acuáticos



Gonzalo Galardo  
Laboratorio de Genética y Acuicultura  
Universidad de Los Lagos - Osorno



## Resumen

- Acuicultura - introducción deliberada de especies exóticas y traslado de poblaciones locales
- Acuicultura Chilena - submonocultura (exóticas, nativas)
- Diversificación (exóticas, nativas)
- Chile una isla geográfica alta diversidad & alto endemismo, particularmente donde se ha desarrollado la acuicultura



## Acuicultura (y Pesquerías) Responsable

- Para combinar crecimiento sostenido con el uso sustentable de los recursos genéticos
- Se requiere una apropiada ecogenética
- Adherencia de la genética para la mejora de los recursos, prácticas de los
- Estado de la caracterización genética de los recursos silvicultores y silvicultores



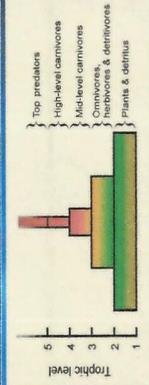
## Historia

- 1850 & 1920: Introduction of exotic species for recreational fishing (trout, carp, silverfishes)
- 1921-1975: Introduction of Chile salmon to develop economic activities related to aquaculture. The government through IFOP, played a relevant role implementing facilities, adaptive foreign technologies and hiring international experts
- 1971-2003: Industry "consolidated"
- Many private. State indirectly supporting by means of competitive funds.
- 1981: First attempt of scallop farming



## Producción acuícola

GRUPO	Subgrupos	Chile	1991	2002	2002/1991
FINES	Sin fines	0	150	24207	4.9
	Recreación	0	1784	8407	5.0
	Consumo de carne	0	158	217	1.0
	Consumo de leche	0	3	3	1.0
	Consumo de otros	0	3	3	1.0
MÉTODOS	Intercambio de gametos	0	833	10515	4.5
	Intercambio de gametos	0	371	378	1.0
	Intercambio de gametos	0	34	34	1.0
	Intercambio de gametos	0	28	28	1.0
	Intercambio de gametos	0	252	4168	16.5
	Intercambio de gametos	0	78	168	2.1
	Intercambio de gametos	0	50	50	1.0
	Intercambio de gametos	0	50	50	1.0
	Intercambio de gametos	0	50	50	1.0
	Intercambio de gametos	0	50	50	1.0
TOTAL		0	14218	12784	1.0



## Razones para la introducción de especies (FAO)

REASON	Nº OF RECORDS	%
Availability	299	38.7
Exhaustion	233	7.9
Spill	267	7.5
Accidental	263	7.3
Commercial	189	3.9
Sexual	104	2.9
Investigation	88	2.5
Biological control	65	1.8
Algae control	33	0.9
Ecological availability	26	0.7
Forage	21	0.6
Fish, zooplankton Control	18	0.5
Other reasons	15	0.4
Worm control	1	0.5
Invasion	2	0.1
Unlabeled (black marked)	52	15.4

FAO, 1979, p. 103



Adaptaciones locales esenciales durante eventos periódicos de condiciones ambientales extremas.

**Populations may experience "ecological crunches" in variable climates, nullifying the assumptions of competition theory and limiting the usefulness of short-term studies of population patterns**

Wiens, J. A. 1977. On competition and variable environments. *American Scientist* 65

## Patterns of Genetic differentiation

- Degree of physical isolation & extent of gene flow among conspecific assemblages
- Habitat heterogeneity & associated selective pressures
- Stability and size of populations over time
- Freshwater fishes show the highest levels of genetic differentiation (mean  $G_{ST}$  = 0.22) and marine fishes the lowest (mean  $G_{ST}$  = 0.06), with anadromous species showing intermediate levels (mean  $G_{ST}$  = 0.11) (Ward *et al.*, 1994).

## Alien species/genotypes

"There is now a general appreciation that species interacting, especially those resulting from the establishment of self-sustaining introduced species or the alteration of indigenous gene pools, are potentially the most damaging environmental consequences of aquaculture."

Arthington and Blijndom 1996.

## Acuicultura Chilena: ¿paradoja conservacionista?

### Diversity

Chilean Aquaculture Boom Is Based on Exotic Salmon Resources: a Conservation Paradox

Introducción de especies exóticas es la segunda causa de impacto en la biodiversidad nativa. Luego de la pérdida de hábitat.

Giuliano A. Tabata. 2003. *Conservation Biology* 17:3-1174

## FAO Code of Conduct for Responsible Fisheries

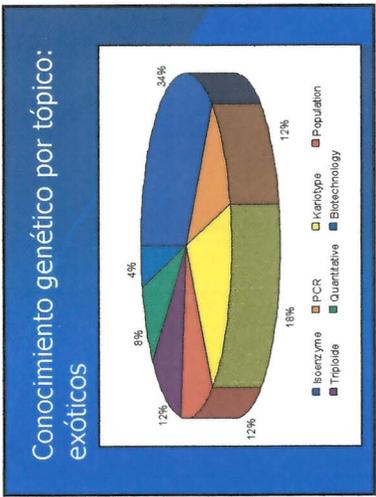
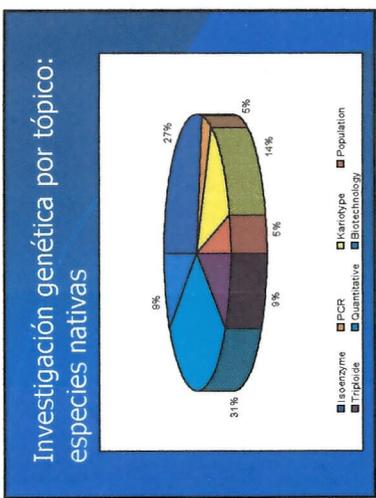
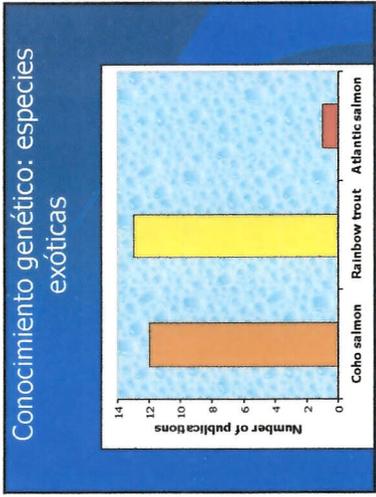
**Aquaculture development Article 9.3** "States should conserve genetic diversity and maintain integrity of aquatic communities and ecosystems by appropriate management"



## Acuicultura sostenible

- Dejar abiertas opciones de desarrollo para futuras generaciones
- Seguir rigurosamente con los estándares de conducta para acuicultura responsable y altos de biodiversidad.
- Investigar potencial de especies nativas
- Evaluar riesgo de introducción de especies exóticas en relación a las necesidades de la comunidad local y tomar decisiones apropiadas.
- Responsabilidad significa una aproximación ecosistémica y considerar objetivos de corto y largo plazo





### Chilean Aquaculture species with GenBank Access

Item	Total	Exotic	Native	Total species in GenBank	Percentage of species in GenBank
Fishes	6	5	0	5	100
Molluscs	7	2	5	5	71.43
Algae	1	0	1	1	100
Crustacea	0	0	0	0	0

### Poder estadístico & precaución

$H_0$ : Alien species have no effect on an ecosystem

**Type I error**  
 Rejecting a true  $H_0$   
 - Concluding aliens do have an effect when they actually have no effect  
 - Management and other restrictions put in place where none were needed

**Type II error**  
 Accepting a false  $H_0$   
 - Concluding aliens do not have an effect when they actually do  
 - Management actions and other restrictions not implemented and stocks collapse or go extinct

### Mal manejo es inevitable en ausencia de un adecuado conocimiento de la estructura genética poblacional

¿Estamos preparados para anticipar los riesgos asociados a la introducción de especies introducidas? ¿COAR se podrá monitorar la diversidad genética y la estructura genética poblacional en el tiempo tanto en especies nativas como introducidas?

¿Para implementar una acuicultura sostenible?

¿Para explorar y conservar los recursos genéticos acuáticos?



**Panel:** Caracterización Genética poblacional  
para el manejo y la conservación de  
recursos marinos de importancia para la  
acuicultura y pesquería

---

# CARACTERIZACIÓN GENÉTICA POBLACIONAL PARA EL MANEJO Y LA CONSERVACIÓN DE RECURSOS MARINOS DE IMPORTANCIA PARA LA ACUICULTURA Y LA PESQUERÍA.

Ana María Vergara M.\*; Toro Y., Jorge E.\*\*; Ojeda P., Johana A.\*\* y Olate D. Rosella B.\*\*

(\* ) Instituto de Fomento Pesquero; (\*\*) Instituto de Biología Marina, Universidad Austral, Valdivia.



## RESUMEN

Una parte importante de nuestra economía se basa en la explotación de los recursos marinos y en la acuicultura. Por esto se debiera incorporar a estas actividades, los conceptos de manejo y uso sustentable para la conservación de la biodiversidad. La conservación de la biodiversidad ha sido siempre enfocada a nivel macro (ecosistemas) dejando de lado análisis a otros niveles, como lo es al nivel de genes. Si se quiere seguir haciendo uso de dichos recursos así como también, llevar a cabo una acuicultura responsable es de urgente necesidad conocer el estatus genético de las poblaciones naturales, al menos de aquellas que están siendo explotadas comercialmente. La principal causa del atraso en la implementación de medidas apropiadas de conservación a nivel genético parece ser la ignorancia o indiferencia hacia las implicancias de los estudios básicos de genética poblacional (estructura genética, identificación de poblaciones y stocks) los cuales son indicadores del impacto de las actividades de pesquería, acuicultura y reproducción sobre las poblaciones naturales a manejar y conservar. Con el propósito de establecer la estructura genética poblacional de dos importantes recursos bentónicos de nuestro país, *Loxechinus albus* (enzo rojo), y *Concholepas concholepas* (loco), determinando posibles diferenciaciones genéticas entre poblaciones a macro y microscales, se recolectarán muestras a lo largo de su distribución natural en el litoral chileno. Las muestras serán analizadas a nivel genético poblacional usando las técnicas de electroforesis enzimática y ADN utilizando marcadores RAPDs. Además, se analizarán muestras provenientes de hatchery (reproductoras y juveniles) con el propósito de evaluar el tipo de impacto sobre la composición genética de las poblaciones naturales causadas por las actividades de traslado de semillas para efectos de cultivo y repoblamiento.

## MATERIAL Y MÉTODO

### A.- Obtención y almacenamiento de muestras

Individuos de *L. albus* y *C. concholepas* serán colectados de las localidades con mayor proporción de desembarques de cada recurso (Fig. 1 y 2). Se recolectarán a través de buzo autónomo 100 individuos adultos al azar de cada población completándose para el recurso enzo un total de 1200 muestras y 1300 para el recurso loco. Cada individuo será medido (diámetro de la testa y longitud peristomal para enzo y loco respectivamente) con calibre vernier (0.1 mm precisión) y será diseccionado. Muestras de gónadas se congelarán en nitrógeno líquido en tubos NUNC de 1.8 ml para su posterior análisis de electroforesis enzimática, mientras que para análisis de ADN utilizando RAPDs las muestras de gónadas se fijarán con etanol al 95% en tubos eppendorf. Para el recurso enzo, se obtendrá una muestra de los reproductores llevados al Centro de Acuicultura Huehues (IFOP), lugar donde se lleva a cabo producción bajo ambiente controlado y posteriormente, la progenie de dichos reproductores también será analizada.



Fig. 1. Lugares de obtención de muestras de la especie *Loxechinus albus*.



Fig. 2. Lugares de obtención de muestras de la especie *Concholepas concholepas*.

### B.- Caracterización genética poblacional a través de electroforesis enzimática

Se analizará electroforéticamente los siguientes sistemas enzimáticos: GDH (1.1.1.2), \*GPDH (1.1.1.2), MDH (1.1.1.37), ME (1.1.1.40), β-FUDH (1.1.1.44), GSH (1.5.1.11), ATT (2.6.1.3), PGM (2.7.5.1), EST (3.1.1.1), LAP (3.4.11.1), FEP (3.4.11.9), MPI (5.3.1.6), PGI (3.1.3.9), GGT (2.6.1.1), GSR (1.6.4.2) y ADH (1.2.1.27). Se caracterizará grado de polimorfismo, heterocigosidad, frecuencias alélicas, genotipos y equilibrio Hardy-Weinberg. Se calculará distancia genética e índice de similitud y análisis de clúster (UPGMA). La heterogeneidad de las frecuencias génicas se examinará según Workman y Newlander, 1970; Hart y Clark, 1989. La diferenciación espacial en las frecuencias génicas se examinará utilizando el análisis jerárquico de estructura reproductiva, examinándose para detectar diferencias poblacionales derivadas de presiones ambientales diferentes como selección y deriva genética. El monito a utilizar es de "aislamiento por distancia", en donde los efectos en cada locus serán independientes ya que existirá una estructura subpoblacional que limite el flujo génico en una localidad en particular.

### C.- Caracterización genética poblacional a través de análisis de ADN utilizando RAPDs.

#### C.1.- Análisis de ADN:

La técnica RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) es relativamente nueva y se basa en PCR (polymerase chain reactor) en el cual un solo oligonucleótido de entre 5 y 10 mer (primer) con una secuencia arbitraria se utiliza para amplificar regiones anónimas del ADN genómico. Debido a que el primer es corto (5-10 bases) existe una alta probabilidad de que, repetidos en el genoma, se encuentren secuencias repetitivas invertidas que sean complementarias muy próximas entre sí, las que servirán de sitios para el primer. Para este tipo de análisis se trabajará con 50 individuos de cada una de las poblaciones muestreadas. A cada ejemplar muestreado se le determinará su longitud máxima (mm) con un pie de metro y se procederá a diseccionar un trozo de aproximadamente 200-400 mg de tejido gonadal, muscular o del borde del manto. Esta muestra de tejido se fijará en etanol al 95% en tubos Nunc y se conservará a 8°C hasta a la espera de su análisis.

#### C.2.- Extracción de ADN:

Se extraerá ADN genómico total de un trozo de tejido (50-100 mg) fijado previamente en etanol al 95% y se trozará finamente dejándolo digerir en lysis-buffer (50-mM Tris-HCl (pH 8.0), 10% SDS, 25mM EDTA) con 200 µg de proteinasa K (Sigma) a 37°C durante 12 horas. Luego se le adicionará 500 µl de una solución de fenol-clorofórmio-isoamyl alcohol (24:24:1). Esta mezcla se agitará en un vórtex y se centrifugará a 13,000 rpm durante 15 minutos a 5°C, para posteriormente sifonar el sobrenadante y transferirlo a un tubo tubo eppendorf de 1.5 ml previamente autoclavado. Los ácidos nucleicos se precipitarán con la adición de 1000 µl de etanol a -20°C (Toro, 1998). Los tubos se mantendrán en el freezer a 82°C por 20 minutos previo a su centrifugación a 6,000 rpm por 3 minutos. Luego el sobrenadante se descartará, y se adicionará nuevamente 500 µl de etanol a 82°C, para luego centrifugar a 6,000 RPM. Luego de este procedimiento de lavado, se procederá a descartar el sobrenadante, dejando el pellet en el fondo del tubo y colocando los tubos en un concentrador (disecador SAVANT DNA 110) de ADN a 37°C hasta que el etanol se evapore completamente. El pellet de ADN extraído se resuspendirá (incubando a 60°C por 10 minutos) en 200 µl de agua destilada y se almacenará a -20°C, hasta el momento de la amplificación.

#### C.3.- Amplificación del ADN:

Se utilizarán 40 primers (ver tabla a continuación) en cada reacción PCR (para cada ejemplar) con el fin de generar marcadores moleculares para los 50 individuos de cada una de las poblaciones y especies muestreadas. Cada amplificación estándar para PCR utilizando una mezcla de 25 µl (en tubos para PCR ultra delgados de 500 µl (Gordon technologies)) que contendrá 2 µl de ADN genómico extraído (en una alícuota a establecer), 0.2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs (deoxyribonucleoside triphosphates, dCTP, dGTP, dATP, dTTP, SIGMA), 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM del primer, una unidad de Taq (Thermus flavus) ADN polimerasa (Promega), agua bi-distilada y PCR-buffer (Promega). La reacción será cubierta con una gota de aceite mineral para evitar evaporación y se colocará en un termo-ciclador (Amplifier II, Thermolyne Inc.). El protocolo del termo-ciclador será el siguiente: un periodo de desnaturalización a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 50°C por 20 segundos y 72°C por 2 minutos. Se tendrá especial cuidado en la manipulación, para prevenir contaminación de ADN de cada muestra. Se usarán pipetas eppendorf con puntas desechables, las cuales se autoclavarán periódicamente junto con botes limpios y puntas que serán del tipo desechables. Además, en cada set de muestras a amplificar en el termo-recolector, se adicionará una muestra negativa (sin ADN).

#### C.4.- Electroforesis del producto de la amplificación PCR:

La totalidad de los fragmentos de ADN amplificado con los primers utilizados se separarán en gels de agarosa (SIGMA high resolution) al 1% en buffer TBE 0.5X (44.5 mM Tris base, 44.5 mM ácido bórico, 1M EDTA (pH 8)) por aproximadamente 2 horas a 112 volts. Dos escalas estándares de 1Kb (Life Technologies) se correrán en cada uno de los extremos del gel. Luego de la electroforesis los fragmentos RAPD se visualizarán con una tinción de etidium bromide durante 15 minutos y previo a un lavado de los gels en agua, su visualización se llevará a cabo en bandejas de luz UV, donde se fotografarán según Comesaña et al. (1999), Toro (1998).

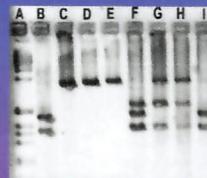
## PROYECCIONES DEL PROYECTO

El sector pesquero en Chile ha experimentado un importante incremento en los últimos años constituyendo una parte importante de la economía nacional. Dentro del sector pesquero, la acuicultura ha sido calificada como una de las actividades más dinámicas e importantes, con un crecimiento anual promedio de 39%. Para mantener este crecimiento, uno de los grandes desafíos de la acuicultura es la sustentabilidad en el largo plazo. Esta actividad se ve afectada por la alternativa más plausible para incrementar el suministro de los recursos pesqueros que demandará la humanidad de este siglo y que la actividad extractiva no podrá satisfacer. En este ámbito, el desafío de la sustentabilidad también compete a la pesquería, en el sentido de que su extracción debe estar bien regulada para asegurar la abundancia y permanencia de los recursos en el tiempo. De este modo, el manejo y uso sustentable de los recursos es una gran responsabilidad que compete a los científicos y sector público. Precisamente los factores que limitan la conservación y manejo de los recursos acuáticos corresponden principalmente a la distancia entre la información científica y tecnológica, la ausencia de programas apropiados e instituciones involucradas en el tema y la carencia de políticas nacionales e internacionales. Es por eso que el presente proyecto pretende aunar esfuerzos en este sentido, generando en una primera instancia conocimientos genéticos básicos para la identificación de stocks, y así facilitar el manejo y conservación de recursos, y posteriormente difundir estos conocimientos a las instancias del sector público que regulan la explotación de los recursos. El fin último es asegurar la abundancia y permanencia de los recursos para que el crecimiento del sector pesquero y los ingresos que este genera puedan ser utilizados por la presente y las futuras generaciones.

## RESULTADOS ESPERADOS

RESULTADO	Conocimiento estructura genética de poblaciones de <i>L. Albus</i>	Conocimiento estructura genética de cohortes de hatchery de <i>L. Albus</i>	Conocimiento impacto de la acuicultura y repoblación sobre las poblaciones naturales de <i>L. Albus</i> .	Conocimiento estructura genética de poblaciones de <i>C. concholepas</i> .	Catálogo conteniendo el estatus genético de los recursos estudiados.	Medidas de manejo para el uso sustentable y la conservación de los recursos.
META FINAL	Conocimiento de la variabilidad genética intra e inter poblacional.	Determinar la estructura genética de reproductoras y juveniles de hatchery.	Determinar si es un impacto positivo, negativo o neutro para la mantención de la variabilidad genética.	Conocimiento de la variabilidad genética intra e inter poblacional.	50 ejemplares impresos del catálogo.	Utilización de la información contenida en los informes para la generación de medidas de manejo de estos recursos.

## GPI



Contacto: Ana María Vergara M. (a.vergara@ifop.cl), Jorge Toro Yagu (j.toro@uau.cl), Johana Ojeda P. (johanao@uau.cl) y Rosella Olate D. (rolate@uau.cl)



---

**Sección Documentación,  
Difusión y Bibliotecas**

---

**IFOP  
Valparaíso  
Chile**