INFORME FINAL

Proyecto FIPA Nº2015-14

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DEL GÉNERO *Mytilus* EN CHILE

Mayo 2017

RESUMEN EJECUTIVO

El presente documento informa los resultados de la investigación realizada en el proyecto FIPA 2015-14 que tuvo como objetivos i) identificar las especies del género *Mytilus* en Chile; ii) determinar posibles eventos de hibridación; iii) establecer la distribución espacial de la diversidad genética mediante un análisis filogeográfico y iv) realizar un análisis de riesgo desde el punto de vista productivo y de la biodiversidad, considerando la factibilidad de realizar programas de repoblamiento y cultivo en zonas geográficas no utilizadas actualmente. Para ello, se muestrearon 38 localidades ubicadas entre IV región y la XII región de Magallanes. Se realizó un extenso muestreo que abarco alrededor de 3000 km de costa, lo que corresponderia al rango de distribución de *Mytilus* en Chile. No obstante, hay areas donde no existe registro de este molusco (30º16'-36º31'; 37º10'-38º47; 38º48'-39º23'). A cada animal se le disectó un trozo del tejido del manto para extraer el ADN, con el cual se realizaron análisis moleculares, tales como: (i) amplificación de genes diagnóstico y ejecución de ensayos RFLP para identificar a nivel de especie los animales que habitan la costa chilena; y (ii) secuenciación de locus nucleares y mitocondriales para realizar la reconstrucción filogenética, la delimitación de especies y análisis filogeográfico. Los análisis filogenéticos mostraron una clara separación en las especies de *Mytilus*. Particularmente las especies de *Mytilus* presentes en Chile, están representados por dos clados bien diferenciados: *Mytilus chilensis* y *M. galloprovincialis*. En este mismo sentido, las muestras disponibles de España y Chile (representadas por Llico, isla Quiriquinas, Lota y Tubul) confirman que *M. galloprovincialis* está presente en Chile. Además, el análisis de delimitación de especies (en base a la teoría de la coalescencia y usando estadística de verosimilitud y bayesiana) indicó que *Mytilus chilensis* es una especie taxonómicamente y filogenéticamente válida, por tanto el complejo *Mytilus edulis* estaria

representado por cuatro especies (*M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus*, *M. chilensis*). Por otro lado, los análisis filogeográficos muestraron que *M. galloprovincialis* (mejillón del Mediterrano) fue introducido en Chile. Esta especie habita casi exclusivamente dentro de la región del Biobío con una muy baja frecuencia en el resto de la costa chilena. Probablemente la dispersión de esta especie se encuentra limitada por las caracteristicas biogeográficas del sector. En ese sentido, también existe una baja presencia de *Mytilus chilensis* en la región del Biobio. No obstante, cuando ambas especie co-habitan producen hibridación, la que se identificó mediante el ensayo RFLP del gen de la proteína adhesiva del pie. Sin embargo, este tipo de hibridación es poco frecuente y solo fue encontrada en las localidades de Coliumo (8%), Lota (4%) y Llico (4%). Probablemente esta hibridación se encuentra limitada debido a que el rango geográfico de estas especies no se sobre-ponen en Chile (simpatría). Seguramente, si aumentaran las zonas de contacto este fenómeno sería más frecuente. Aunque no existe datos de los efectos (ecológicos, bioseguridad y/o productivos) que podria tener este tipo de hibridación, en el análisis de riesgo y FODA se profundizan las supuestas consecuencias que podria acarrear este fenómeno asi como también la introducción masiva de especies fuera de su área de distribución natural.

Eventos de hibridación de alta frecuencia (zonas híbridas) solo fueron encontrados en el estrecho de Magallanes, tal como fue reportado anteriormente. Los resultados apuntan que esta zona híbrida se encuentra ligado estrechamente a uno de los principales puertos del país (Puerto de Punta Arenas). La hibridación más frecuente encontrada en este estudio fue la que se produce entre las especies *M. edulis* y *M. chilensis*.

En conclusión y en base de los resultados de este proyecto es que: (i) La validez taxonómica de *Mytilus chilensis* (bajo el concepto filogenético de especie) se observa como una ventaja para la mitilicultura nacional ya que se considera que es una especies endémica que habita principalmente la costa chilena, pero tambien hay registro de su presencia en algunos sectores de Argentina, Nueva Zelanda y sur de Australia; (ii) recomendamos no realizar traslados masivos de choritos para la mitilicultura entre la Región del Bíobío y la Región de los Lagos, debido a que se produciria una dispersión de la especies invasora *M. galloprovincialis* y es de amplio conocimiento los efectos negativos que esta especie ha causado en la fauna nativa (e.g. Sudáfrica); (iii) se recomienda realizar una investigacion respecto de la presencia de *Mytilus galloprovincialis* en la región del Biobio. Ya que es importante conocer los parámetros (biogeograficos, antropogénicos, biológicos reproductivos, larvales, etc) por los cuales esta especie se encuentra limitado a un reducido rango geográfico (36º 31’ 51,28’’S hasta 37º 08’ 53,63’’S).

Índice de Contenidos

Índice de figuras **8**

Índice de tablas **12**

Índice de Anexos **14**

1. OBJETIVOS **16**

1.1. Objetivo general **16**

1.2. Objetivos específicos **15**

2. ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE **17**

3. METODOLOGÍA DE TRABAJO **24**

3.1. Metodología para identificar las especies del género *Mytilus* en Chile **24**

3.1.1. Muestreos **24**

3.1.2. Extracción de ADN **24**

3.1.3. Amplificación **26**

3.1.4. Secuenciación y Alineamiento **27**

3.1.5. Secuencias de *Mytilus* foráneas **28**

3.1.6. Determinación de las especies en Chile mediante test diagnóstico **28**

3.1.7. Análisis bioinformático para la reconstrucción filogenética **30**

3.1.8. Delimitación de especies **32**

3.2. Metodología para determinar posibles eventos de hibridación entre las especies **33**

3.3. Metodología para establecer la distribución espacial de la diversidad genética de las distintas especies mediante un análisis filogeográfico **36**

3.3.1. Justificación de los marcadores utilizados **36**

3.3.2. Análisis bioinformático **37**

3.3.2.1. Diversidad genética **37**

3.3.2.2. Distribución espacial de la diversidad genética **38**

3.3.2.3. Análisis demográfico **38**

3.4. Metodología para realizar análisis de riesgo desde el punto de vista productivo y de la biodiversidad, considerando la factibilidad de realizar programas de repoblamiento y cultivo en zonas geográficas no utilizadas actualmente **39**

4. RESULTADOS **40**

4.1. Filogenia y delimitación de las especies de *Mytilus* **40**

4.1.1. Justificación del uso de 18S DNA **40**

4.1.2. Resultados de los análisis de delimitación de especies **48**

4.2. Hibridación entre especies de *Mytilus* spp en Chile **49**

4.3. Análisis filogeográfico **52**

4.3.1. Distribución espacial de la diversidad genética *Mytilus chilensis* **52**

4.3.1.1. Índices generales de diversidad genética **52**

4.3.1.2. Análisis histórico demográfico **53**

4.3.1.3. Diferencias entre pares de secuencias (*Mistmatch Distribution*) **55**

4.3.1.4. Redes de haplotipos y redes filogenéticas para *Mytilus chilensis* **60**

4.3.2. Distribución espacial de la diversidad genética *Mytilus galloprovincialis* **63**

4.3.2.1. Índices generales de diversidad genética **64**

4.3.2.2. Análisis histórico demográfico **65**

4.3.2.3. Diferencia entre pares de secuencias (*Mistmatch Distribution*) **66**

4.3.2.4. Redes de haplotipos y redes filogenéticas para *Mytilus galloprovincialis* **70**

4.4. Resultados de análisis de riesgo **74**

5. DISCUSIÓN **77**

5.1. Delimitación de especies **77**

5.2. Hibridación **80**

5.3. Filogeografía **82**

5.4. Análisis de Riesgo desde el punto de vista productivo y de biodiversidad **83**

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **102**

7. ANEXOS **122**

Índice de Figuras

Fig. 1. Diagrama que representa el cluster de DNA ribosomal completo en metazoos. En rojo se señala la región a analizar propuesta en el proyecto. En verde los dos segmentos de la región 18S, parte del mismo cluster que fueron analizados **41**

Fig. 2. Relaciones filogenéticas entre las seis especies de *Mytilus* a través de análisis de COI. El soporte de los nodos se muestra en cada rama indicando probabilidad a posteriori (superior) y soporte de bootstrap (inferior). Las barras verticales a la izquierda de la figura indican los resultados de los análisis de delimitación de especies **43**

Fig. 3. Relaciones filogenéticas entre las especies de *Mytilus* en base a los datos concatenados 16S y COI. El soporte de los nodos se muestra en cada rama indicando probabilidad a posteriori (superior) y soporte de bootstrap (inferior) **44**

Fig. 4. Relaciones filogenéticas entre las cuatro especies de *Mytilus* a través de análisis de 18SrRNA. El soporte de los nodos se muestra en cada rama indicando probabilidad a posteriori (superior) y soporte de bootstrap (inferior) **46**

Fig. 5. Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica el producto de PCR del gen de la proteína adhesiva del pie, utilizando el partidor M15/M16. El amplicón para cada especie es de 180 pb = *Mytilus edulis* (Me), 168 pb = *Mytilus trossulus* (Mt), 126 pb = *Mytilus galloprovincialis o M. chilensis* (Mg). (1) Me (Buque Quemado, Magallanes); (2) Me (Cornwell, Reino Unido), (3) Mg (Galicia, España), (4) Mg (Lota, Chile), (5) Mg (Puerto Williams, Chile), (6) Híbrido Mt/Mg (Muelle Loreto, Magallanes Chile), (7) Mt (Bras d'Or Lake, Canada), (8) Hibrido Me/Mg (Muelle Loreto, Magallanes Chile), (9) Mt (Bras d'Or Lake, Canada). (-) Control negativo **49**

Fig. 6. RFLP Aci I. A. Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica el producto de PCR del gen de la proteína adhesiva del pie, utilizando el partidor M15/M16. El tamaño del amplicon para *Mytilus galloprovincialis* y *M. chilensis* es de 126 pb. B. Imagen de un gel de agarosa (3%) teñido con *sybr safe* que indica los patrones de RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) después de la

digestión con: *Aci I*. **(1)** *M. chilensis*, **(2)** *M. galloprovincialis* (Lota), y **(3-4)** híbrido entre *M. chilensis*/*M. galloprovincialis* **50**

Fig. 7. Gráfico del análisis bayesiano Skyline plot (10^8 MCMC BEAST; > 200 ESS), muestra la historia demográfica de *Mytilus chilensis* en localidades muestreadas en el sur de Chile. El eje de las ordenadas muestra tamaño poblacional y el eje de las abscisas representa el tiempo (kyr = miles de años). La línea negra continua es la media estimada y el área azul señala el límite del 95% de la mayor densidad posterior. Basado en las secuencias del gen COI **54**

Fig. 8. Gráfico del análisis bayesiano Skyline plot (10^8 MCMC BEAST; > 200 ESS), muestra la historia demográfica de *Mytilus chilensis* en las localidades muestreadas del sur de Chile. El eje de las ordenadas muestra el tamaño poblacional y el eje de las abscisas representa el tiempo (kyr = miles de años). La línea negra continua es la media estimada y el área azul señala el límite del 95% de la mayor densidad posterior. Basado en las secuencias del locus 16S **55**

Fig. 9. Gráfico de distribución mismatch de haplotipos para las localidades muestreadas donde habita *Mytilus chilensis* dentro de las localidades del sur de Chile, basado en las secuencias de mtDNA del gen COI **56**

Fig. 10. Gráfico de distribución mismatch por localidad para *Mytilus chilensis* dentro de las localidades del sur de Chile, basado en las secuencias de mtDNA del gen COI **57**

Fig. 11. Gráfico de distribución mismatch de haplotipos para las localidades muestreadas donde habita *Mytilus chilensis* dentro de las localidades del sur de Chile, basado en las secuencias de mtDNA del locus 16S **58**

Fig. 12. Gráfico de distribución mismatch por localidad para *Mytilus chilensis* dentro de las localidades del sur de Chile, basado en las secuencias de mtDNA del locus 16S **59**

Fig. 13. Red de haplotipos para el locus COI obtenido mediante el método median joining para los choritos de la especies *M. chilensis* **60**

Fig. 14. Red filogenética entre los choritos de la especies *Mytilus chilensis* que habitan el sur de Chile. Basado en los datos del gen COI **61**

Fig. 15. Red de haplotipos para el locus 16S obtenido mediante el método median joining para los choritos de la especies *M. chilensis* **62**

Fig. 16. Red filogenética entre los choritos de la especies *Mytilus chilensis* que habitan el sur de Chile. Basado en los datos del gen 16S **63**

Fig. 17. Gráfico del análisis bayesiano Skyline plot (10^8 MCMC BEAST; > 200 ESS), muestra la historia demográfica de *Mytilus galloprovincialis* en las localidades ubicadas en la región del Biobío. El eje de las ordenadas muestra tamaño poblacional y el eje de las abscisas representa el tiempo (kyr = miles de años). La línea negra continua es la media estimada y el área azul señala el límite del 95% de la mayor densidad posterior. Basado en las secuencias del gen COI **65**

Fig. 18. Gráfico del análisis bayesiano Skyline plot (10^8 MCMC BEAST; > 200 ESS), muestra la historia demográfica de *Mytilus galloprovincalis* en las localidades ubicadas en la región del Biobio. El eje de las ordenadas muestra el tamaño poblacional y el eje de las abscisas representa el tiempo (kyr = miles de años). La línea negra continua es la media estimada y el área azul señala el límite del 95% de la mayor densidad posterior. Basado en las secuencias del locus 16S **66**

Fig. 19. Gráfico de distribución mismatch de haplotipos para las localidades muestreadas donde habita *Mytilus galloprovincialis* dentro de la región del Biobío (CHILE), basado en las secuencias de mtDNA del gen COI **67**

Fig. 20. Gráfico de distribución mismatch por localidad para *Mytilus galloprovincialis* dentro de la región del Biobío (CHILE), basado en las secuencias de mtDNA del gen COI **68**

Fig. 21. Gráfico de distribución mismatch de haplotipos para las localidades muestreadas donde habita *Mytilus galloprovincialis* dentro de la región del Biobío (CHILE), basado en las secuencias de mtDNA del locus 16S **69**

Fig. 22. Gráfico de distribución mismatch por localidad para *Mytilus galloprovincialis* dentro de la región del Biobío (CHILE), basado en las secuencias de mtDNA del 16S..... **70**

Fig. 23. Red de haplotipos para el gen mitocondrial COI obtenido mediante el método Median joining..... **71**

Fig. 24. Red filogenética entre los choritos de la especies *Mytilus galloprovincialis* que habitan la región del Biobio. Basado en los datos del gen COI **72**

Fig. 25. Red de haplotipos para el locus 16S obtenido mediante el método median joining. Los colores muestran los haplotipos encontrados en cada localidad **73**

Fig. 26. Red filogenética entre los choritos de la especies *Mytilus galloprovincialis* que habitan la región del Biobio. Basado en los datos del gen 16S **74**

Fig.27. Matriz FODA: Impacto sobre la biodiversidad **75**

Fig. 28. Matriz FODA: Desde el punto de vista Productivo de *Mytilus chilensis* **76**

Fig. 29. Las 100 peores especies invasoras del mundo. From Global Invasive Species Database (isss.org). (se incluye en invertebrados acuáticos al "Mediterranean mussel" *Mytilus galloprovincialis*) **87**

Fig. 30. Mapa de distribución de *Mytilus galloprovincialis* (adaptado de GISD & Paiva, 2014). En verde las áreas que representan el rango nativo de la especie, en rojo las áreas en que se ha confirmado su invasión y en Amarillo las áreas que representan posible extensión del rango nativo **88**

Fig. 31. Resultados del crecimiento potencial de acuerdo a la temperatura de exposición para *M. trossulus*, *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. Extraído y adaptado de Fly & Hilbish (2013) **94**

Fig. 32. Temperaturas superficiales en verano e invierno a lo largo de la costa chilena. (Garcés, J. 2016) comunicación personal **95**

Índice de Tablas

Tabla 1. Sitios de muestreo, coordenadas geográficas, tipo de ambiente del que se extrajeron animales, fechas de los muestreos y número de individuos muestreados. *****Localidades donde no se encontraron mejillones del género *Mytilus* **25**

Tabla 2. Resumen de los marcadores utilizados en la ejecución del objetivo 1 ..... **27**

Tabla 3. Marcadores utilizados en el desarrollo el objetivo 2 ..... **33**

Tabla 4. Marcadores utilizados en la ejecución del objetivo 3 (análisis filogeográfico). Las condiciones de la PCR, fueron descritos anteriormente **37**

Tabla 5. Localidades utilizadas para el análisis filogeográfico **37**

Tabla 6. Posición variable de los haplotipos de la secuencia del gen mtDNA-COI para las especies del complejo *Mytilus edulis* **47**

Tabla 7. Posición variable de los haplotipos de la secuencia del gen mtDNA-16S para las especies del complejo *Mytilus edulis* **48**

Tabla 8. Resultados de los eventos de hibridación en las localidades analizadas. Entre paréntesis se representa el porcentaje de híbrido. Me = *M. edulis*; Mg = *M. galloprovincialis*; Mt = *M. trossulus*; Mc = *M. chilensis* **51**

Tabla 9. Índices de diversidad y test de neutralidad para *Mytilus chilensis* a lo largo de Chile (basado en los datos de COI; 676 sitios). n = Número de individuos analizados; K = Número de haplotipos; S = Sitios polimórficos; H = diversidad haplotípica; Π = número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias; π = diversidad nucleotídica; Tajima'sD = test de Tajima D; Fu's FS = Test de Fu FS **52**

Tabla 10. Índices de diversidad y test de neutralidad para *Mytilus chilensis* a lo largo de Chile (basado en los datos de 16SI; 470 sitios). n = Número de individuos analizados; K = Número de haplotipos; S = Sitios polimórficos; H = diversidad haplotípica; Π =

número promedio de diferencias nucleotídica entre pares de secuencias; π = diversidad nucleotídica; Tajima'sD = test de Tajima D; Fu's FS = Test de Fu FS **53**

Tabla 11. Índices de diversidad y test de neutralidad para *Mytilus galloprovincialis* en localidades de la región del Biobío COI (640 sitios) **64**

Tabla 12. Índices de diversidad y test de neutralidad para *Mytilus galloprovincialis* en localidades de la región del Biobío 16S (459 sitios) **64**

Índice de Anexos

Anexo 01. Autorización de pesca de investigación.....**123**

Anexo 02. Imagen del procedimiento de PCR, frente a un termociclador.....**124**

Anexo 03. Carga de las muestras en el gel de agarosa (2%) inmerso en buffer TBE (0,5X) en cámara de electroforesis.....**125**

Anexo 04. ITS: Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica el producto de PCR del locus nuclear ITS. Ejemplares de **(1)** Buque Quemado, Magallanes; **(2)** Cornwell, Reino Unido, **(3)** Galicia, España, **(4)** Lota, Chile, **(5)** Puerto Williams, Chile, **(6)** Muelle Loreto, Magallanes Chile, **(7)** Bras d'Or Lake, Canada, **(8)** Muelle Loreto, Magallanes Chile, **(9)** Bras d'Or Lake, Canada). (-) Control negativo. El amplicón tiene un tamaño de 800 pb.....**126**

Anexo 05. 16S: Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica el producto de PCR del locus mitocondrial 16S. **(1)** Metri; **(2)** Lota **(3)** San Gregorio, **(4)** Lota, **(5)** Puerto Cisne, **(6)** Puerto Williams, **(7)** Porvenir, **(8)** Hibrido Me/Mg (Muelle Loreto, Magallanes Chile), **(9)** Huildad, Chiloé, **(10)** Chaihuin. para muestras de *Mytilus* spp, el cual otorga un amplicón de 537 pb. Marcador de peso molecular (100pb).(-) Control negativo.....**127**

Anexo 06. RFLP 16S: Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica los patrones de RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) después de la digestión con: *Eco*RV, *Nhe*I y *Spe*I (primer 16sAR/16sBR). *M.chilensis* (fragmentos de 342 pb y 167 pb), *M. galloprovincialis* (fragmentos de 342 pb y 195 pb), híbrido *M.edulis*/*M.chilensis* (fragmentos de 342, 85, 82 y 28 pb). Los fragmentos bajo los 100 pb son difíciles de visualizar, sin embargo, esto no afecta la caracterización, tal como lo indica el trabajo original (Westfall et al. 2010). **(1)** Mc (Metri, Chile), **(2)** Mg (Galicia, España), **(3)** Mc (San Gregorio, Magallanes Chile), **(4)** Mc (Lota, Chile), **(5)** Mg (Lota, Chile), **(6)** Mc (San Gregorio, Magallanaes Chile). (-) Control negativo.....**128**

Anexo 07. **COIXba:** Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica el producto de PCR del locus mitocondrial COIXba para muestras de *Mytilus* spp. El amplicón resultante es de 233 pb para *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*..... **129**

Anexo 08. COIXba. Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica los patrones de RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) después de la digestión con: *XbaI* (primer COIXba). **(1)** Mc (Teupa, Chiloé), **(2)** Mc (Chaihuin), **(3)** Mg (Galicia, España), **(4)** Mc (Rilan, Chiloé)..... **130**

Anexo 09. 18S. Imagen de una sección de un cromatograma del resultado de la secuenciación de locus nuclear 18S para un ejemplar *Mytilus* de Chiloé, Chile. (A) muestra un individuo heterocigoto (C/T). (B) muestra el reverso complementario (G/A)..... **131**

Anexo 10. Imagen de Archivo Nexus alineado. Se muestra una sección de la matriz del gen COI para muestras de *Mytilus* provenientes de la localidades muestreadas en Chile. Matriz preliminar para los análisis filogenéticos y de delimitación de especies..... **132**

Anexo 11. Especies de mejillones que se lograron identificar con las técnicas moleculares utilizadas **133**

Anexo 12. Otros mitílidos que habitan en la costa chilena. La barra corresponde a 1 cm **134**

1. OBJETIVOS

1.1. *Objetivo General*

Identificar y caracterizar genéticamente las distintas especies que componen el denominado complejo *Mytilus* a lo largo de su actual distribución geográfica en la costa de Chile.

1.2. *Objetivos Específicos*

1) Identificar las especies del genero *Mytilus* en Chile.
2) Determinar posibles eventos de hibridación entre las especies.
3) Establecer la distribución espacial de la diversidad genética de las distintas especies mediante un análisis filogeográfico.
4) Realizar Análisis de Riesgo desde el punto de vista productivo y de la biodiversidad, considerando la factibilidad de realizar programas de repoblamiento y cultivo en zonas geográficas no utilizadas actualmente.

2. ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE

Las especies del género *Mytilus* son importantes tanto en términos ecológicos como económicos y por lo mismo han sido extensamente estudiados a nivel global. Sin embargo, el estado taxonómico del denominado complejo *Mytilus edulis* (las especies = *M. edulis*, *M. trossulus* y *M. galloprovincialis*) ha sido controversial principalmente los animales que habitan el hemisferio sur (MacDonald et al. 1991). A finales del siglo XIX se describio una especie diferente de mejillón que solo habitaba la costa de Chile a la que se le denomina vernacularmente "chorito" o "quilmahue", pero se clasificó como *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854). En la industria mitilicultora a estos animales se le conoce como el mejillón chileno (código taxonómico 3161000103 - FAO). Este mitílido nativo ha mostrado un incremento sostenido en su producción, desde 1993 con 3.864 t a 238.088 t el año 2014 (Sernapesca 2014). La contribución de la producción de mitílidos al total de la producción acuicola en Chile, incrementó de 6,1% el 2001 a 31,6 % el 2012, mientras que la producción de *Mytilus chilensis* correspondió al 56% del total de la producción de moluscos en Chile (Sernapesca, 2014). Por lo tanto es una especie, dentro de la acuicultura chilena, de alta importancia económica y social, convirtiéndose asi, en la única especie nativa marina con importantes volúmenes de producción.

El nivel taxonómico de *Mytilus chilensis* (mejillón chileno) ha sido motivo de trabajos científicos por más de 80 años (Lamy 1936; McDonald et al. 1991; Koehn 1991; Toro 1998a, Daguin y Borsa, 2000, Cárcamo et al. 2005, Toro et al. 2005, Martinez-Lange et al. 2005, Gerard et al. 2008, Westfall et al. 2010, Ougajjou et al. 2011, Borsa et al. 2012, Oyarzún et al. 2014, Astorga et al. 2015, Oyarzún et al. 2016a, Gaitán-Espítia et al. 2016). Sin embargo, en la literatura científica aún no se llega a un consenso respecto al estado taxonómico del mejillón

chileno. Bajo un contexto comercial la correcta clasificación taxonómica de las especies cobra relevancia en el área de la producción de alimentos (e.g. acuicultura) ya que esta información es importante para proteger los derechos del consumidor mediante la trazabilidad de los alimentos, y con ello se pueden controlar el movimiento de especies en el marcado así como la diferenciación de precios de acuerdo a su denominación de origen (i.e. European Normative, Regulation (CE) Nº 104/2000 and Nº 2065/2001 – Muehlbauer et al. 2014). Particularmente la clasificación taxonómica del mejillón chileno ha sido de mayor interés para los científicos y recientemente para las autoridades marinas chilenas. No obstante, debido a temporadas de baja captación de semillas (larvas) en algunos centros (e.g. sector fiordo de reloncaví 2011-2012 – mundo acuícola), la Subsecretaria de Pesca y Acuicultura recibio solicitudes para traslado de juveniles desde una Región a otra. Esta situación dio cuenta de que existía un alto desconocimiento respecto a las especies de mejillones que habitan Chile y a su distribución. No obstante, existen publicaciones científicas que han estudiado el estado taxonómico del mejillón chileno. Martínez-Lange et al. (2005) validaron la especie *Mytilus chilensis* utilizando DNAs satélite. Santaclara et al. (2006) tambien reconoce al mejillón chileno como una especie diferente y propone un método molecular para identificarlo. Resultados similares fueron reportados por Ougajjou et al. (2011) mediante la utilización de nueve microsatélites. Más recientemente Oyarzún et al. (2014), bajo el concepto biológico de especie, reportaron que las diferencias en la ultraestructura espermática entre las especies del complejo *Mytilus edulis* entregan información suficiente para validar la especie chilena. Por otro lado, hay algunos trabajos que indican lo contrario. Los franceses, Borsa et al. (2012), en una revisión publicada en la revista *Comptes Rendus Biologies*, sugieren que la especie chilena debería clasificarse como *Mytilus edulis platensis*, es decir una subespecie de *Mytilus edulis*, la cual se reconoce

como endémica del hemisferio norte. De la misma forma, Astorga et al. (2015) proponen dos clasificaciones: la primera indicaria que las especies que habitan America del sur corresponderian a *Mytilus planulatus,* y la segunda seria adoptar el nombre científico *Mytilus platensis*, como señalan Borsa et al. (2012). Hasta aca ya existe una notoria contradicción en terminos taxonómicos. No obtante, un grupo neozelandes, Westfall et al. (2010), llegan a la conclusión de que el mejillón chileno corresponderia a un linaje sur de la especie *Mytilus galloprovincialis* proveniente del mar mediterraneo. Además, desarrollan un marcador molecular mitocondrial (basado en la sección 16S) para identificarlas e indican que esta especie también habita en Nueva Zelanda, sur de Australia y Tasmania. Sin embargo, ninguno de los trabajos antes mencionados realiza algun estudio de delimitación de especie.

Entre las especies de genero *Mytilus*, la morfologia de la valva no presenta grandes diferencias morfológicas a nivel específico (Toro 1998a, Oyarzún et al. 2014b, Illesca 2015), es decir no es posible diferenciar taxativamente las especies de acuerdo a la forma y/o coloración de la valva ya que este carácter es muy plástico. Es por ello que se han desarrollado diferentes marcadores moleculares que han sido muy útiles para determinar las especies. Es así que se han publicado diferentes ensayos RFLP y partidores diagnóstico de identificación (Côrte-Real et al. 1994; Inoue et al., 1995; Ohresser et al 1997; Toro, 1998b; Comesaña et al. 1998; Daguin et al. 2001; Rego et al. 2002; Bendezu et al. 2005; Santaclara et al. 2006; Fernández-Taje et al, 2011; Ouagajjou et al. 2011; Westfall et al. 2010; Lasota et al. 2013). Toro y Oyarzún (2014), probaron los marcadores más utilizados en la literatura (Me, EFbis, mac-1, RFLP 16S, RFLP COIXba, RFLP Myti), con muestras de ejemplares de Chile provenientes de 36 localidades abarcando aproximadamente 3000 km de costa y concluyeron que para determinar las especies que habitan la costa chilena, se debe aplicar tanto marcadores nucleares (como Me15/16) como

mitocondriales (como el ensayo RFLP COIXba) a los ejemplares en cuestión. Además, indican que los marcadores EFbis y mac-1 no son resolutivos para identificar las especies del hemisferio sur (Buchner, 2016). No obstante, aunque han sido de ayuda los marcadores moleculares, no han solucionado el problema de fondo que es la delimitación de las especies dentro del complejo *Mytilus edulis*. Quizás la mayor problemática ha sido que estas especies hibridizan lo que dificulta los análisis, pero también se han realizado muestreos que llevan a mayor confusión, principalmente los realizados por investigadores extranjeros; lo cual ha causado que los resultados sean confusos acerca de la distribución de las especies identificadas. Por ejemplo, en el trabajo de McDonald et al. (1991) se señala que las muestras provenientes de Chile fueron extraídas de Chiloé y Yaldad, tomadas erróneamente en cuenta como dos localidades distintas. En el trabajo de Borsa et al. (2012) también realizan esta distinción considerando a Chiloé como una localidad diferente a Ancud y Quellón. Por tanto, la precisión de algunas de estas investigaciones no ha ayudado al entendimiento biogeográfico del grupo.

Una característica común de los mitílidos es su prolongada vida larval pelágica (30 a 45 días), lo que les otorga alta capacidad de dispersión (flujo génico) y la posibilidad de propagarse tanto de forma natural como antropogénica (a traves de aguas de lastre en los barcos) (Gosling 1992; Toro et al. 2004a). Por lo tanto es importante un monitoreo en los sectores de alto transito marítimo. En el 2005 se detectó por primera vez en la costa de la Región del Bío Bío a la especie exótica, *Mytilus galloprovincialis* o conocido también como mejillón del Mediterraneo o mejillón Gallego (Toro et al. 2005). Tarifeño et al. (2012) indican que en primera instancia a esta especie se le identificaba erróneamente como *Mytilus chilensis*. Por tanto, se desconoce hace cuanto tiempo *M. galloprovincialis* vive en la costa de la Región del Bío Bío. Luego Toro y Oyarzún (2014) confirman la presencia de este mejillón mediante la

utilización de marcadores que no habían sido utilizados en los trabajos previos (Myti y COIXba). Asi se confirmó la presencia de *Mytilus galloprovincialis* en las localidades de Coliumo, Dichato, Isla Quiriquinas y Tumbes. De todos modos su presencia reviste cierta importancia dado a que esta especie es reconocida como un importante invasor marino (McQuaid y Phillips, 2000, Lowe et al. 2000; Bownes y McQuaid 2006; Braby y Somero, 2006; Mead et al. 2011; GIDS 2012). Existen claros ejemplos de los efectos de la introducción *M. galloprovincialis* en California (Braby y Somero 2006) y Sudafrica (McQuaid y Phillips 2000, Robinson et al. 2005; Zardi et al. 2008); en ambos casos ha existido un desplazamiento de las especies nativas y un cambio en la estructura comunitaria que habita el submareal superior. A la fecha han existido reportes de *Mytilus galloprovincialis* en la Bahía de Tongoy (IV Región) (Tarifeño et al. 2012), Bahía de Concepción (VIII Región) (Toro et al. 2005; Westfall y Gardner 2010; Tarifeño et al. 2012; Toro y Oyarzún 2014) y Región de Los Lagos y Magallanes (X y XII Regiones) (Toro et al. 2005; Borsa et al. 2012; Oyarzún et al. 2016a). También se ha reportado la presencia de otros mitilidos en Chile. *Mytilus edulis* ha sido descrita en el mar interior de Chiloé (Borsa et al. 2012) y en el Estrecho de Magallanes (McDonald et al. 1991; Toro y Oyarzún 2014; Oyarzún et al. 2016). Tambien, se han encontrado alelos de *M. trossulus* en la Región de los Lagos (Fernández-Tajes et al. 2011; Larraín et al. 2012; Toro y Oyarzún 2014) y en el estrecho de Magallanes (Toro y Oyarzún 2014; Oyarzún et al. 2016a), aunque a la fecha no existe evidencia de la taxa pura.

Estas especies tienen la capacidad de hibridizar cuando habitan en zonas de contacto (Bates y Innes 1995; Comesaña et al. 1998; Toro et al. 2004b; Elliott et al. 2008; Brannock et al. 2009; Brooks y Farmen 2013, Oyarzún et al. 2016a). De hecho, recientemente se ha descrito una zona hibrida de ~100 km en el Estrecho de Magallanes (XII Región) (Oyarzún et al. 2016).

Al parecer existe evidencia de una mayor adecuación biológica (fitness) en híbridos resultantes del cruzamiento entre *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*, probablemente vinculado al vigor híbrido (Toro et al. 2012; Oyarzún et al. 2013; Valenzuela et al. 2016). Aunque se desconocen varios aspectos relacionados con este fenómeno, como por ejemplo, ¿que efectos ecologicos podría tener una zona híbrida? o ¿cuales serian los efectos/consecuencia que podrían conllevar los híbridos de *Mytilus* en la industria mitilicultura nacional? En el análisis FODA se profundizan están interrogantes. No obstante, es importante mantener un monitoreo de estos sectores, tal como lo indican Toro y Oyarzún (2014).

Otro aspecto importante que se debe considerar para un apropiado manejo del recurso *Mytilus*, es el conocimiento respecto a la genética poblacional de estos animales. Toro et al. (2004a y 2006a) estudian las diferencias genéticas entre los bancos naturales mediante la utilización de alozimas (*Pgm*, *Gpi*, *Icd*, *Me*, *Gsr*, *Lap* y *Pep*) y RAPDs, muestreado ocho localidades en un rango de 1800 km de costa (Arauco, Queule, Valdivia, Calbuco, Ancud, Yaldad, Pto Marin Balmaceda y Punta Arenas). Los resultados indicaron una baja diferenciación genética entre las ocho localidades analizadas. Además, se descubrieron altos niveles de flujo génico lo que sugiere que estas localidades actúan como una metapoblación con un alto grado de cruzamiento. No obstante, los ejemplares de choritos que habitan el Estrecho de Magallanes (Punta Arenas) fueron genéticamente diferentes a las otras poblaciones. Posteriormente Larraín et al. (2015) realizaron un estudio de diversidad genética usando nueve microsatelites, para lo cual muestrearon seis lugares provenientes de tres zonas: (1) zona de Reloncaví (Quillaipe, Pichicolo, Caleta La Arena, Canutillar); (2) zona de Chiloé (Canal Coldita) y la (3) zona de Magallanes (Isla Peel). De acuerdo a lo reportado por lo autores, en las localidades muestreadas en la zona de Reloncaví y Chiloé, las muestras se extrajeron de los

centros de captación de semillas, en cambio en la zona Magallanes la muestra fue colectadas de un banco natural. Larraín et al. (2015) indicaron que a pesar de la gran distancia entre los sitios de muestreo la diferenciación genética entre ellos fué baja. El análisis bayesiano realizado concluyó que la estructura poblacional más probable fue de dos grupos, mientras que el análisis de agrupamiento no paramétrico identifico entre dos y cuatro grupos. No obstante, ambos análisis mostraron un alto nivel de mezcla dentro de los grupos. Luego Araneda et al. (2016) mediante el uso de 1240 SNPs, en las mismas localidades utilizadas en el trabajo anterior (i.e. Larrain et al. 2015), encontraron que los animales que habitan la localidad muestreada en la patogonia (Isla Peel) fue la más distinta en términos genéticos, precisamente estas animales corresponden a los extraídos de banco natural. Tambien indican una divergencia adaptativa entre las muestras de Reloncaví y Chiloé provientes de centro de captación. Por otro lado, Valenzuela (2016) en su tesis doctoral comparó animales de diferentes centros de engorda dentro de la Región de los Lagos. También encontró poca divergencia entre las diferentes localidades analizadas. Esta alta similitud genética probablemente está dada por el alto traslado de semillas entre las localidades de la costa del interior de Chiloé y el fiordo de Reloncaví. Al parecer los resultados entre los distintos trabajos publicados han sido consistentes. No obstante, en el presente proyecto se realizaron análisis respecto a la genética poblacional de bancos naturales, tanto para la especie *Mytilus chilensis* como *Mytilus galloprovincialis*. Principalmente en esta última especie no existen estudios previos en Chile.

3. METODOLOGÍA DE TRABAJO

3.1. Metodología para identificar las especies del género *Mytilus* en Chile

3.1.1 Muestreos: Se colectaron muestras de ejemplares del género *Mytilus* en forma aleatoria en 30 de las 38 localidades de la costa de Chile (ver detalle en la Tabla 1). Los animales fueron extraídos del submareal e inmediatamente fueron tratados, sexándo cada animal mediante un frotis gonadal y visualización de las células germinales en un microscopio óptico. En seguida se extrajo una muestra del tejido del borde del manto para extraer el ADN, muestra que se colocó en etanol 95%.

3.1.2 Extracción de ADN: De cada animal (30 animales por localidad) se disectó un trozo de aproximadamente 100 mg (~5 mm^2) de tejido del manto que se fijó en etanol al 95% y fue almacenado a 4ºC para su posterior análisis. Para la extracción de ADN se utilizó el kit Genomic DNA Mini Kit (Tissue) de marca Geneaid® con el que se obtuvo un ADN libre de impurezas. Este ADN fue almacenado a -20°C hasta el momento de los análisis. El ADN extraído fue utilizado para realizar los análisis de RFLP y de secuenciación.

Tabla 1. Sitios de muestreo, coordenadas geográficas, tipo de ambiente del que se extrajeron animales, fechas de los muestreos y número de individuos muestreados. ***** Localidades donde no se encontraron mejillones del género *Mytilus*.

REGIONES	N	Localidades	Coordenadas	Tipo ambiente	FECHAS	N° ind
IV Región	1	Tongoy	30°15'S ;71°30'O	Cultivo	07/02/2016	*
VIII Región	2	Pelluhué	35°52'S ;72°40'O	natural	25/01/2016	*
	3	Cobquecura	36°04'S ;72°48'O	natural	25/01/2016	*
	4	Colmuyao	36°10'S ;72°49'O	natural	25/01/2016	*
	5	Pudal	36°29'S ;72°54'O	natural	26/01/2016	*
	6	Dichato	36°32'S ;72°56'O	natural	26/01/2016	30
	7	Coliumo	36°37'S ;72°57'O	natural	26/01/2016	50
	8	Tumbes	36°38'S ;73°05'O	natural	26/01/2016	30
	9	Isla Quiriquinas	36°38'S ;73°03'O	natural	27/01/2016	30
	10	Lota	37°05'S ;73°10'O	natural	26/02/2016	50
	11	Isla Mocha	38°25'S ;73°54'O	natural	14/03/2016	*
IX Región	12	Bahía Llico	37°11'S; 73°33'O	natural	05/12/2015	50
	13	Caleta Ranguil	37°32'S; 73°36'O	natural	05/12/2015	*
	14	Tubul	37°43'S; 73°39'O	natural	05/12/2015	30
	15	Tirua	38°20'S; 73°30'O	natural	05/12/2015	*
XIV Región	16	Chaihuin	39°56'S; 73°35´O	natural	22/11/2015	30
	17	Rio Tornagaleones	39°53'S; 73°22´O	natural	22/11/2015	30
X Región	18	Quillaipe	41°29'S ; 72°18´O	natural	26/11/2015	30
	19	Metri	41°35'S ; 72°42´O	natural	26/11/2015	30
	20	Bahía Ilque	41°37'S ; 73°04´O	centro	26/11/2015	30
	21	Isla Poluqui (Calbuco)	41°48'S ; 73°05´O	centro	27/11/2015	30
	22	Rilan (Chiloe)	42°31'S ; 73°37´O	centro	28/11/2015	30
	23	La planchada (Chiloé)	42°30'S ; 73°27´O	centro	28/11/2015	30
	24	Teupa (Chiloe)	42°40'S ; 73°40´O	centro	28/11/2015	30
	25	Maullín	41°37'S ; 73°35´O	natural	27/11/2015	30
	26	Huildad (Chiloé)	42°29'S ; 73°46´O	natural	28/11/2015	30
	27	Pichicolo	42°00'S ; 72°35´O	natural	30/11/2015	30
XI Región	28	Puerto Raul Marin Balmaceda	43°46'S ; 72°56´O	natural	15/02/2016	30
	29	Puerto Cisne	44°44'S ; 72°41´O	natural	22/02/2016	30
	30	Puerto Aguirre	45°09'S ; 73°31´O	natural	26/02/2016	30
XII Región	31	Bahia Fanny	52°34'S ; 70°04´O	natural	26/01/2016	30
	32	Buque Quemado	52°19S ; 69°29´O	natural	26/01/2016	30
	33	Muelle Loreto (Pta Arenas)	53°09S ; 70°54´O	natural	27/01/2016	30
	34	Caleta Pescadores	53°21S ; 70°57´O	natural	26/01/2016	30
	35	Puerto Natales	51°43S ; 72°29´O	natural	28/01/2016	30
	36	Porvenir	53°17S ; 70°22´O	natural	29/01/2016	30
	37	Punta delgada	52°29S ; 69°32´O	natural	29/01/2016	30
	38	Puerto Williams	54°56S ; 67°36' O	natural	22/01/2016	30
TOTAL DE INDIVIDUOS A ANALIZAR						**960**

3.1.3 Amplificación: Se amplificaron los loci descritos en la tabla 2. La amplificación se realizó en 25 µL de reacción que contuvo 2.5 µL 10x buffer (50 mMKCl, 10 mM Tris–HCl, pH 8.0), 1.0 µLl de 50 mM $MgCl_2$, 200 mM dNTPs, 0.5 µL de cada primer (10 pg/µl), 1 U Taq (Invitrogen), 17.5 µL de agua ultrapura más 20 ng de DNA templado. Todas las PCR (reaccion en cadena de la polimerasa) fueron registradas en geles de agarosa al 2% y teñidos con SYBR® Safe DNA y fotografiado bajo un transiluminador de luz azul (Invitrogen^{TM}). Los detalles de la amplificación de los loci secuenciados fueron los siguientes:

1) ***ITS*:** Los fragmentos amplificados de ITS (*Internal Transcriber Spacer*) fueron diseñados para el genero *Mytilus* por Heath et al. (1995). Los partidores utilizados fueron ITS1 5´- GTT TCC GTA GGT GAA CCT G - 3´ y ITS2 5´- CTC GTC TGA TCT GAG GTC G - 3´. Las condiciones óptimas para PCR publicadas en el protocolo de Heath et al. (1995) son: 94°C, 5 min; (94°C, 20 s; 59°C, 20 s; 72°C, 2m) x 30; 72°C, 10 min; 4°C. La concentración de $MgCl_2$ fue de 1.75 mM. El amplicón de este locus fue purificado y secuenciado.

2) ***Citocromo C Oxidasa Subunidad I* (COI):** Los partidores utilizados fueron LCO-1490 5´- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3´ y HCO 2198 5´- TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3´. Las condiciones óptimas para PCR publicadas en el protocolo de Folmer et al. (1994) son: 94°C, 4 min; (94°C, 30 s; 56°C, 30 s; 72°C, 90 s) x 40; 72°C, 4 min; 4°C. La concentración de $MgCl_2$ fue de 1.75 mM. El amplicón de este locus fue purificado y secuenciado.

3) ***16S:*** Se utilizaron los partidores 16Sar-L 5´-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3´ y 16SbrH 5´- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACGT - 3´, con el que se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 600 pb. La reacción se realizó en 25 µL que

contuvieron 20 ng de ADN genómico, 10 pmol de cada primer, 10 nmol de dNTP, 1X buffer de reacción, 1.5 mM de $MgCl_2$ y 1 U Taq polimerasa (e.i. ©INVITROGEN). Las condiciones de amplificación fueron: 95°C, 3 min; (95°C, 30 s; 52°C, 30 s; 72°C, 45 s) x 30; 72°C, 3 min; 4°C. El amplicon de este locus fue purificado y secuenciado.

4) ***18S rDNA:*** Se utilizaron los partidores 22F 5´- WAY CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3´ y 560R 5´- GCG GCT GCT GGC ACC AGA CTT G- 3´, con el que se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 600 pb. Por su parte, los partidores 1016F 5´- CGAAGACGATCAGATACCG-3´ y 1789F 5´- GATCCTTCYGCAGGTTCACCTAC -3, generaron un producto de amplificación de aproximadamente 650 pb. La reacción se realizó en 25 µL que contuvieron 20 ng de ADN genómico, 10 pmol de cada primer, 10 nmol de dNTP, 1X buffer de reacción, 1.5 mM de $MgCl_2$ y 1 U de Taq polimerasa (e.i. ©INVITROGEN). Las condiciones de amplificación fueron: 95°C, 3 min; (95°C, 30 s; 52°C, 30 s; 72°C, 45 s) x 30; 72°C, 3 min; 4°C. El amplicón de este locus fue purificado y secuenciado.

Tabla 2. Resumen de los marcadores utilizados en la ejecución del objetivo 1.

Marcador (primer)	Posición del locus	Referencia
COI	mitocondrial	Folmer et al. (1994)
16S	mitocondrial	Palumbi (1996)
Internal transcriber spacer (ITS)	nuclear	Heath et al. (1995)
18S rDNA	nuclear	Distel (2000)
Me15/16	nuclear	Inoue et al. (1995)
Ensayo RFLP, partidor 16S	mitocondrial	Westfall et al. (2010)
Ensayo RFLP, partidor COIXba	mitocondrial	Fernández-Tajes et al. (2011)

3.1.4. Secuenciación y alineamiento: Los productos de la amplificación de los loci descritos anteriormente fueron purificados y secuenciados en la empresa Macrogen (Seul, Corea del

Sur). Se secuenció tanto la hebra río arriba como la hebra río abajo para corroborar las secuencia nucleotídicas. Las secuencias fueron editadas con el programa Proseq v.2.91 (Filatov 2002). A partir de este análisis se obtuvo una secuencia consenso para cada animal, la que se utilizó para los análisis. La matrices fueron alineadas con el software MAFFT v.7 (Katoh y Standley, 2013) bajo el método interactivo de alineamiento global por pares (G-INS-i) (Katoh et al. 2005). Para los analisis de delimitacion de especie se realizó un análisis previo que fue colapsar lo haplotipos mediante el software Collapse v1.2 (Posada, 2006).

3.1.5. Análsis de secuencias de ejemplares de *Mytilus* muestreados fuera de la costa Chilena: Para realizar un análisis robusto es necesario utilizar datos de secuencias de *Mytilus* de otras áreas del mundo. Para ello, se utilizó exclusivamente para este proyecto, nuestro banco de muestras de mitilidos. Para la finalidad de este objetivo se utilizaron secuencias de *Mytilus* de Nueva Zelanda, Argentina, Reino Unido, España y Canadá. No obstante, tambien se descargaron secuencias que han sido publicadas en revistas cientificas y que se encuentran a disposición pública en la plataforma NCBI GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

3.1.6. Determinación de las especies de *Mytilus* presentes en Chile mediante los test diagnóstico: Una vez obtenida las muestras se procedió a determinar las especies utilizando las pruebas diagnóstico de identificacion descritas en la literatura, tales como: el polimorfimo del gen de la proteína del pie (Me15/16) y los ensayos RFLP (i) COIXba y (ii)16S. Con estos marcadores se han identificado las especies de *Mytilus* en todas las costas donde habitan estos moluscos (i.e. Brannock y Hilbish 2010; Westfall y Gardner 2013; Laurenço et al. 2015, Gerard et al. 2015, Oyarzún et al. 2016). Los detalles de la amplificación de los marcadores antes mencionados se describen a continuación:

1) ***Me15/16*:** Los fragmentos amplificados del gen de la proteína adhesiva del pie, son especie-específico para identificar las especies *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* e híbridos (Inoue et al. 1995). Los partidores utilizados fueron Me15 5´-CCA GTA TAC AAA CCT GTG AAGA - 3´ y Me16 5´- TGT TGT CTT AAT AGG TTT GTA AGA - 3´. Las condiciones óptimas para PCR publicadas en el protocolo de Inoue et al. (1995) son: 94°C, 4 min; (94°C, 30 s; 56°C, 30 s; 72°C, 90 s) x 40; 72°C, 4 min; 4°C. La concentración de $MgCl_2$ fue de 1.75 mM. Aunque este marcador no discrimina patrones de bandas entre individuos de las especies *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*, es muy efectivo para determinar si en las poblaciones chilenas habita *M. edulis, M. trossulus* o sus híbridos (Anexo 08).

2) ***COIXba RFLP-PCR*:** Se utilizaron los partidores COIXbaF 5´-CCG CCA TTG TCT GTA TAC CC-3´ y COIXbaR 5´-TAA TGC CCC CTC CTA AAA CC-3´ diseñados exclusivamente para la confirmación de *M. chilensis* (Fernández-Tajes et al. 2011). Principalmente realiza la diferencia entre las especies *M. galloprovincilias* y *M. chilensis*. Para el ensayo de RFLP se utilizó la enzima de restricción *Xba*I. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C, 5 min; (94°C, 30 s; 52°C, 30 s; 72°C, 60 s) x 35; 72°C, 5 min; 4°C. (Anexo 12,13).

3) ***16S RFLP-PCR*:** Westfall et al. (2010) desarrollaron este ensayo basado en el mitotipo de hembras del gen 16S rDNA, determinado por la secuencia 16S rDNA para diferenciar linajes (Hilbish et. al. 2000). Se utilizaron los partidores 16Sar-L 5´-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT-3´ y 16SbrH 5´- CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACGT - 3´, con los que se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 600 pb. La reacción se realizó en

15 µL que contuvieron 20 ng de ADN genómico, 10 pmol de cada primer, 10 nmol de dNTP, 1X bufer de reacción, 1.5 mM de $MgCl_2$ y 1 U Taq polimerasa (e.i. ©INVITROGEN). Las condiciones de amplificación fueron: 95°C, 3 min; (95°C, 30 s; 52°C, 30 s; 72°C, 45 s) x 30; 72°C, 3 min; 4°C. Luego se realizó en 20 µL la triple digestión con endonucleasas de restricción a 37°C por a lo menos 12 h. Cada reacción contuvo 10 U *Eco*RV 5 U *Nhe*I, 5 U *Spe*I, 1X buffer M, 100 mg BSA y 10 µL de producto PCR. Este ensayo RFLP distingue entre *M. galloprovincialis* del hemisferio Norte y del Sur. No obstante, *Mytilus galloprovincialis* del hemisferio sur corresponde a la determinación de *Mytilus chilensis* (Oyarzún et al. 2016). Con este ensayo se pueden identificar cuatro grupos taxonómicos: (1) *M. chilensis* (342, 167, 28 pb), (2) *M. galloprovincialis* del Hemisferio Norte "Mediterraneo" (342 y 195 pb), *M.galloprovincialis*/*M. edulis* del Hemisferio norte "Atlántico" (342, 85, 82, 28 pb). Con este ensayo también se puede identificar *M. trossulus* (370, 85, 82 pb). Los fragmentos de restricción cortados se visualizaron en geles de agarosa (2%) y teñidos con *syber safe* (©INVITROGEN). (Anexo 10,11).

3.1.7. Análisis bioinformático para la reconstrucción filogenética: en consideración de que no todos los genes pueden ser utilizados para la reconstrucción filogenética, previo al análisis, se exploró la señal filogenética utilizando el índice de saturación descrito por Xia et al. (2003) e implementado en el programa DAMBE (Xia 2013). Los resultados de este análisis indicaron que los locus seleccionados no se encuentran saturados, por tanto, pueden ser utilizados para los análisis filogenéticos. La reconstrucción filogenética se realizó utilizando los criterios de i) máxima verosimilitud (ML) e ii) inferencia Bayesiana (IB). Ya que ambas aproximaciones son probabilísticas, previamente fue necesario establecer de manera explicita el modelo de evolución nucleotídica más adecuado para cada set de datos. Para allo, primero

se seleccionó el mejor esquema de partición y el modelo de sustitución de nucleótidos utilizando el programa PartitionFinder v.1.1.0 (Lanfear et al. 2012) bajo el algoritmo *greedy*, usando el criterio de información bayesiana (BIC). Los modelos de sustitucion nucletídica obtenidos fueron TrN+I+G (modelo de Tamura-Nei; Tamura Nei, 1993), TVM+G (Modelo transversional; Posada, 2003) y TPMuf+I (Modelo de tres parámetros; Kimura, 1981) para COI, DNA16S y DNA18S respectivamente. Estos modelos fueron los utilizados en la reconstrucción filogenética que posteriormete se describe.

Para el análisis ML se utilizó el programa GARLI v.2.0 (Bazinet et al. 2014). El soporte estadístico para los nodos fue estimado por bootstrap no paramétrico (Felsenstein 1985) con 1000 pseudoréplicas mediante el programa PHYML v.3.0 (Anisimova y Gascuel, 2006; Guindon et al. 2010). Valores de bootstrap $\geq$ 70% se tomaron como buen apoyo estadístico para un clado que está presente en el árbol (Hillis y Bull, 1993). El análisis bayesiano (IB) se realizó en el programa MrBayes v.3.2 (Ronquist et al. 2012). Cada cadena de Markov se inició a partir de un árbol aleatorio con 1 x 10^7 generaciones. La fase estacionaria fue chequeada usando Tracer v.1.6. Todos los puntos muestreados antes de alcanzar la fase estacionaria (25%) fueron descartados como *burn-in* y los árboles restantes se combinaron para encontrar la probabilidad a posteriori de la filogenia. Los análisis se repitieron tres veces para confirmar que todos ellos convergen en el mismo resultado. Valores de probabilidad posterior $\geq$ 0,90 se tomaron como apoyo estadístico para un clado que está presente en el árbol (Huelsenbeck y Rannala 2004). Para todos los casos se usó *Choromytilus. chorus* como grupo externo.

3.1.8. Delimitación de especies: La reconstrucción filogenética no es suficiente para delimitar especies. En los últimos años se han propuesto nuevos métodos para la delimitación de las especies (por ejemplo, Pons et al. 2006; Knowles y Carstens 2007; Zhang et al. 2011; Jones et al. 2014; Yang y Rannala 2014). La incorporación de modelos coalescentes en estos métodos ha sido descrito como uno de los avances más significativos en sistemática biológica (Carstens y Dewey 2010; Harrington y Near 2012). Es por ello, nuestro análisis de delimitación de especies se basó en un enfoque coalescente. En primera instancia se utilizó el modelo General Mixed Yule Coalescent (GMYC) (Pons et al. 2006; Fujisawa y Barraclough 2013), Este modelo permite calcular múltiples umbrales de transición para cada linaje (Monaghan et al. 2009; Powell et al. 2011), lo que se traduce en un mayor poder estadístico. Para ello, los árboles ultramétricos de genes fueron reconstruidos bajo un modelo de reloj molecular relajado utilizando los programas BEAUti y BEAST v1.8 (Drummond y Rambaut 2007). Dos cadenas MCMC independientes se llevaron a cabo por 100 millones de generaciones y se tomaron muestras cada 1000. Los primeros 25.000 árboles (25%) de cada corrida fueron descartados (*burn in*). Luego se obtuvo el árbol de máxima credibilidad con el programa TreeAnnotator v1.8. Finalmente se utilizó el paquete SPLITS de R para estimar las especies putativas. No obstante, también se aplicó la versión bayesiana (bGMYC). Este último método tiene un mejor poder resolutivo, y además entrega estimadores de ajueste al modelo. Para ello se utilizó el paquete bGMYC (Reid y Carstens, 2012), en base a los últimos 100 árboles de la salida de BEAST.

También se aplicó el reciente método llamado PTP (Poisson Tree Processes) (Zhang et al. 2013), tanto para la versión de máxima verosimilitud como la bayesiana. Este modelo de delimitación especies se basa en un árbol filogenético enraizado. En PTP se modela

especiaciones o eventos de ramificación en términos de número de sustituciones. Para ello se utilizó un árbol de entrada filogenético estimado en MrBayes. Este método es recomendado para datos moleculares de copia única (por ejemplo, 16S, COI, 18S). Con el árbol de máxima credibilidad se delimitaron las especies de *Mytilus* a través del servidor http://species.h-its.org/ptp/.

3.2. Metodología para determinar posibles eventos de hibridación entre las especies

Para determinar eventos de hibridación entre las especies de *Mytilus* se han utilizado de forma exitosa los marcadores diagnóstico vinculado al ADN nuclear y mitocondrial. Con ayuda de estas herramienta se han encontrado exclusivas zonas híbridas en diferentes costas del mundo, tal como lo han reportado Brannock y Hilbish (2010) en Japón, Toro et al.(2004b) y Elliott et al. (2008) en América del Norte, Brook y Farmen (2013) en Noruega, Beaumont et al. (2008) en Escocia, Gosling et al 2008 en Irlanda, y Oyarzún et al. (2016) en el estrecho de Magallanes, Chile. Por lo tanto, en base a esta información publicada en la literatura científica se decidió utilizar los siguientes marcadores moleculares:

Tabla 3. Marcadores utilizados en el desarrollo el objetivo 2.

Marcador (primer)	Tipo de hibridacion que identifica	Referencia
Me15/16	*M. edulis/ M. galloprovincialis* *M. edulis/M. trossulus* *M.trossulus/M.galloprovincialis*	Inoue et al. (1995)
Ensayo RFLP COIXba	Híbrido/ *M. chilensis*	Fernández-Tajes et al. (2011)
Ensayo RFLP Me + Aci I	*M.chilensis/M.galloprovincialis*	Santaclara et al. (2006)

Los detalles de la amplificación de los marcadores antes mencionados se describen a continuación:

1) ***Me15/16*:** Los fragmentos amplificados del gen de la proteína adhesiva del pie, son especie-específico para identificar las especies *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* e híbridos (Inoue et al. 1995). Los partidores utilizados fueron Me15 5´-CCA GTA TAC AAA CCT GTG AAGA - 3´ y Me16 5´- TGT TGT CTT AAT AGG TTT GTA AGA - 3´. Las condiciones óptimas para PCR publicadas en el protocolo de Inoue et al. (1995) son: 94°C, 4 min; (94°C, 30 s; 56°C, 30 s; 72°C, 90 s) x 40; 72°C, 4 min; 4°C. La concentración de $MgCl_2$ fue de 1.75 mM. Aunque este marcador no discrimina patrones de bandas entre individuos de las especies *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*, es muy efectivo para determinar si en las poblaciones chilenas habita *M. edulis* o *M. trossulus* e híbridos.

2) ***COIXba RFLP-PCR*:** Se utilizaron los partidores COIXbaF 5´-CCG CCA TTG TCT GTA TAC CC-3´ y COIXbaR 5´-TAA TGC CCC CTC CTA AAA CC-3´ diseñados exclusivamente para la confirmación de *M. chilensis* (Fernández-Tajes et al. 2011). Este método diferencia entre las especies *M. galloprovincilias* y *M. chilensis*. Para el ensayo de RFLP se utilizó la enzima de restricción *Xba*I. Las condiciones de amplificación fueron: 95°C, 5 min; (94°C, 30 s; 52°C, 30 s; 72°C, 60 s) x 35; 72°C, 5 min; 4°C.

2) **Me15/16 *RFLP-PCR*:** se utilizaron los partidores Me15 5´-CCA GTA TAC AAA CCT GTG AAGA - 3´ y Me16 5´- TGT TGT CTT AAT AGG TTT GTA AGA - 3´. Las condiciones óptimas para PCR publicadas en el protocolo de Inoue et al. (1995) son: 94°C, 4 min; (94°C, 30 s; 56°C, 30 s; 72°C, 90 s) x 40; 72°C, 4 min; 4°C. Luego se realizó en 20 µL la digestión con la endonucleasa de restricción *Aci*I a 37°C por a lo menos 2 h (Santaclara et

al. 2006). Con este ensayo fue posible identificar individuos de la especie *M. galloprovincialis* (mejillón del mediterraneo), *M. chilensis* (mejillón chileno) e híbridos entre ambos taxones. La visualización de los RFLP se realizó en un gel de agarosa al 3%, en una corrida electroforética de 120 minutos.

3.3. Metodología para establecer la distribución espacial de la diversidad genética de las distintas especies mediante un análisis filogeográfico

3.3.1. Justificación de los marcadores utilizados: Para la realización de estudios filogeográficos en especies del complejo *Mytilus edulis* se ha demostrado que el genoma mitocondrial tiene una alta resolución para resolver la estructura filogeográfica y la historia demográfica (Cao et al. 2004; Smietanka et al. 2014). Por tanto, los marcadores mitocondriales han sido adecuados como herramientas para comprender la filogeografia de estos moluscos. Prueba de ello, han sido los numerosos estudios publicados donde se ha utilizado marcadores mitocondriales, por ejemplo en los animales que habitan Europa (Giantsis et al. 2014; Smietanka et al. 2014) y China (Li et al. 2013). Además, secciones del genoma mitocondrial han sido utilizadas exitosamente para comprender la filogeografia en otros moluscos marinos que habitan la costa chilena (i.e. Cárdenas et al. 2009, Guzmán et al. 2011, Brante et al. 2012). Es por ello, que se decidio utilizar los marcadores COI y 16S (Tabla 4).

Se realizaron análisis filogeográficos de acuerdo a las especies con mayor representatividad encontradas en la costa chilena. Por lo tanto, se confeccionaron dos análisis: uno para la especie *Mytilus chilensis* y otro para la especie *Mytilus galloprovincialis* (ver localidades en la Tabla 5).

Tabla 4. Marcadores utilizados en la ejecución del objetivo 3 (análisis filogeográfico). Las condiciones de la PCR, fueron descritos anteriormente.

Marcador (primer)	Tipo de marcador	Referencia
COI	Mitocondrial	Folmer et al. (1994)
16S	Mitocondrial	Palumbi (1996)

Tabla 5. Localidades utilizadas para el análisis filogeográfico.

Mytilus galloprovincialis	Región	coordenadas
(1) Isla Quiriquinas	**Biobío**	**36°38S ; 73°03´O**
(2) Lota	**Biobío**	**37°05S ; 73°10´O**
(3) Tubul	**Biobío**	**37°13S ; 73°26´O**
(4) Llico	**Biobío**	**37°11'S; 73°33'O**
Mytilus chilensis	**Región**	**coordenadas**
(1) Pto Saavedra	**Araucanía**	**38°46S ; 73°23´O**
(2) Chaihuin	**De los ríos**	**39°56S ; 73°35´O**
(3) Maullin	**De los lagos**	**41°37S ; 73°35´O**
(4) Quillaipe	**De los lagos**	**41°32S ; 72°44´O**
(5) Huildad	**De los lagos (Chiloé)**	**42°29S ; 73°46´O**
(6) Pto Cisne	**De Aysén**	**44°44S ; 72°41´O**
(7) Caleta Pescadores	**Magallanes**	**53°21S ; 70°57´O**
(8) Bahía Fanny	**Magallanes**	**53°05S ; 72°17´O**

3.3.2. Análisis bioinformático

3.3.2.1. Diversidad genética: para analizar la diversidad genética en cada localidad muestreada (Tabla 5), se estimaron los siguientes índices para cada locus: número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (K), diversidad haplotípica (H), número promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π) y diversidad nucleotídica (π). Para ello se utilizó el programa DnaSP v.5.10 (Librado & Rozas 2009).

3.3.2.2. Distribución espacial de la diversidad genética: para determinar la distribución de los haplotipos y evaluar linajes intra-específicos dentro de las especies de *Mytilus* presentes en Chile (las con mayor representatividad), se construyeron árboles genealógicos no enraizados conocidos como redes de haplotipos (Posada y Crandall, 2001). Las redes de haplotipos se calcularon mediante el método de median-joining (Bandelt et al 1999) en el programa Network v.5.0 (www.fluxus-engineering.com). El tamaño de cada círculo será proporcional al número de haplotipos contenidos en él, representado el círculo más pequeño, un haplotipo único. Adicionalmente para investigar las relaciones entre las poblaciones se construyeron redes filogenéticas en base a la distancia K2P con el algoritmo NeighborNet implementado en el programa SplitsTree v.4 (Hudson y Briant, 2006). Para ello se usó la matriz de datos que contiene el total de secuencias para cada especie analizada (*M. chilensis* y *M. galloprovincialis*). Se realizó un análisis por locus. Además, se utilizaron diferentes configuraciones para evaluar la solidez del análisis (por ejemplo, diferentes medidas de distancia y número de dimensiones). Para los análisis antes mencionados y como una forma de identificar las poblaciones dentro de la red de haplotipos, se conformaron grupos de acuerdo a las localidades.

3.3.2.3. Análisis demográfico: Para inferir los cambios demográficos en tiempo reciente se realizarón las pruebas de neutralidad de Tajima (1989) y Fu (1997) utilizando el programa DnaSP v.5.10 (Librado & Rozas 2009). La significancia estadística del Fs de Fu se evaluó por una simulación de coalescencia con 1000 permutaciones. También se realizó un análisis de distribución de desajuste (*mismatch distribution*). Este análisis permite inferir los cambios demográficos recientes a partir de la distribución de las frecuencias genéticas. Por tanto, cuando existe un exceso de variantes poco frecuentes, sugiere que la población ha experimentado una

expansión poblacional reciente. Los resultados obtenidos fueron complementados con un análisis bayesiano de gráfico de línea de cielo o Skyline Plots (Drummond et al. 2005; Ho & Shapiro 2011). El análisis de Skyline Plots utiliza el principio de coalescencia para estimar los patrones históricos de tamaño poblacional a partir de genealogías sin la necesidad de señalar modelos demográficos para su ejecución. Este análisis se ejecutó en el programa BEAST v.1.8.1. La configuración de los parámetros se realizó en el programa BEAUti v.1.8.1. Para ello se utilizaron las matrices alineadas de cada especie en cuestión. El modelo nucleótido fue estimado por codón con el programa PartitionFinder v.1.1.0 (Lanfear et al. 2012). La configuración del modelo de reloj molecular fue *lognormal relaxed clock*, con la tasa mutacional para cada locus. Se corrieron 100 millones de generaciones (MCMC), muestreado cada 1000 generaciones con un *burn-in* de 25%. La convergencia de las cadenas de Markov y del tamaño efectivo poblacional se estimó con Tracer v.1.5 (http://beast.bio.ed.ac.uk). Con este mismo programa se graficó la curva demográfica.

3.4 Metodología para realizar análisis de riesgo desde el punto de vista productivo y de la biodiversidad, considerando la factibilidad de realizar programas de repoblamiento y cultivo en zonas geográficas no utilizadas actualmente

En base a los resultados de este proyecto (*i*. reconstrucción filogenética y delimitación de especies, *ii.* estimación de eventos de hibridación y *iii.* análisis filogeográfico), se establecieron las variables más importantes para este objetivo, las que se complementaron con la información publicada en la literatura científica actualizada. Con ello, se construyeron dos

matrices de análisis FODA para la especie *Mytilus chilensis*: una para BIODIVERSIDAD y la otra para PRODUCCIÓN.

4. RESULTADOS

4.1. Filogenia y delimitación de las especies de *Mytilus*

4.1.1. Justificación del uso de 18S DNA

En la propuesta se presentó como marcador molecular candidato para los análisis filogenéticos, la región ITS1 del ADN ribosomal nuclear. Sin embargo, la secuenciación de este marcador mostró patrones ambiguos y poco confiables para los análisis filogenéticos por lo que fue descartado (Anexo 9). En su reemplazo se eligió una región contigua, tal como se esquematiza en la figura 1. Consideramos que esta es una estrategia válida frente a la ambigüedad de los resultados de ITS (cromatográmas con señales múltiples), por las siguientes razones: en primer lugar corresponde a una región nuclear por lo tanto la exigencia multi-locus del análisis no se ve afectada. En segundo lugar la región 18S es contigua a la región ITS propuesta (Figura 1), y aunque la primera se trata de una región funcional y con diferente tasa de cambio, ambas corresponden a la misma región nuclear (DNA ribosomal). En tercer lugar, y no menos importante, en la propuesta se consideraban alrededor de 1250 nucleótidos a analizar según el tamaño del marcador ITS y el cambio a 18S consideró el análisis de 1770 nucleótidos, aumentando así el número de caracteres moleculares disponibles. En la literatura, los usos u utilidad del rDNA 18S son variados. Por ejemplo, ya Steiner y Müller (1996) señalan que las secuencias de rDNA 18S, para el estudio de la evolución de los bivalvos y su elevada convergencia morfológica, pueden ser de gran valor. Por su parte, Distel (2000) reportan

secuencias casi completas para los genes rRNA de subunidad pequeña (18S; figura 1) de siete especies representativas de cuatro subfamilias de Mytilidae: *Modiolus modiolus* y *M. auriculatus* (Modiolinae); *Lithophaga lithophaga* y *L. nigra* (Lithophaginae); *Musculus senhousie* y *M. discors* (Crenellinae); y *Hormomya domingensis* (Mytilinae). Los análisis filogenéticos que incluyen estas y otras secuencias de 18S DNA de bivalvos casi completas demuestraron ser útiles y dan buen soporte para la monofilia de la familia Mytilidae y las subfamilias Crenellinae y Lithophaginae. Taylor et al. (2011) presentan una filogenia molecular de los bivalvos quimiosimbióticos de la familia Lucinidae, utilizando secuencias de los genes nucleares 18S y 28S rRNA y el gen mitocondrial citocromo b. Los autores analizaron 87 especies separadas y clasificadas en 47 géneros. Los árboles muestran cinco clados bien soportados con DNA 18S. Se presenta además una nueva clasificación de Lucinidae con siete divisiones subfamiliales.

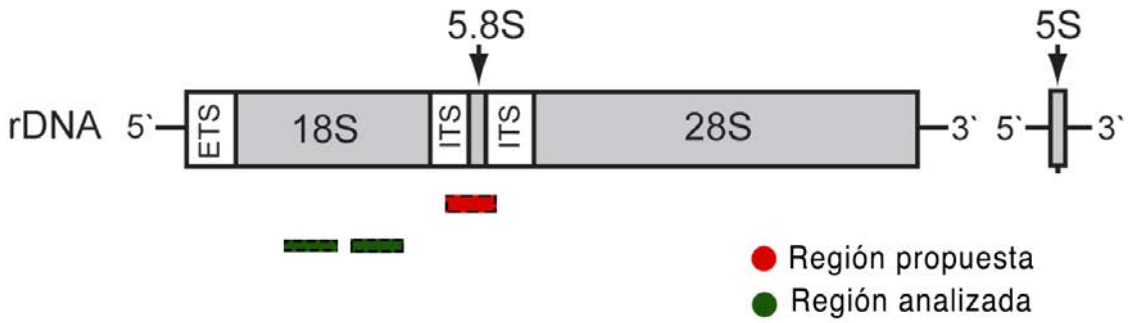


Fig. 1. Diagrama que representa el cluster de DNA ribosomal completo en metazoos. En rojo se señala la región propuesta en el proyecto. En verde los dos segmentos de la región 18S, parte del mismo cluster que fueron analizados como alternativa.

En la figura 2 se muestra el resultado de los análisis filogenéticos de las especies de *Mytilus* usando el gen citocromo oxidasa subunidad I, mitocondrial. Este árbol muestra una clara separación entre las seis especies de *Mytilus* reconocidas actualmente: *M. coroscus*, *M californianus*, *M. trossulus*, *M edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. chilensis*. El grupo de interés, en este caso, las especies de *Mytilus* presentes en Chile, son representados por dos clados bien diferenciados, *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*. Dentro del clado de *M. chilensis* se observa, aunque con bajo soporte de bootstrap y probabilidad a posteriori (46% y 0,8 respectivamente), una separación de *Mytilus chilensis* de Uruguay y Nueva Zelanda. En el mismo sentido, las muestras disponibles de Vigo (España) y de Llico, Isla Quiriquinas, Lota y Tubul (Chile) confirman que *M. galloprovincialis* está presente en Chile como especie introducida.

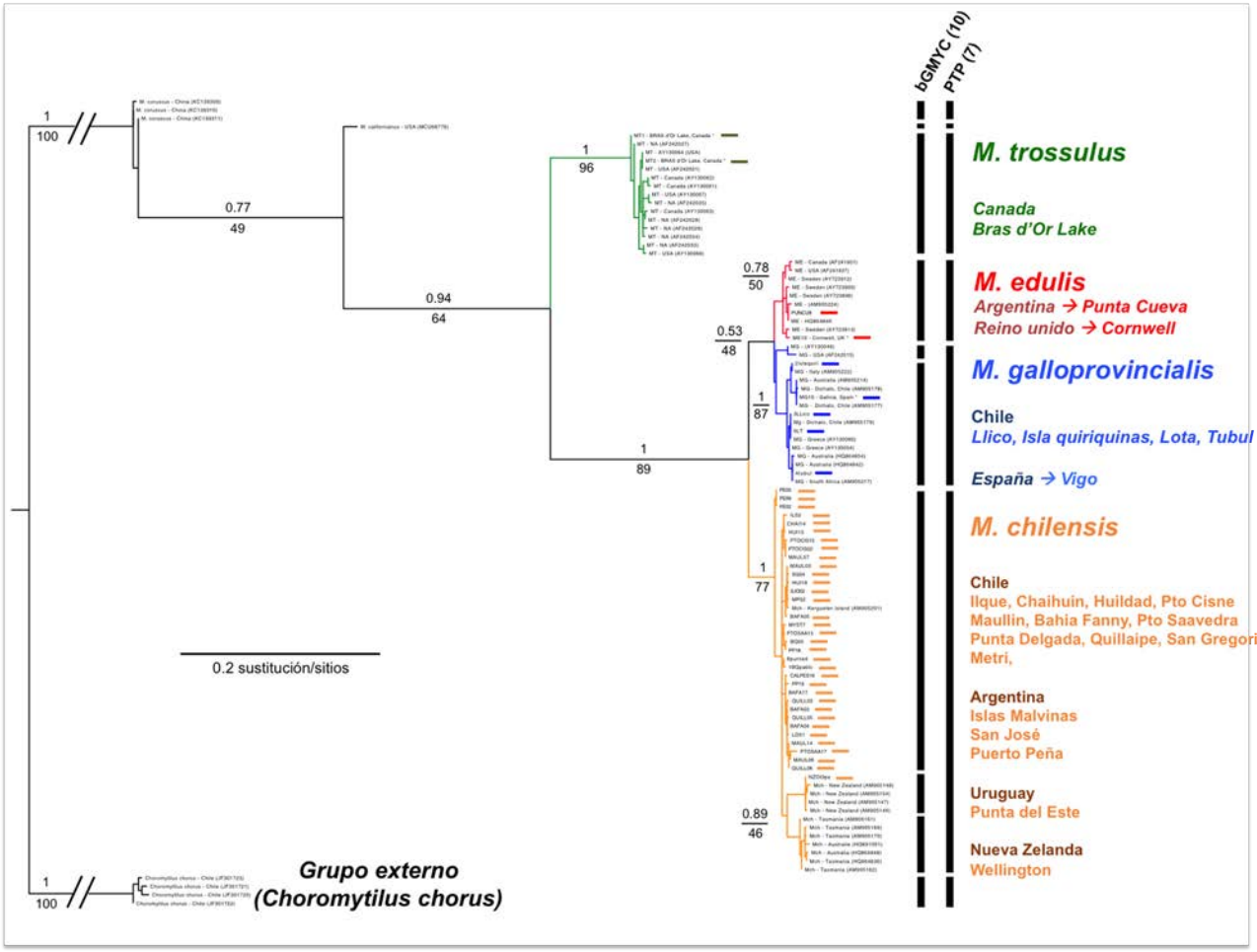


Fig. 2. Relaciones filogenéticas entre las seis especies de *Mytilus* a través de análisis de COI. El soporte de los nodos se muestra en cada rama indicando probabilidad a posteriori (superior) y soporte de bootstrap (inferior). Las barras verticales a la izquierda de la figura indican los resultados de los análisis de delimitación de especies (ver texto).

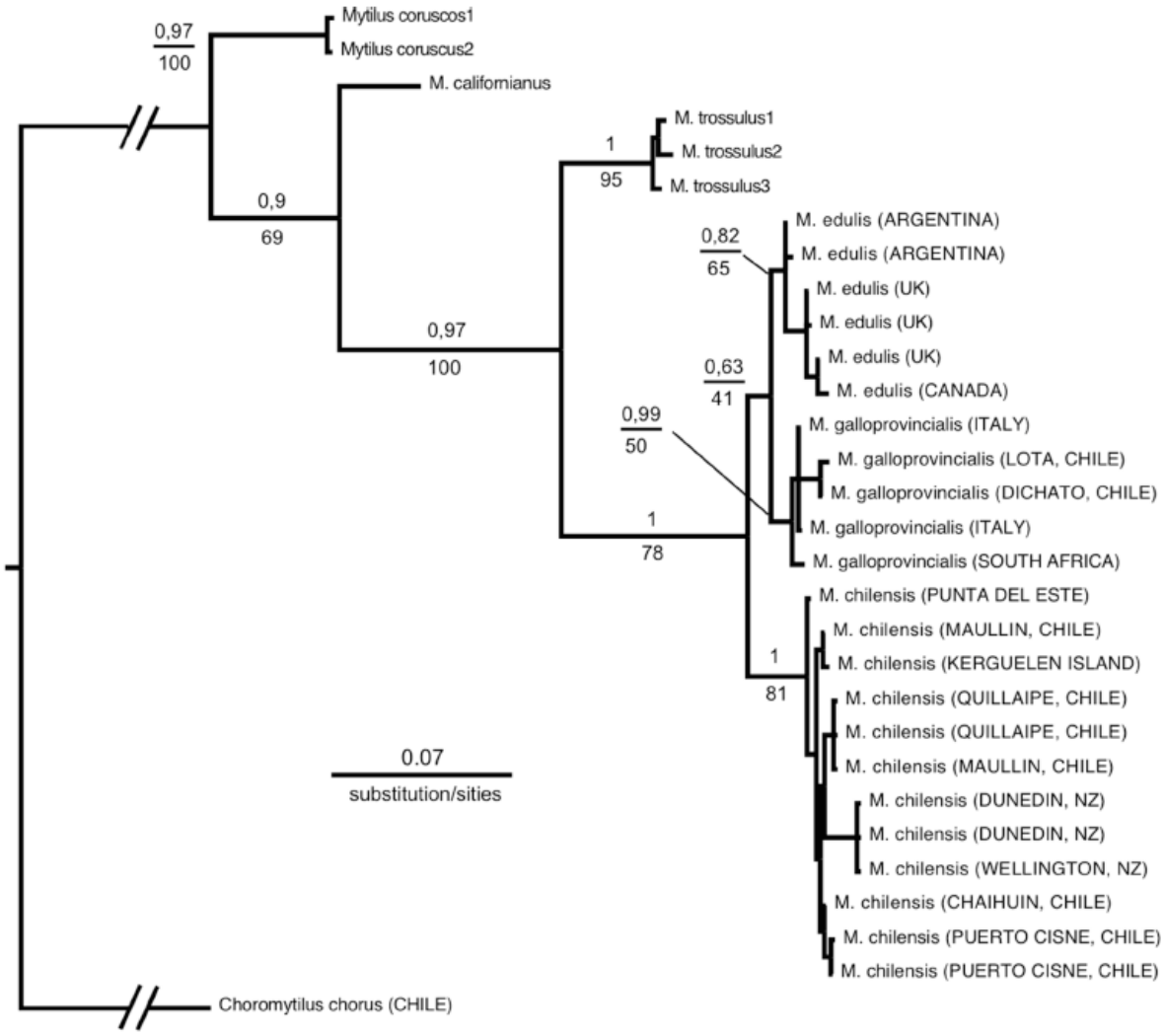


Fig. 3. Relaciones filogenéticas entre las especies de *Mytilus* en base a los datos concatenados 16S y COI. El soporte de los nodos se muestra en cada rama indicando probabilidad a posteriori (superior) y soporte de bootstrap (inferior).

Con respeto al marcador nuclear DNA18S, este presentó, de acuerdo a lo esperado, menos variabilidad genética que los marcadores mitocondriales. No obstante, como se observa en la Figura 4, permitió diferenciar claramente a *M. chilensis* de las demás especies de *Mytilus*, excepto *M. galloprovincialis*. Por su parte, *M. trossulus* y *M. edulis*, formaron grupos polifiléticos, probablemente debido a la poca diferenciación genética de estas especies en cuanto al marcador DNA 18S.

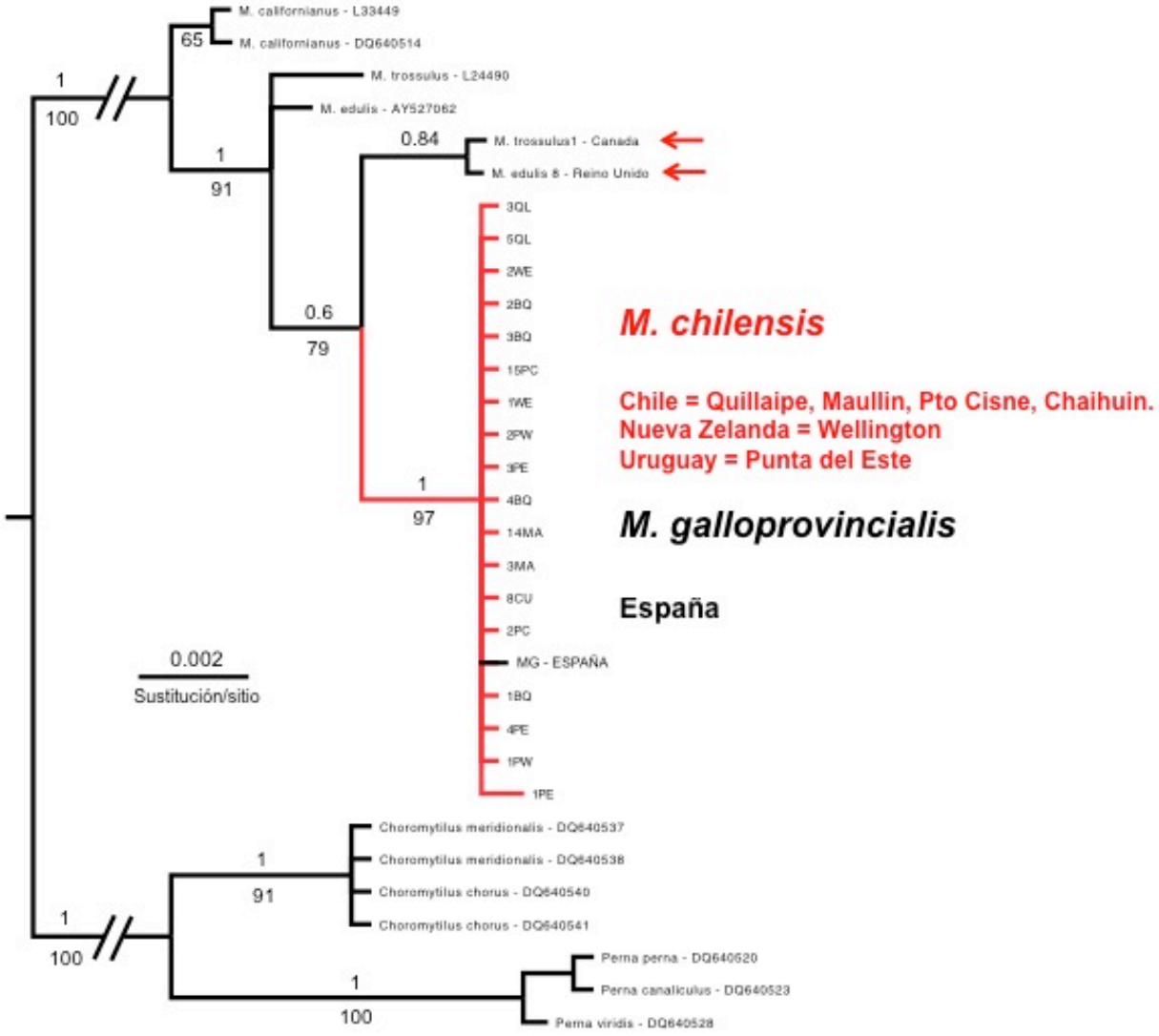


Fig. 4. Relaciones filogenéticas entre las cuatro especies de *Mytilus* a través de análisis de 18SrDNA. El soporte de los nodos se muestra en cada rama indicando probabilidad a posteriori (superior) y soporte de bootstrap (inferior).

Tabla 6. Posición variable de los haplotipos de la secuencia del gen mtDNA-COI para las especies del complejo *Mytilus edulis*.

Especies	110	120	123	135	136	144	147	165	174	180	183	184	189	195	198	216	217
M. galloprovincialis	*	C	*	*	*	C	*	G	*	*	*	G	T	*	*	*	*
M. edulis	*	C	*	*	*	C	*	G	*	*	*	G	T	*	*	*	*
M. trossulus	C	T	*	G	*	G	*	A	*	*	*	A	C	*	*	G	*
M. chilensis	G	T	A	*	G	G	T	A	G	A	G	A	C	G	T	*	G

Especies	219	220	228	246	252	261	264	273	274	288	300	303	304	306	309	327	330
M. galloprovincialis	*	C	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*
M. edulis	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
M. trossulus	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	G	T	*	*	*	*	*
M. chilensis	C	T	A	C	G	*	G	T	T	G	*	*	T	T	*	C	C

Especies	342	354	357	360	366	375	381	384	387	411	412	414	427	430	432	436	438
M. galloprovincialis	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	G
M. edulis	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	G
M. trossulus	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	C	*	*	A
M. chilensis	*	G	C	A	C	A	C	A	A	C	A	A	*	C	G	C	A

Especies	444	453	462	468	474	477	483	484	489	492	507	519	520	528	540	543	544
M. galloprovincialis	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
M. edulis	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
M. trossulus	G	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
M. chilensis	T	A	C	T	A	G	T	G	C	T	A	C	A	C	C	C	C

Especies	545	546	547	555	558	561	567	579	582	591	592	600	603	606	618	624	630
M. galloprovincialis	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*
M. edulis	*	*	C	*	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*	*	*	*
M. trossulus	*	*	T	*	*	C	*	C	T	*	T	*	*	*	*	*	*
M. chilensis	C	T	T	C	A	*	C	*	*	C	T	C	A	C	T	C	C

Especies	642	645	648	651	658	668
M. galloprovincialis	*	*	T	C	*	C
M. edulis	*	*	T	C	*	C
M. trossulus	*	T	C	T	*	T
M. chilensis	G	*	C	T	C	T

Tabla 7. Posición variable de los haplotipos de la secuencia del gen mtDNA-16S para las especies del complejo *Mytilus edulis*.

Especies	67	70	115	166	173	258	260	270	293	294	306	307	308	313	318	324	328
M. galloprovincialis	*	C	*	*	C	*	C	*	*	*	*	*	*	C	*	*	*
M. edulis	*	C	*	*	C	*	C	*	*	*	*	*	G	C	*	*	*
M. trossulus	C	T	C	G	T	T	T	T	G	A	T	C	*	T	A	A	C
M. chilensis	*	T	*	*	T	*	T	*	*	*	*	*	*	T	*	*	*

Especies	440	462
M. galloprovincialis	*	*
M. edulis	*	*
M. trossulus	*	A
M. chilensis	C	*

4.1.2. Resultados de los análisis de delimitación de especies

En cuanto a la delimitación de especies, la Figura 2 muestra los resultados tanto con bGMYC (bayesian General-Mixed Yule Coalescent) como con PTP (Poisson Tree Processes). El análisis con bGMYC dió como resultado 10 especies putativas (incluyendo grupos externos). En este caso, *M. chilensis* es separado claramente de las otras especies de *Mytilus* en tres linajes, uno de las costas de Chile y Atlántico, mientras que los otros dos linajes correspondieron a los provenientes de Nueva Zelanda y Tasmania. El análisis con PTP mostró resultados similares con siete especies, siendo un poco más conservador con respecto a los linajes de *M. chilensis*. En conclusión y de acuerdo a todos nuestros análisis:

a) *M. chilensis* es una especie taxonómica y filogenéticamente válida para las costas de Chile, y

b) *M. galloprovincialis* es una especie introducida en Chile y claramente diferenciada de *M. chilensis*.

4.2. Hibridación entre especies de *Mytilus* en Chile

La amplificación y ejecución de los ensayos RFLP fueron exitosos en un 98% de los casos. A continuación se reportan las imágenes de la identificación de híbridos entre las especies del genero *Mytilus* en Chile.

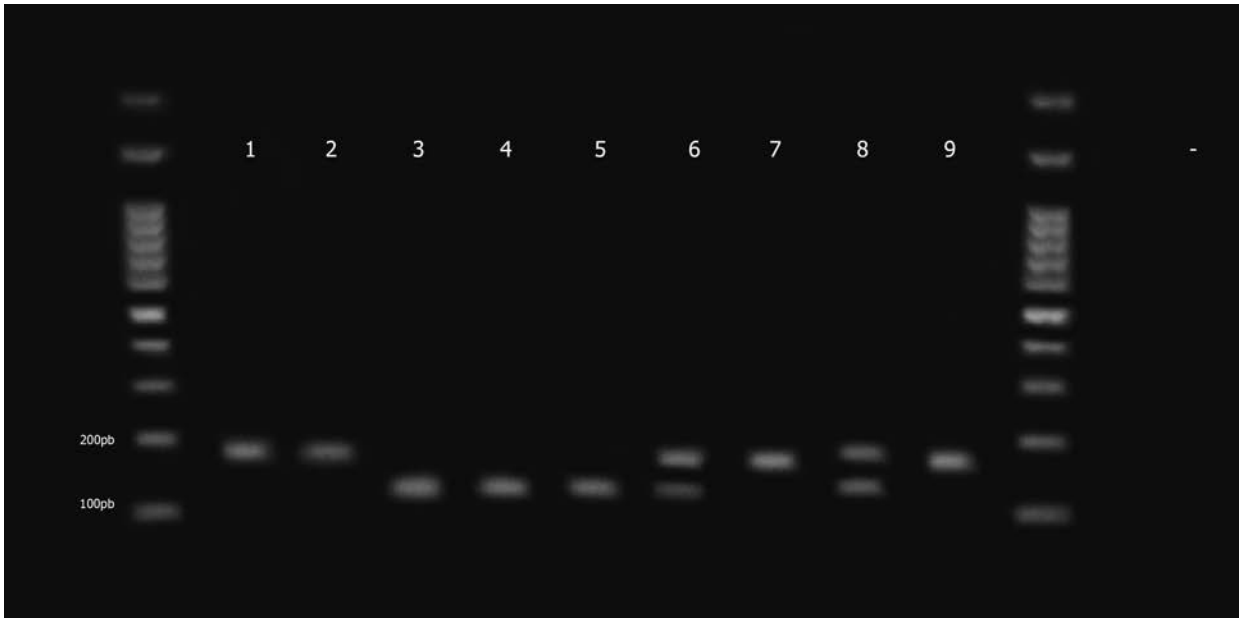


Fig. 5. Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica el producto de PCR del gen de la proteína adhesiva del pie, utilizando el partidor M15/M16. El amplicón para cada especie es de 180 pb = *Mytilus edulis* (Me), 168 pb = *Mytilus trossulus* (Mt), 126 pb = *Mytilus galloprovincialis* o *M. chilensis* (Mg). (1) Me (Buque Quemado, Magallanes); (2) Me (Cornwell, Reino Unido), (3) Mg (Galicia, España), (4) Mg (Lota, Chile), (5) Mg (Puerto Williams, Chile), (6) Híbrido Mt/Mg (Muelle Loreto, Magallanes Chile), (7) Mt (Bras d'Or Lake, Canada), (8) Hibrido Me/Mg (Muelle Loreto, Magallanes Chile), (9) Mt (Bras d'Or Lake, Canada). (-) Control negativo.

Por otro lado también se identificaron animales híbridos entre las especies *M. chilensis* y *Mytilus galloprovincialis* aunque en baja frecuencia (Fig. 6; Tabla 6). A continuación se pueden observar las imágenes de identificación de este tipo de hibridación:

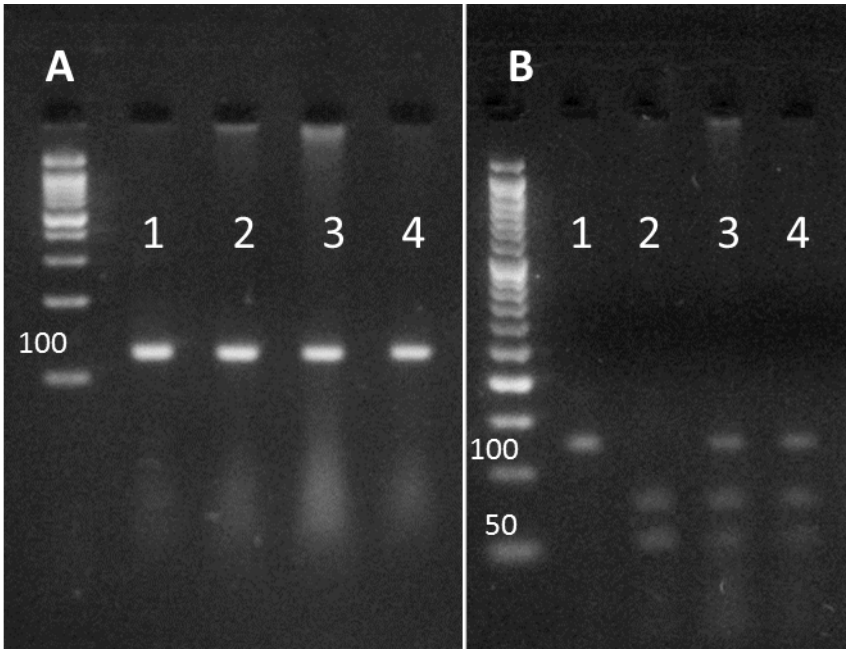


Fig. 6. RFLP Aci-I. A. Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica el producto de PCR del gen de la proteína adhesiva del pie, utilizando el partidor M15/M16. El tamaño del amplicon para *Mytilus galloprovincialis* y *M. chilensis* es de 126 pb. B. Imagen de un gel de agarosa (3%) teñido con *sybr safe* que indica los patrones de RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) después de la digestión con: *Aci I*. **(1)** *M. chilensis*, **(2)** *M. galloprovincialis* (Lota), y **(3-4)** híbrido entre *M. chilensis*/*M. galloprovincialis*.

Tabla 8. Resultados de los eventos de hibridación en las localidades analizadas. Entre paréntesis se representa el porcentaje de híbrido. **Me** = *M. edulis*; **Mg** = *M. galloprovincialis*; **Mt** = *M. trossulus*; **Mc** = *M. chilensis*.

Localidades con hibridación	N° de animales analizados	N° hibridos	Me/Mg	Me/Mc	Mt/Mc	Mg/Mc
Coliumo	50	4 (8%)				4
Lota	50	2 (4%)				2
Llico	50	2 (4%)				2
Muelle Loreto	30	5 (16%)	1	2	2	
Porvenir	30	9 (30%)		9		
Pto. Williams	30	2 (7%)		2		
Bu. Quemado	30	2 (7%)		2		
TOTAL	270	26	1	15	2	8

Se evidenció un bajo nivel de hibridación entre las especies de *Mytilus* que habitan Chile (Tabla 6). Los animales híbridos corresponden al 2,7% de todos los animales analizados. En este sentido la hibridación más frecuente encontrada fue entre las especies *M. edulis* y *M. chilensis*, las que habitan exclusivamente la región de Magallanes (Tabla 6). Por otro lado, de las 30 localidades analizadas, solo se encontraron híbridos entre *M. chilensis* y *M. galloprovincialis* en los sitios ubicados en la región del biobio (i.e. Coliumo, Lota, Llico). Precisamente en esas localidades, también se encuentran los taxones puros de dicha hibridación.

4.3. Análisis filogeográfico

La amplificación y secuenciación de los locus COI y 16S fueron exitosamente realizados. Para el locus COI se obtuvieron 676 sitios (nucleótidos) y para el locus 16S, 459 sitios (nucleótidos).

4.3.1 Distribución espacial de la diversidad genética *Mytilus chilensis*

4.3.1.1. Índices generales de diversidad genética

El número de haplotipos para el set de datos del marcador COI fue de 69, considerando 160 individuos de las distintas localidades (Tabla 7). Por su parte la diversidad haplotípica (H) fue 0,943, el número de diferencias entre pares de secuencias (Π) fue de 3,161 y la diversidad nucleotídica (π) fue de 0,0047. En la la Tabla 7 se señala el número de secuencias utilizadas y los resultados de los índices para cada localidad.

Tabla 9. Índices de diversidad y test de neutralidad para *Mytilus chilensis* a lo largo de Chile (basado en los datos de COI; 676 sitios). n = Número de individuos analizados; K = Número de haplotipos; S = Sitios polimórficos; H = diversidad haplotípica; Π = número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias; π = diversidad nucleotídica; Tajima'sD = test de Tajima D; Fu's FS = Test de Fu FS.

Localidades	n	K	H (SD)	S	Π	π	Tajima'sD	Fu's FS
Puerto Saavedra	20	14	0,947 (0,038)	20	3,257	0,00484	-1,87	-8,43
Chaihuin	20	13	0,942 (0,037)	15	2,532	0,00375	-1,68	-8,37
Maullin	20	14	0,971 (0,032)	19	3,632	0,00539	-1,39	-9,04
Quillaipe	20	12	0,932 (0,035)	20	3,789	0,00561	-1,25	-3,96
Huildad	20	10	0,914 (0,056)	14	2,895	0,00428	-1,3	-4,31
Puerto Cisne	20	15	0,942 (0,043)	21	3,647	0,0054	-1,46	-8,89
Bahia Fanny	20	14	0,947 (0,034)	21	3,089	0,00457	-1,82	-8,28
Caleta Pescadores	20	15	0,921 (0,055)	28	3,326	0,00492	-2,26	-9,63
Todas las localidades	**160**	69	0,943 (0,011)	76	3,161	0,0047	-2,48	-94,82

Con respecto al marcador DNA16S, el número de fue de 49, la diversidad haplotípica fue 0,808, el número de diferencias entre pares de secuencias fue de 2,289 y la diversidad nucleotica fue de 0,00488. En la la Tabla 8 se señala el número de secuencias utilizadas y los resultados de los índices para cada localidad.

Tabla 10. Índices de diversidad y test de neutralidad para *Mytilus chilensis* a lo largo de Chile (basado en los datos de 16SI; 470 sitios). n = Número de individuos analizados; K = Número de haplotipos; S = Sitios polimórficos; H = diversidad haplotípica; Π = número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias; π = diversidad nucleotídica; Tajima'sD = test de Tajima D; Fu's FS = Test de Fu FS.

Localidades	n	K	H (SD)	S	Π	π	Tajima'sD	Fu's FS
Puerto Saavedra	20	9	0,678 (0,122)	16	2,292	0,00488	-2,11	-2,93
Chaihuin	20	9	0,678 (0,122)	14	1,936	0,00412	-2,05	-3,64
Maullin	20	8	0,860 (0,055)	8	1,721	0,00366	-0,97	-3,23
Quillaipe	20	7	0,824 (0,064)	8	1,662	0,00354	-1,05	-2,15
Huildad	20	8	0,867 (0,067)	38	5,590	0,01189	-2,28	-0,14
Puerto Cisne	20	9	0,879 (0,043)	9	1,932	0,00411	-1,10	-3,46
Bahía Fanny	20	10	0,711 (0,113)	14	1,816	0,00386	-1,98	-5,10
Caleta Pescadores	20	11	0,763 (0,103)	10	1,442	0,00307	-1,90	-8,16
Todas las localidades	**160**	49	0,808 (0,030)	70	2,289	0,00488	-2,64	-59,09

4.3.1.2. Análisis histórico demográfico

Las figuras 7 y 8 muestran los resultados del los análisis de demografía histórica de *M. chilensis* con COI y DNA16S respectivamente. Para COI la gráfica señala una tendencia al aumento del tamaño efectivo de la población desde los 10.000 años atrás, con una tendencia al equilibrio, el que se mantiene hasta el tiempo 0 (presente). La misma tendencia puede observarse para el locus DNA16S desde los 15.000 años en adelante. De estos resultados se puede inferir que la tendencia poblacional de *Mytilus chilensis* fue al aumento desde el periodo

postglacial, tendencia que se ha demostrado también en otro grupos animales del extremo Sur de Sudamérica.

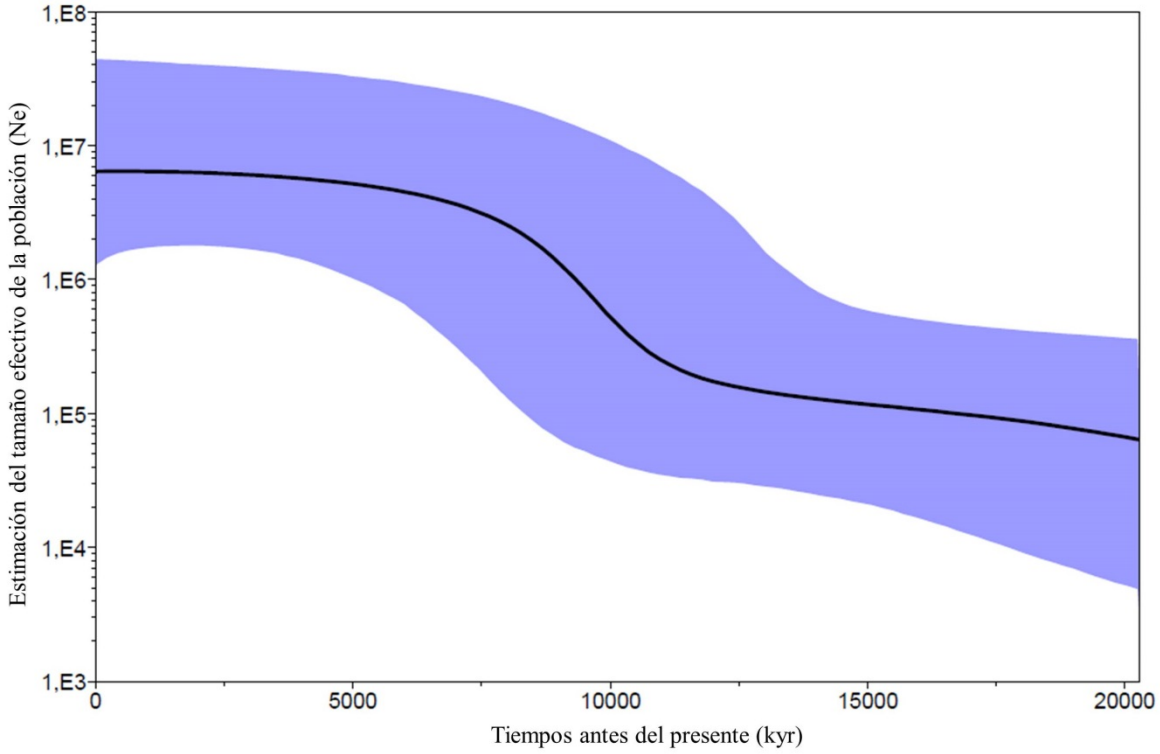


Fig. 7. Gráfico del análisis bayesiano Skyline plot (10^8 MCMC BEAST; > 200 ESS), muestra la historia demográfica de *Mytilus chilensis* en localidades muestreadas en el sur de Chile. El eje de las ordenadas muestra tamaño poblacional y el eje de las abscisas representa el tiempo (kyr = miles de años). La línea negra continua es la media estimada y el área azul señala el límite del 95% de la mayor densidad posterior. Basado en las secuencias del gen COI.

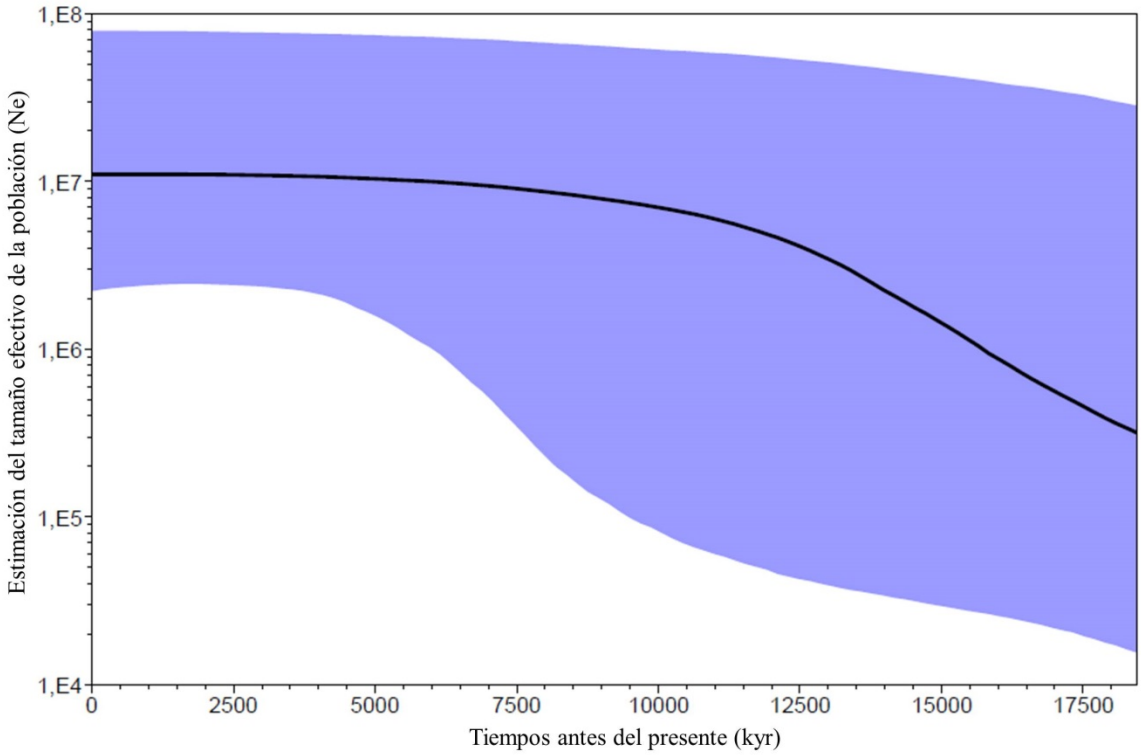


Fig. 8. Gráfico del análisis bayesiano Skyline plot (10^8 MCMC BEAST; > 200 ESS), muestra la historia demográfica de *Mytilus chilensis* en las localidades muestreadas del sur de Chile. El eje de las ordenadas muestra el tamaño poblacional y el eje de las abscisas representa el tiempo (kyr = miles de años). La línea negra continua es la media estimada y el área azul señala el límite del 95% de la mayor densidad posterior. Basado en las secuencias del locus 16S.

4.3.1.3. Diferencias entre pares de secuencias (*Mistmatch Distribution*)

El análisis de diferencias pareadas para de *Mytilus chilensis* en las localidades muestreadas del Sur de Chile indica que se produjo un aumento reciente en la población, esto debido a que el histograma arrojó una curva observada de tipo unimodal la cual se ajusta a un modelo de expansión poblacional reciente (Figura 9). Este resultado corrobora los análisis de skyline plots dado que, alrededor de entre los 10.000 y los 20.000 años antes del presente se aprecia una marcada tendencia hacia un aumento en el tamaño efectivo estimado de la

población (Figuras 7 y 8). Las mismas tendencias se observaron al realizar una análisis de diferencias pareadas por población (Figura 10), en que todas las poblaciones, excepto Quillaipe, mostraron una curva unimodal.

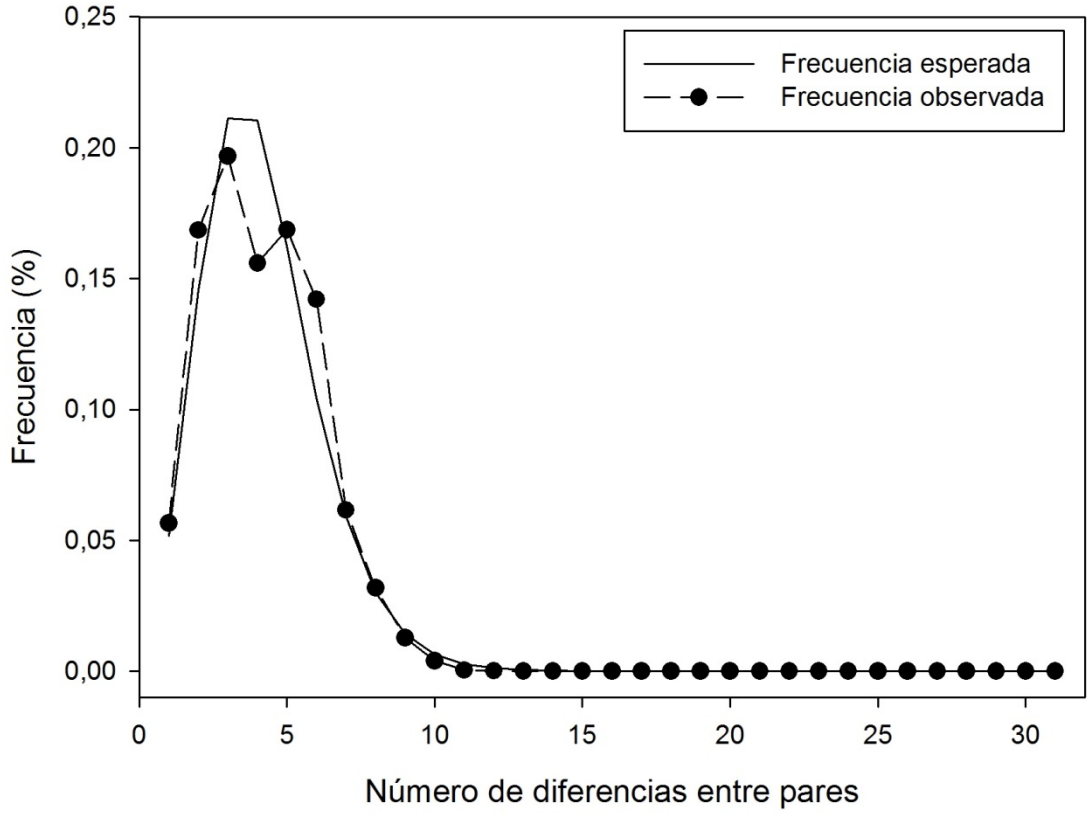


Fig. 9. Gráfico de distribución mismatch de haplotipos para las localidades muestreadas donde habita *Mytilus chilensis* dentro de las localidades del sur de Chile, basado en las secuencias de mtDNA del gen COI.

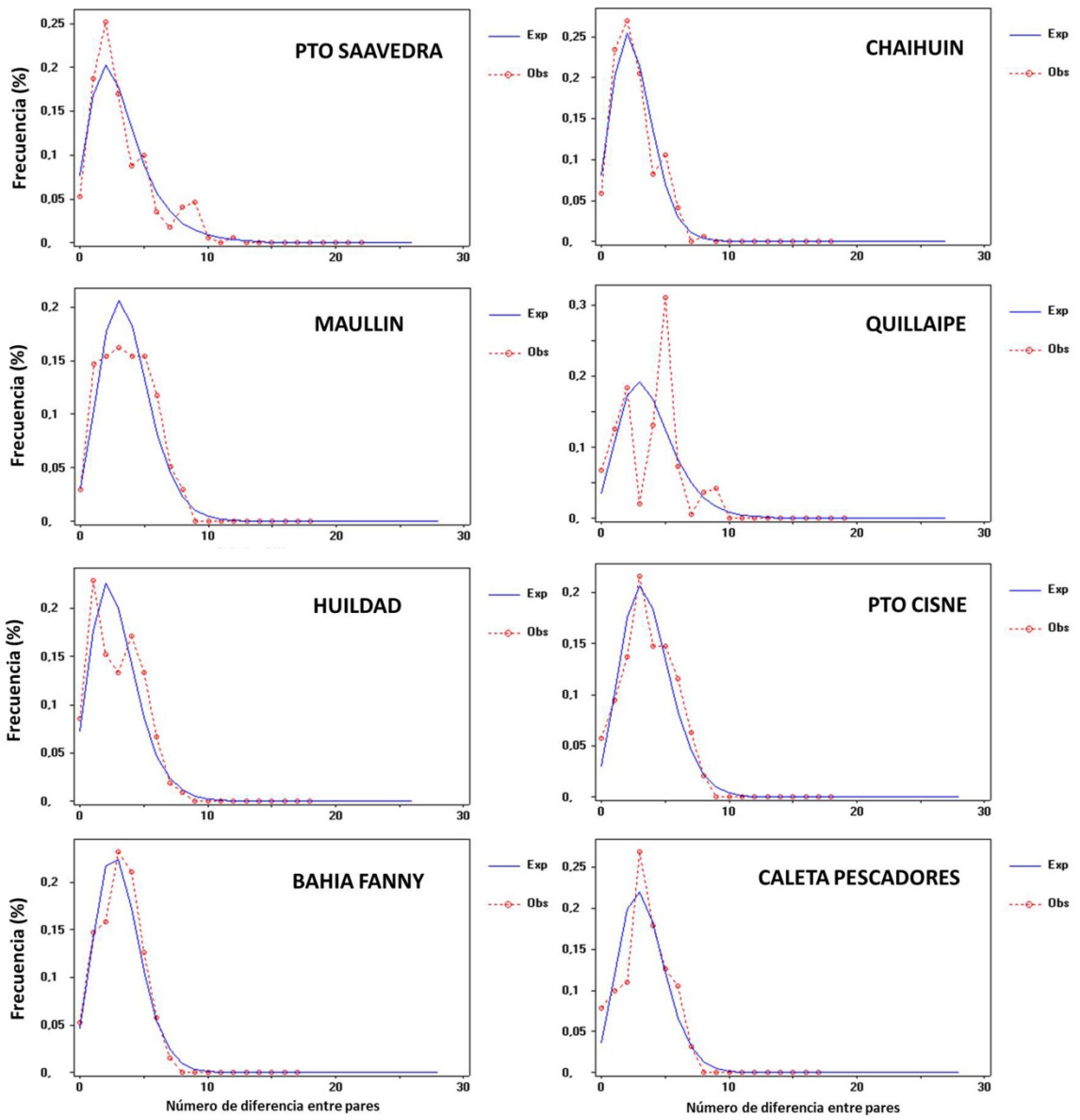


Fig. 10. Gráfico de distribución mismatch por localidad para *Mytilus chilensis* dentro de las localidades del sur de Chile, basado en las secuencias de mtDNA del gen COI.

Por su parte, estos mismos análisis realizados con DNA16S (Figuras 11 y 12), muestran la misma tendencia que con COI, observándose tanto en general como en cada población, un ajuste a un modelo de expansión poblacional reciente.

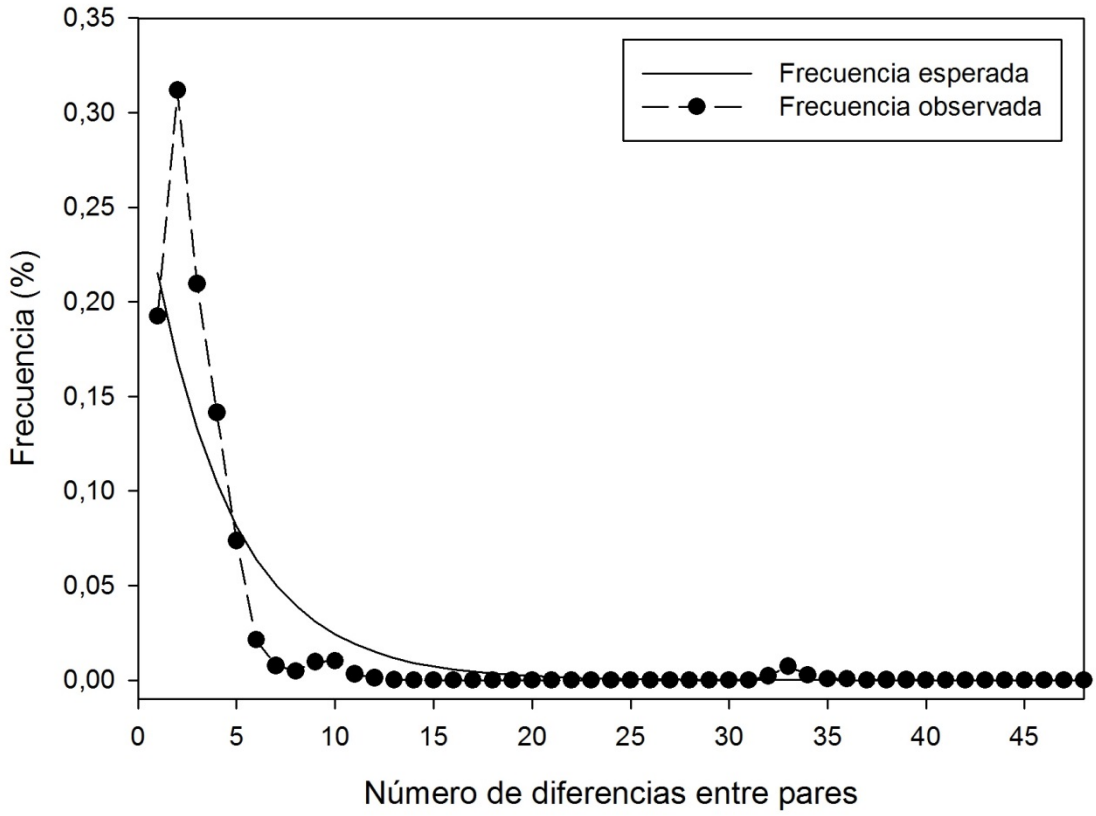


Fig. 11. Gráfico de distribución mismatch de haplotipos para las localidades muestreadas donde habita *Mytilus chilensis* dentro de las localidades del sur de Chile, basado en las secuencias de mtDNA del locus 16S.

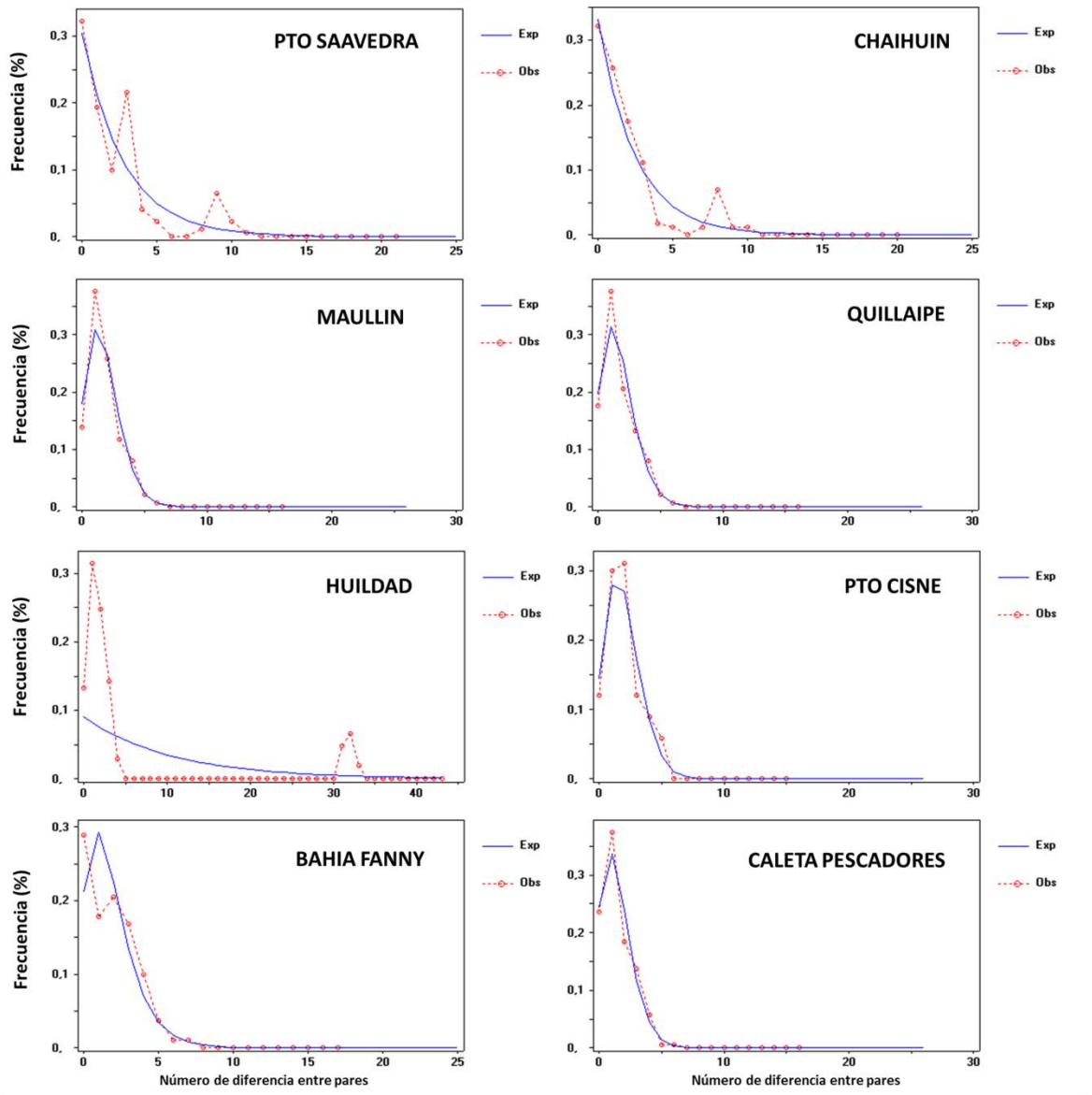


Fig. 12. Gráfico de distribución mismatch por localidad para *Mytilus chilensis* dentro de las localidades del sur de Chile, basado en las secuencias de mtDNA del locus 16S.

4.3.1.4. Redes de haplotipos y redes filogenéticas para *Mytilus chilensis*

En las figuras 13 y 14 se muestran los resultados de los análisis de redes de *Mytilus chilensis* con el marcador mitocondrial COI. Basándonos en la teoría que indica que una forma estrellada de la red de haplotipos, con pocos haplotipos predominantes, tal como se observa en la Figura 13, indican un modelo de expansión poblacional reciente ya que se observan haplotipos compartidos entre localidades como por ejemplo Puerto Saavedra, Chaihuín, Caleta Pescadores y Huildad entre otros. Esto revela que estos haplotipos comparten la misma secuencia de DNA, lo cual representa eventos recientes de conexión genética (Figura 13). Del mismo modo, la red filogenética (Figura 14), no muestra estructuración poblacional, al representarse todos los haplotipos como saliendo desde un mismo origen.

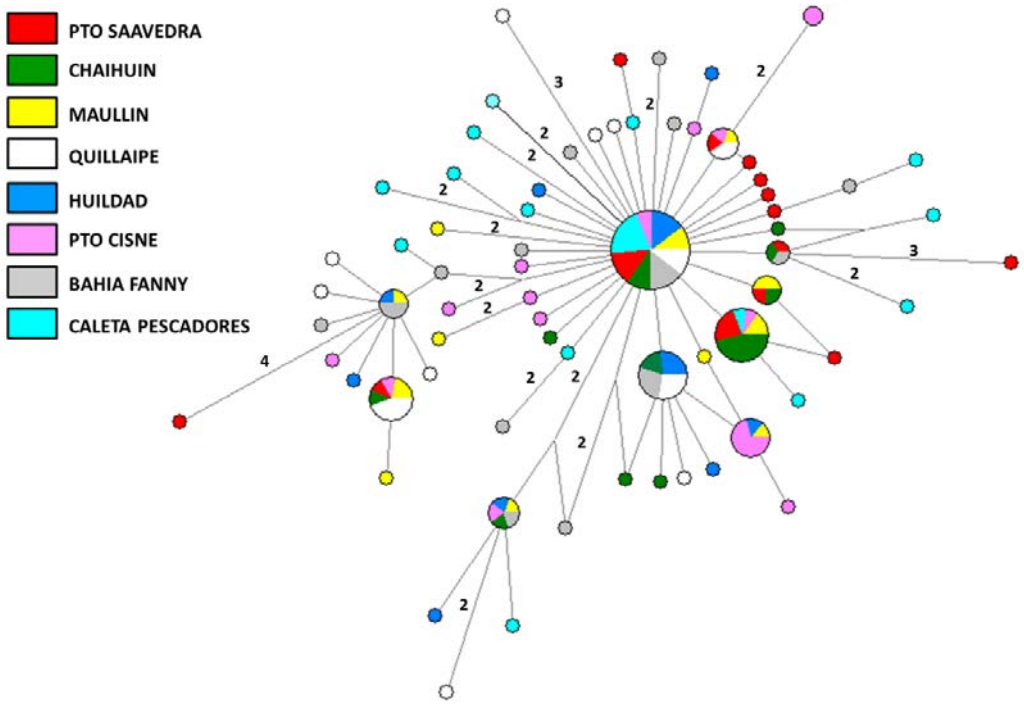


Fig. 13. Red de haplotipos para el locus COI obtenido mediante el método median joining para los choritos de la especies *M. chilensis*.

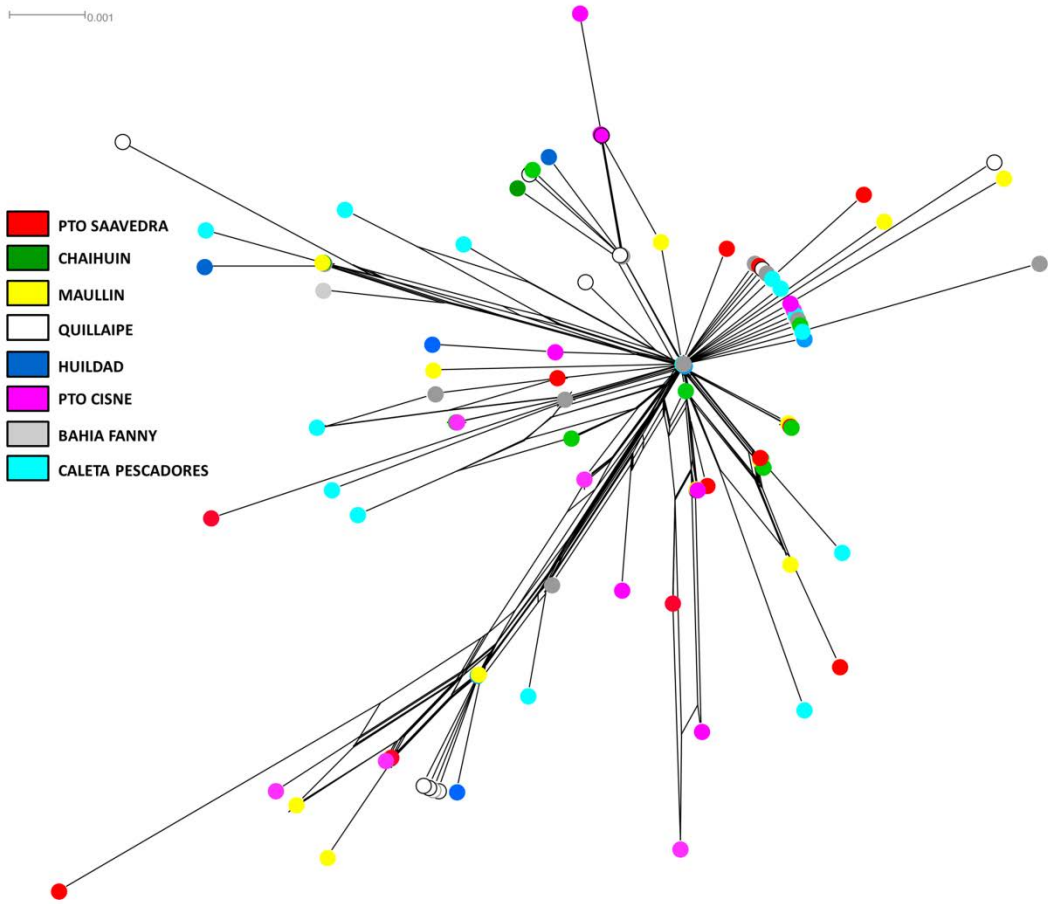


Fig. 14. Red filogenética entre los choritos de la especies *Mytilus chilensis* que habitan el sur de Chile. Basado en los datos del gen COI.

En las Figuras 15 y 16 se muestran los resultados de los análisis de redes de *Mytilus chilensis* con el marcador mitocondrial DNA16S. Estos análisis muestran en general la misma tendencia, aunque con un mayor número de haplotipos dominantes, indicando una mayor estructuración filogeográfica comparada a aquella obtenida con el marcador mitocondrial COI.

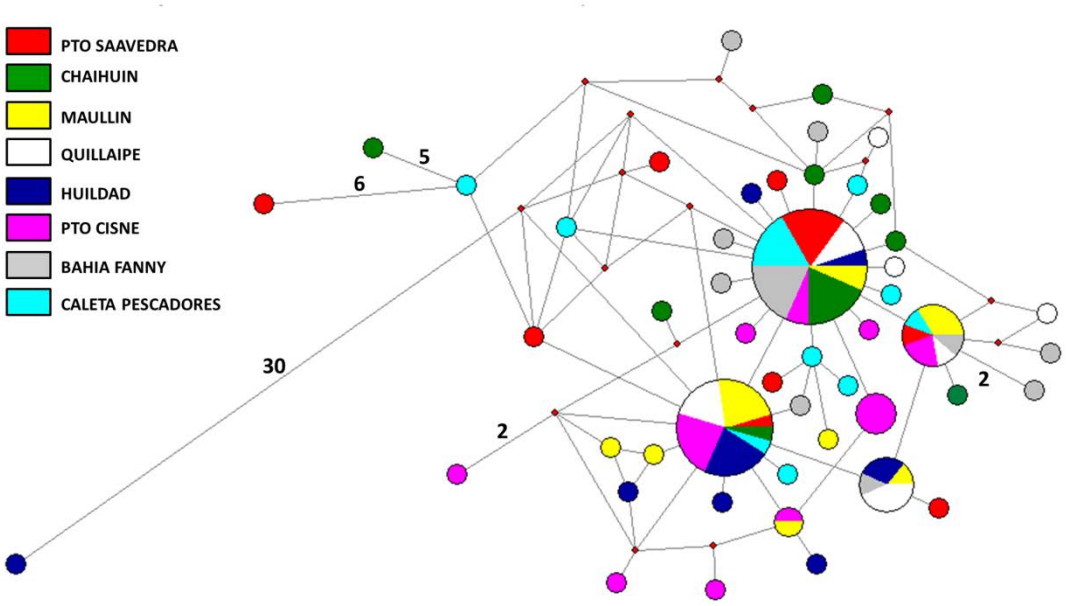


Fig. 15. Red de haplotipos para el locus 16S obtenido mediante el método median joining para los choritos de la especies *M. chilensis*.

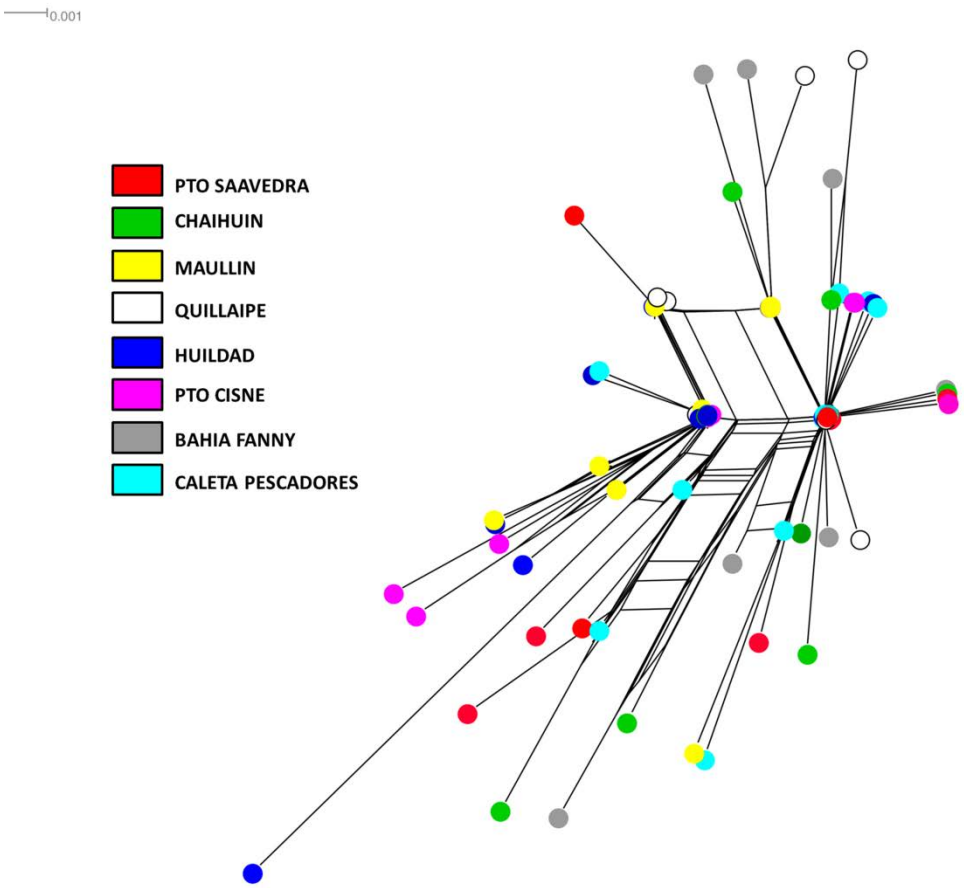


Fig. 16. Red filogenética entre los choritos de la especies *Mytilus chilensis* que habitan el sur de Chile. Basado en los datos del gen 16S.

4.3.2. Distribución espacial de la diversidad genética *Mytilus galloprovincialis*

El número de haplotipos para el set de datos del locus COI para la especie *Mytilus galloprovincialis* fue de 14, la diversidad haplotípica fue 0,857, el número de diferencias entre pares de secuencias fue de 5,065 y la diversidad nucleotídica fue de 0,00863. En la Tabla 3 se señala el número de secuencias utilizadas y los resultados de los índices para cada localidad.

4.3.2.1. Indices generales de diversidad genetica

Tabla 11. Índices de diversidad y test de neutralidad para *Mytilus galloprovincialis* en localidades de la región del Biobío COI (640 sitios).

Localidad	n	K	H (SD)	S	Π	π	Tajima'sD	Fu's FS
Lota	20	7	0,865 (0,042)	28	8,392	0,01349	0,05	3,57
LLico	20	12	0,906 (0,050)	34	10,60	0,01754	-0,20	-0,22
Tubul	20	9	0,889 (0,049)	21	6,157	0,00980	-0,15	0,24
Isla Quiriquinas	20	7	0,832 (0,049)	31	10,66	0,01669	0,58	5,14
Todas las localidades	**80**	14	0,857 (0,020)	28	5,065	0,00863	-0,45	0,50

El número de haplotipos para el set de datos del locus 16S para la especie *Mytilus galloprovincialis* fue de 16, la diversidad haplotípica fue 0,809, el número de diferencias entre pares de secuencias fue de 3,384 y la diversidad nucleotídica fue de 0,00737. En la Tabla 5 se señala el número de secuencias utilizadas y los resultados de los índices para cada localidad.

Tabla 12. Índices de diversidad y test de neutralidad para *Mytilus galloprovincialis* en localidades de la región del Biobío 16S (459 sitios).

Localidad	n	K	H (SD)	S	Π	π	Tajima'sD	Fu's FS
Lota	20	8	0,754 (0,090)	11	3,094	0,00674	-0,36	-0,89
Llico	20	6	0,810 (0,057)	10	3,007	0,00655	0,12	0,68
Tubul	20	5	0,905 (0,103)	9	4,190	0,00913	0,74	-0,05
Isla Quiriquinas	20	8	0,826 (0,061)	13	3,821	0,00832	0,16	-0,10
Todas las localidades	**80**	16	0,809 (0,035)	18	3,384	0,00737	-0,48	-3,28

4.3.2.2. Análisis histórico demográfico

Las Figuras 17 y 18 muestran los resultados del los análisis de demografía histórica de *M. galloprovincialis* con COI y DNA16S respectivamente. A diferencia de lo ocurrido con *M. chilensis*, para COI la gráfica señala una constante en tamaño efectivo de la población desde los 90.000 años atrás, apreciándose una leve disminución hacia el presente. No obstante esta tendencia debe interpretarse con cautela, ya que el análisis representa solo a las localidades donde esta especie ha sido introducida en Chile, de modo que una interpretacón más certera indicaría que probablemente la introducción de esta especie en Chile es reciente y ha tenido varios episódios.

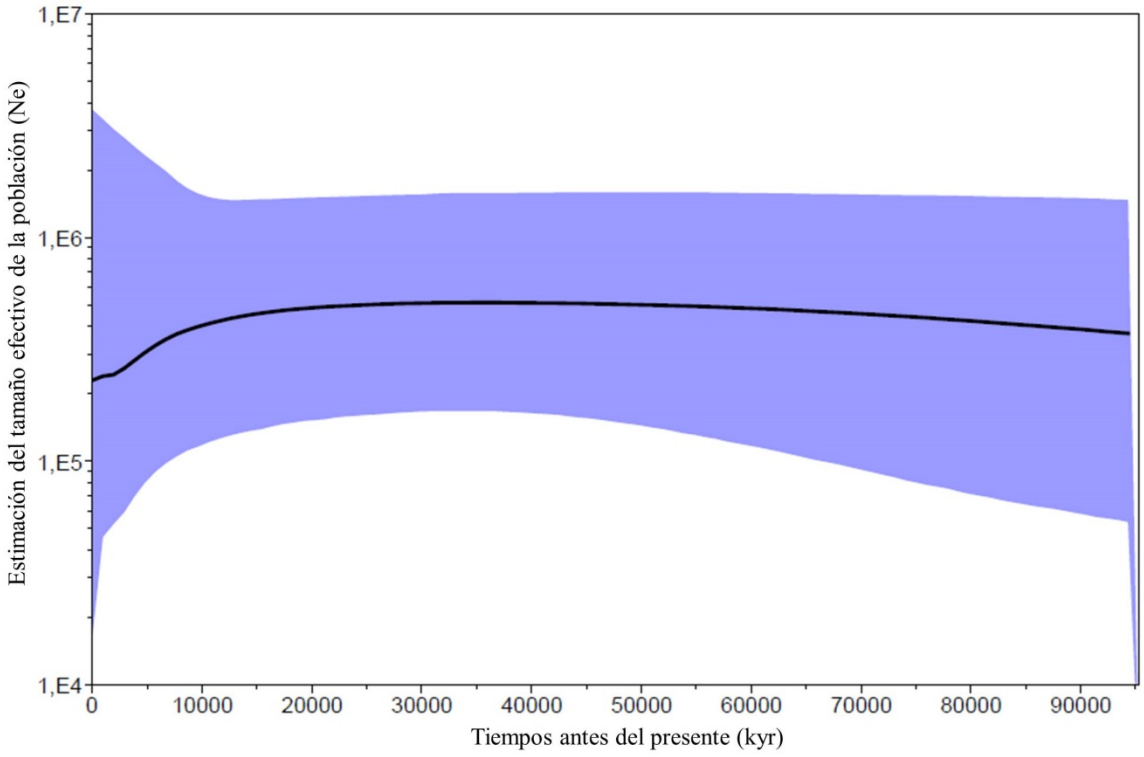


Fig. 17. Gráfico del análisis bayesiano Skyline plot (10^8 MCMC BEAST; > 200 ESS), muestra la historia demográfica de *Mytilus galloprovincialis* en las localidades ubicadas en la región del Biobío. El eje de las ordenadas muestra tamaño poblacional y el eje de las abscisas representa

el tiempo (kyr = miles de años). La línea negra continua es la media estimada y el área azul señala el límite del 95% de la mayor densidad posterior. Basado en las secuencias del gen COI.

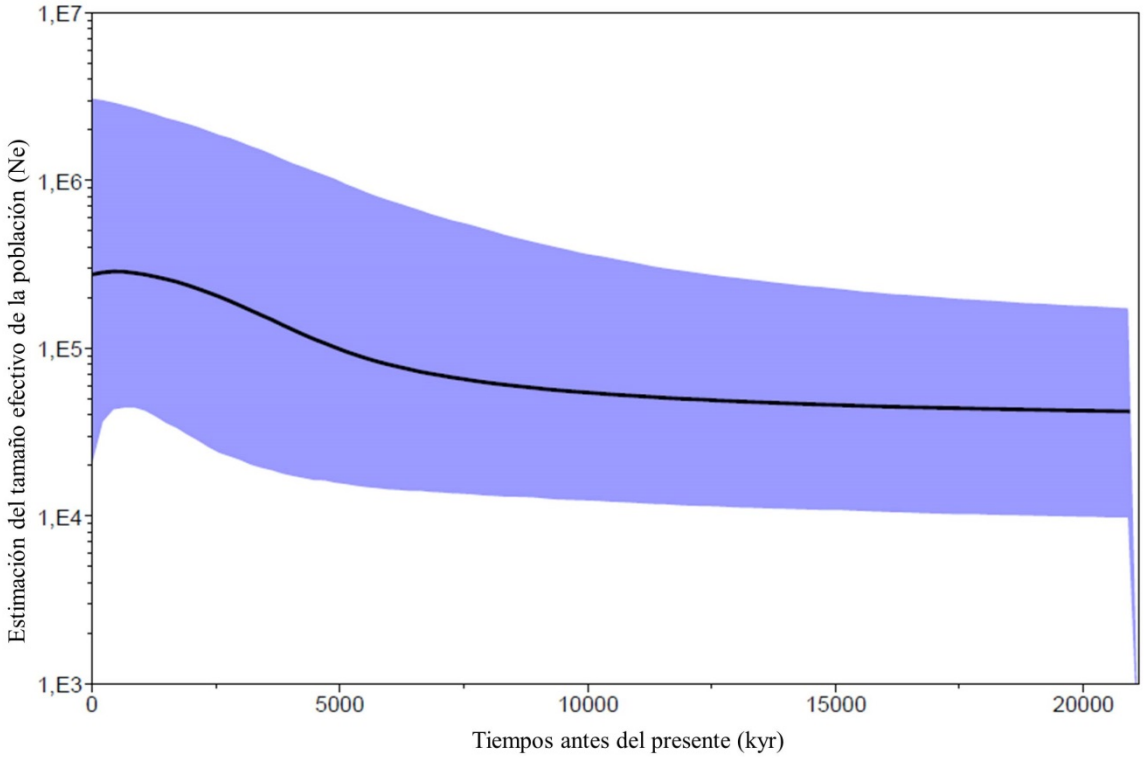


Fig. 18. Gráfico del análisis bayesiano Skyline plot (10^8 MCMC BEAST; > 200 ESS), muestra la historia demográfica de *Mytilus galloprovincalis* en las localidades ubicadas en la región del Biobio. El eje de las ordenadas muestra el tamaño poblacional y el eje de las abscisas representa el tiempo (kyr = miles de años). La línea negra continua es la media estimada y el área azul señala el límite del 95% de la mayor densidad posterior. Basado en las secuencias del locus 16S.

4.3.2.3. Diferencias entre pares de secuencias (*Mistmatch Distribution*)

El análisis de diferencias pareadas para de *Mytilus galloprovincialis* en las localidades donde esta especie introducida en Chile está presente, indica un ajuste a un modelo de estásis poblacional más bien que de expansión, esto debido a que el histograma arrojo una curva observada de tipo multimodal tanto para COI como para DNA16S (Figuras 19 a 22). Esto

ocurre tanto a nivel general (Figuras 19 y 21) como a nivel de cada una de las localidades (Figuras 20 y 22).

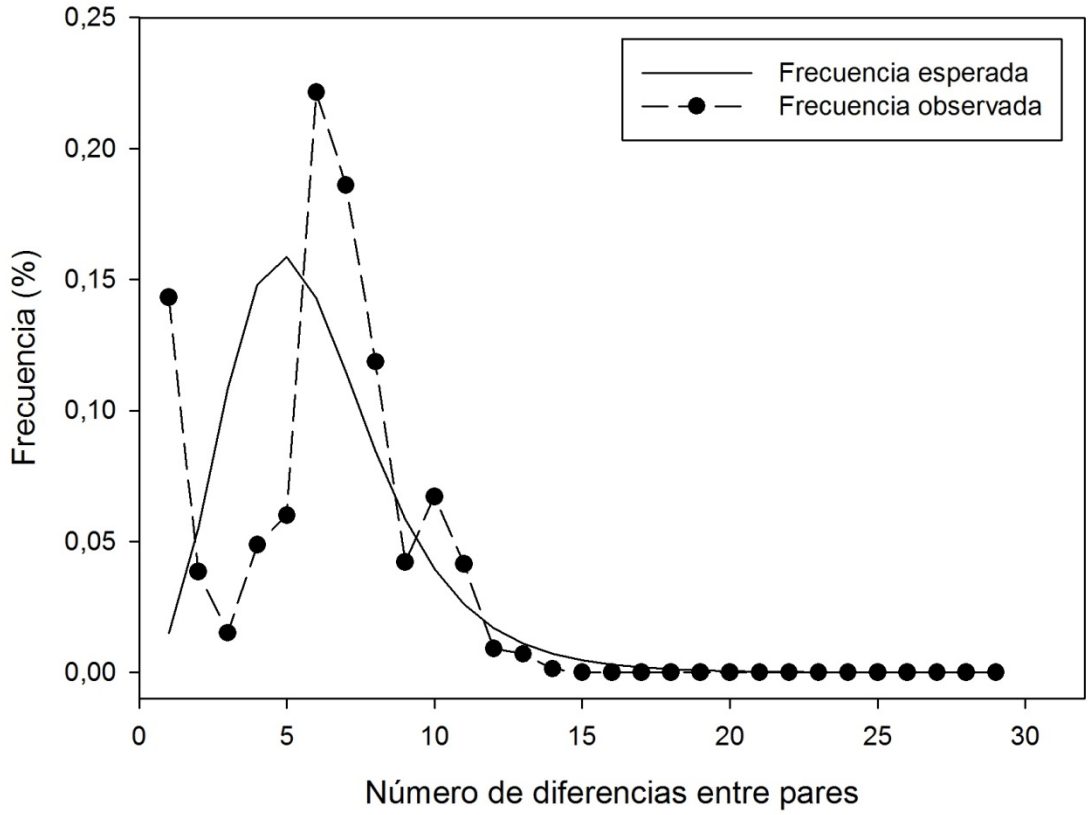


Fig. 19. Gráfico de distribución mismatch de haplotipos para las localidades muestreadas donde habita *Mytilus galloprovincialis* dentro de la región del Biobío (CHILE), basado en las secuencias de mtDNA del gen COI.

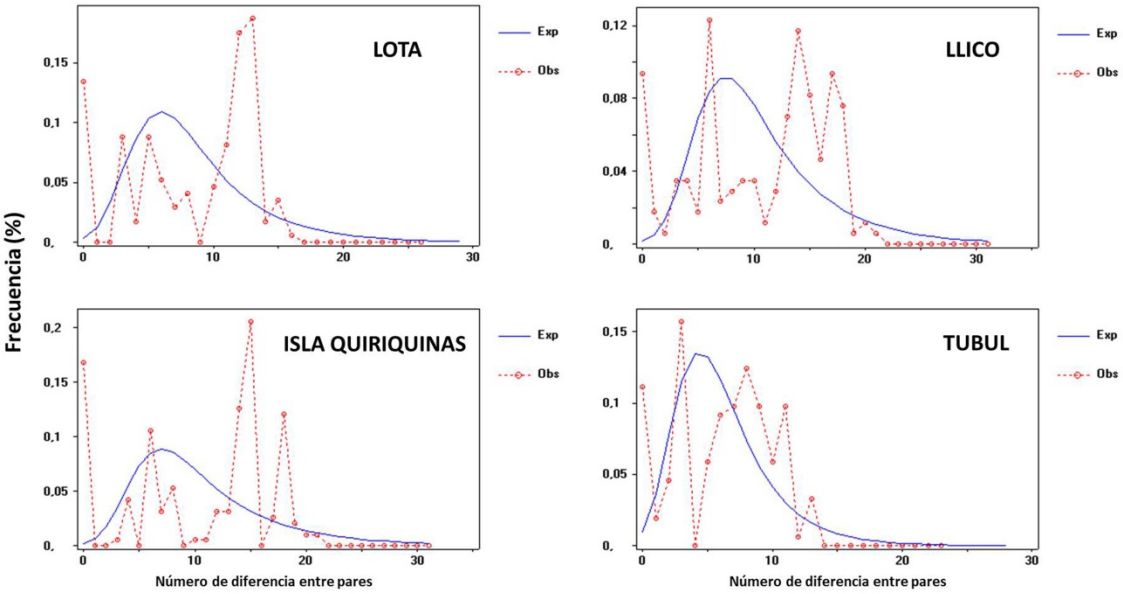


Fig. 20. Gráfico de distribución mismatch por localidad para *Mytilus galloprovincialis* dentro de la región del Biobío (CHILE), basado en las secuencias de mtDNA del gen COI.

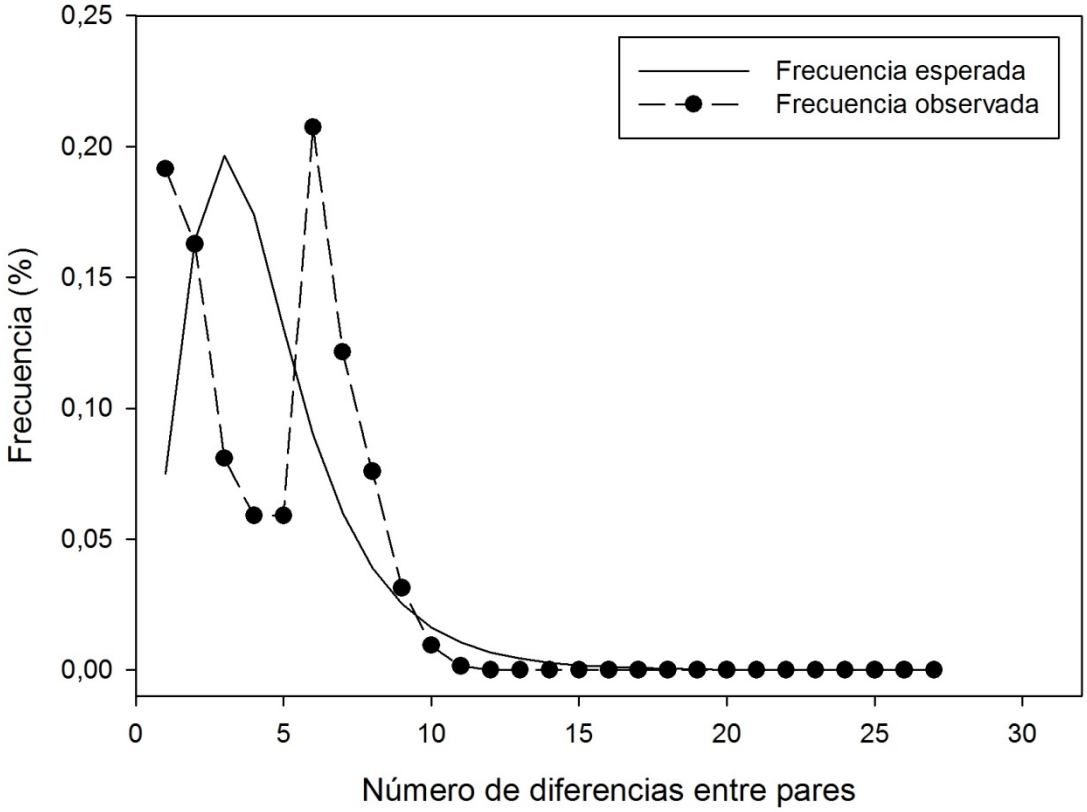


Fig. 21. Gráfico de distribución mismatch de haplotipos para las localidades muestreadas donde habita *Mytilus galloprovincialis* dentro de la región del Biobío (CHILE), basado en las secuencias de mtDNA del locus 16S.

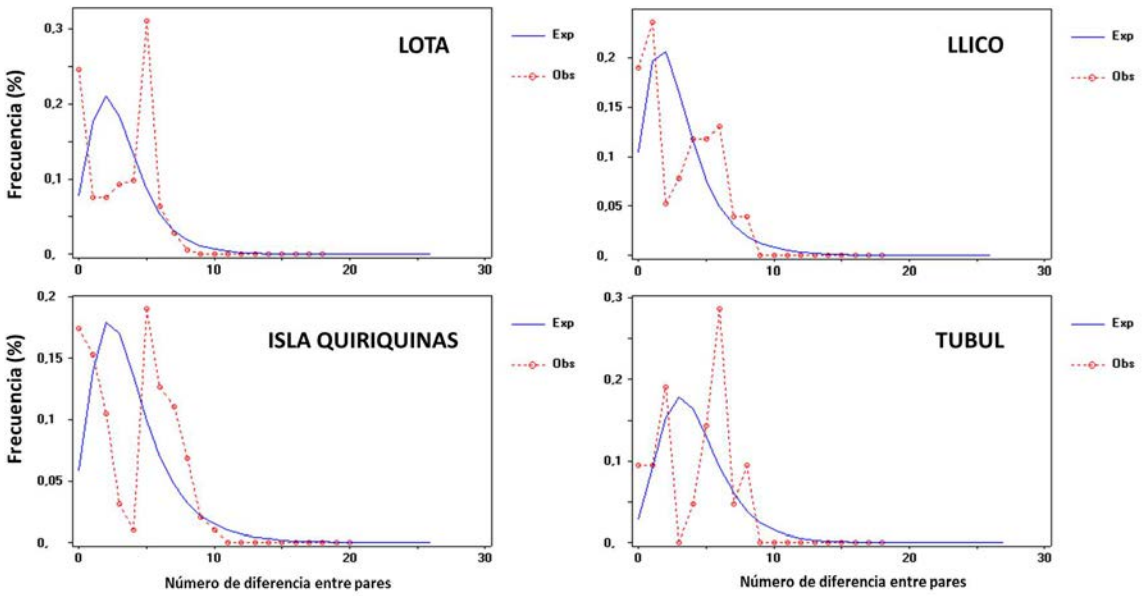


Fig. 22. Gráfico de distribución mismatch por localidad para *Mytilus galloprovincialis* dentro de la región del Biobío (CHILE), basado en las secuencias de mtDNA del 16S.

4.3.2.4. Redes de haplotipos y redes filogenéticas para *Mytilus galloprovincialis*

En las Figuras 23 y 24 se muestran los resultados de los análisis de redes de *Mytilus galloprovincialis* con el marcador mitocondrial COI. Basándonos en la teoría que indica que una forma estructurada de la red de haplotipos, con muchos haplotipos predominantes, tal como se observa en la figura 23, indican un modelo de población constante ya que se observan seis haplotipos compartidos entre localidades de los 14 totales. Dado que la especie fue introducida recientemente, esto revela que estos haplotipos probablemente representan distintos episodios de entrada de este molusco a la costa del país. Del mismo modo, la red filogenética (Figura 24), aparece estrucurada, al representarse todos los haplotipos como saliendo desde distintos orígenes.

Por su parte, en las figuras 25 y 26 se muestran los resultados de los análisis de redes de *Mytilus galloprovincialis* con el marcador mitocondrial DNA16S. Estos análisis muestran una mayor tendencia hacia la estructuración filogeográfica comparada a aquella obtenida con el marcador mitocondrial COI, corroborando las inferencias hechas sobre COI.

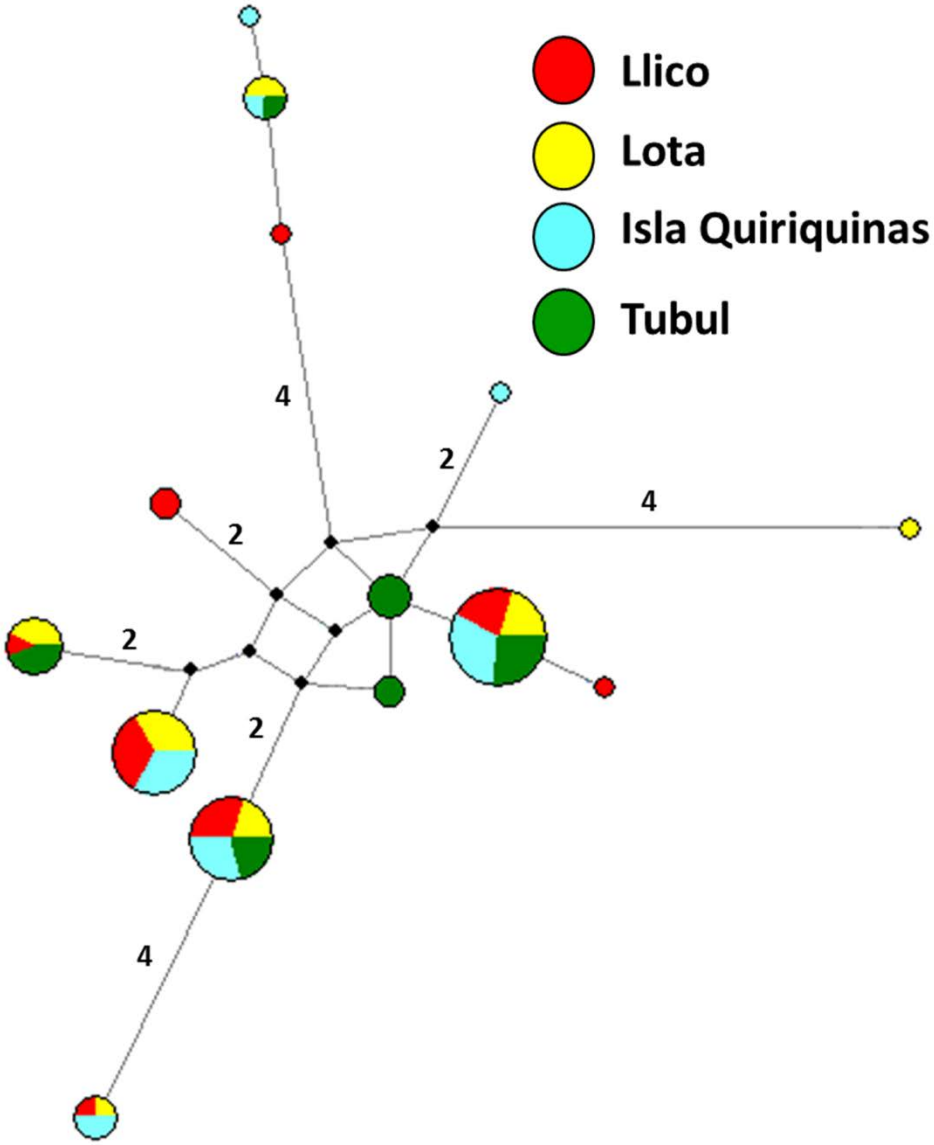


Fig. 23. Red de haplotipos para el gen mitocondrial COI obtenido mediante el método Median joining.

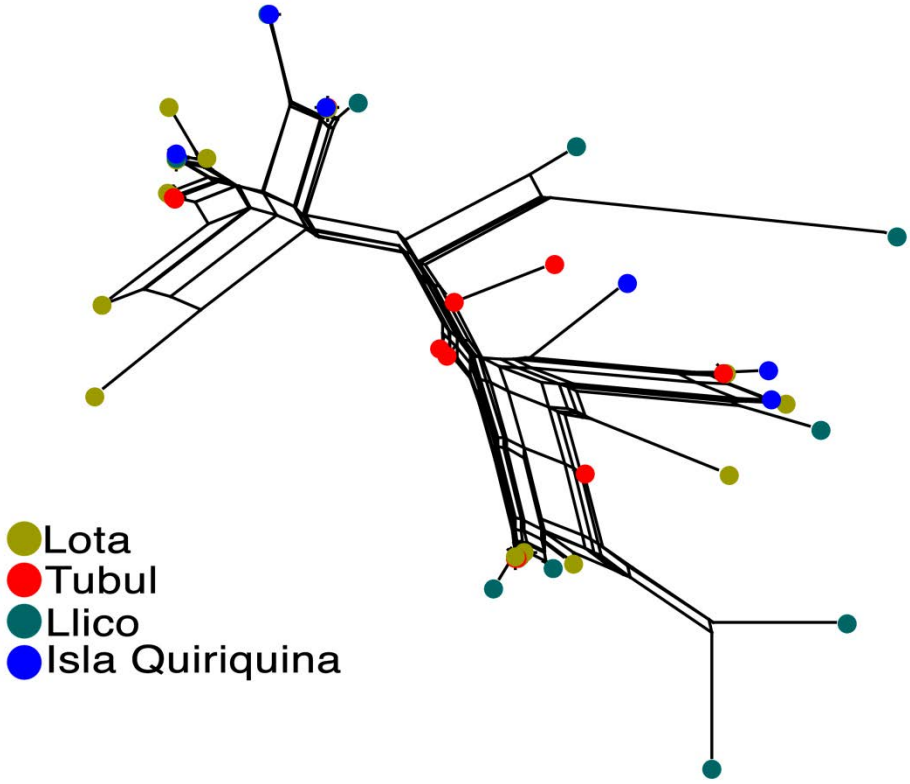


Fig. 24. Red filogenética entre los choritos de la especies *Mytilus galloprovincialis* que habitan la región del Biobio. Basado en los datos del gen COI.

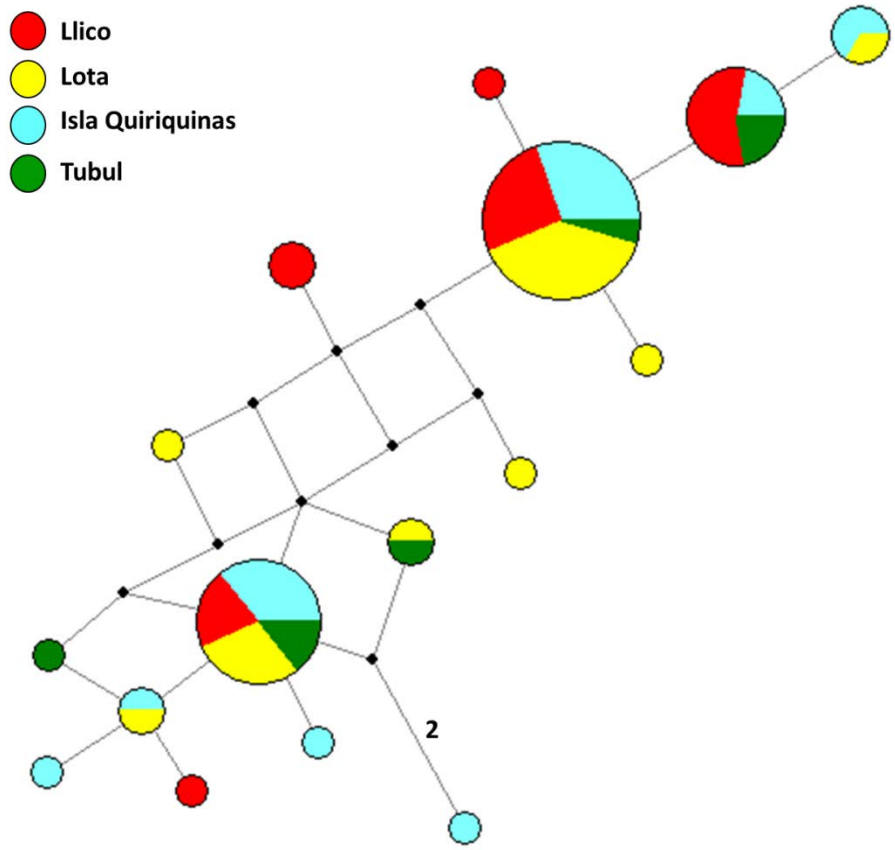


Fig. 25. Red de haplotipos para el locus 16S obtenido mediante el método median joining. Los colores muestran los haplotipos encontrados en cada localidad.

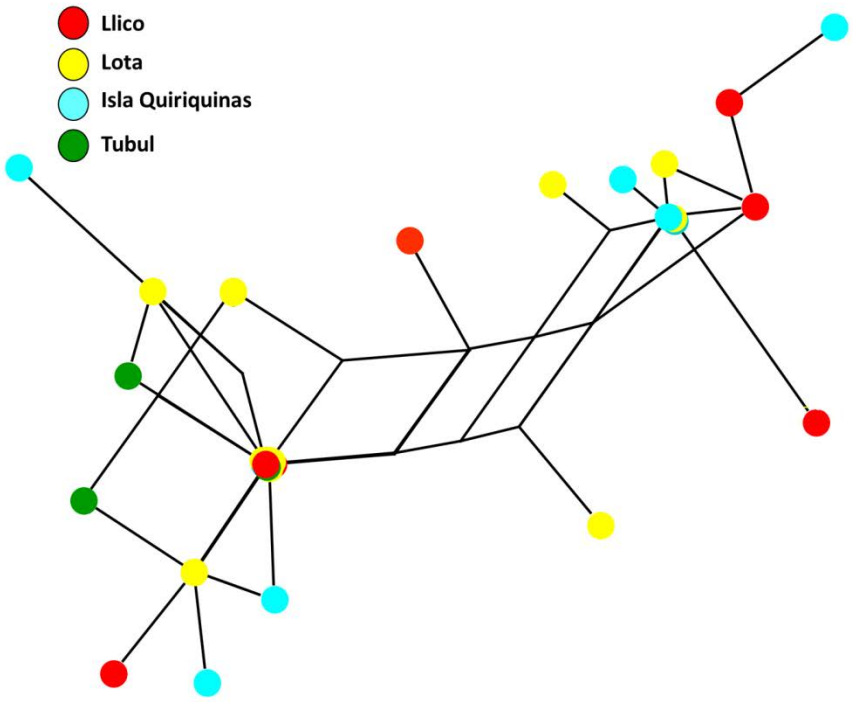


Fig. 26. Red filogenética entre los choritos de la especies *Mytilus galloprovincialis* que habitan la región del Biobio. Basado en los datos del gen 16S.

4.4. Resultado del análisis de Riesgo

Este analisis tuvo como objetivo evaluar la factibilidad de realizar programas de repoblamiento y cultivo en zonas geográficas no utilizadas actualmente. Para ello se realizó un análisis interno con las Fortalezas y Debilidades y otro externo con las Oportunidades y Amenazas. Con la utilización de los resultados proporcionados en esta investigación se contruyeron dos matrices FODA: uno desde el punto de vista de la Biodiversidad (Fig.27) y otro desde el punto de vista productivo exclusivamente para la especie endémica *Mytilus chilensis* (Fig. 28).

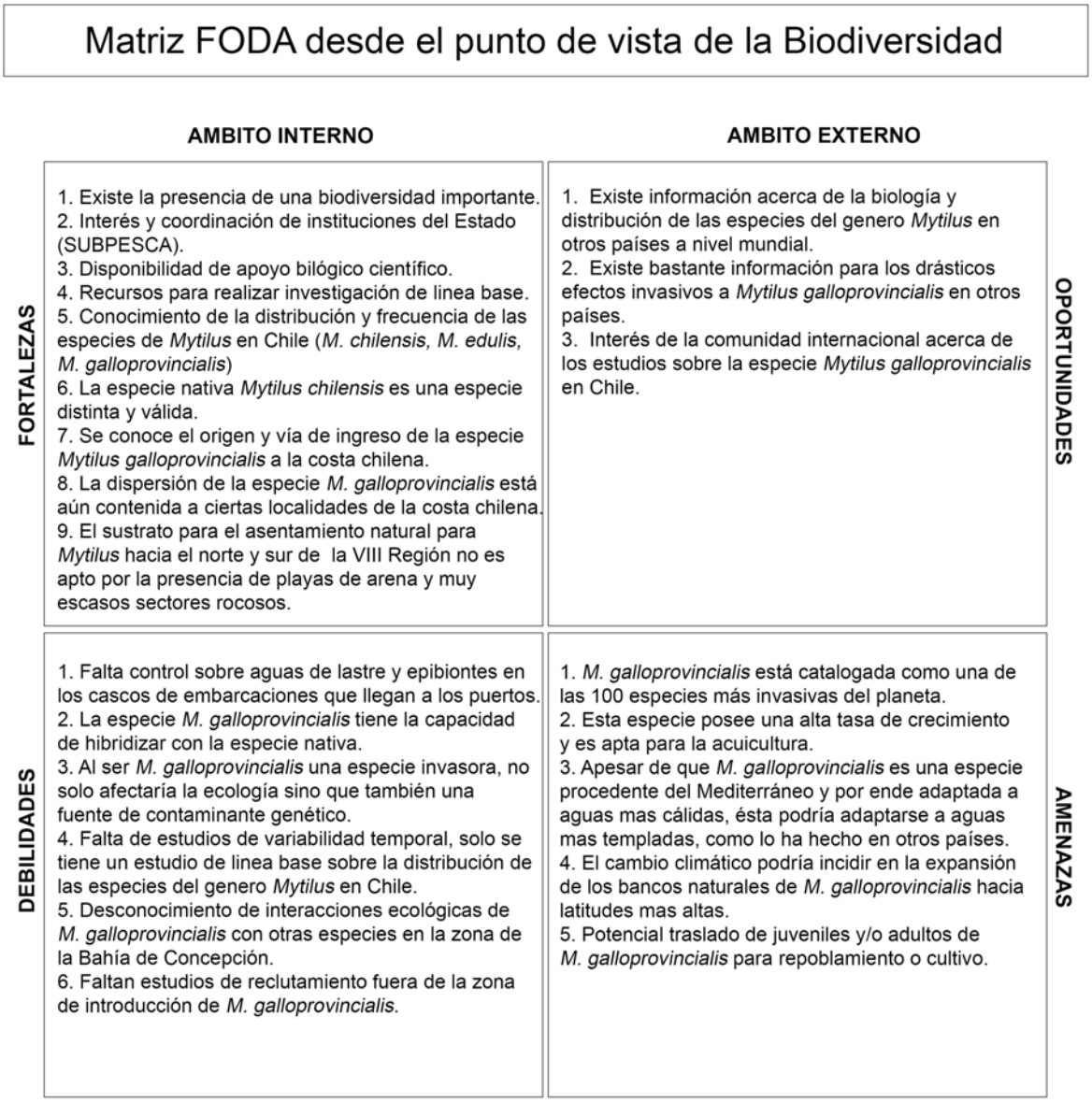


Fig. 27. Matriz FODA: Impacto sobre la biodiversidad.

Matriz FODA desde el punto de vista Productivo de *M. chilensis*

	AMBITO INTERNO	AMBITO EXTERNO
FORTALEZAS / OPORTUNIDADES	1. La especie nativa *Mytilus chilensis* es una especie distinta y válida y además tiene una alta producción a través de la acuicultura en Chile, con reconocimiento internacional. 2. Existe interés y coordinacion de Instituciones del Estado (SUBPESCA). 3. Disponibilidad de apoyo bilógico científico. 4. Se conoce la distribución y frecuencia de las especies de *Mytilus* no nativas en Chile. 5. La especie *M. galloprovincialis* actualmente se encuentra contenida principalmente a la VIII Región. 6. *M. galloprovincialis* es una especie procedente del Mediterráneo y por ende adaptada a aguas marinas más cálidas que las de la X Región.	1. Información acerca de la biología y distribución de las especies del genero *Mytilus* a nivel mundial. 2. *Mytilus chilensis* posee un renombre y un buen mercado internacional. 3. Existe un mercado externo para especies del genero *Mytilus*. 4. La tasa de crecimiento y potencial reproductivo es mayor en la especie *M. galloprovincialis* que en *M. chilensis*. 5. A nivel internacional *M. galloprovincialis* se cultiva principalmente en España de donde es también nativa.
DEBILIDADES / AMENAZAS	1. Por su alta tasa de crecimiento y potencial reproductivo *M. galloprovincialis* puede llegar a ser de interés para los acuicultores en la zona sur-austral de Chile. 2. Potencial interés para el traslado de semillas desde la VII Región hacia la X región por una reducción por una reducción en la captación de semilla de *M. chilensis*. 3. Falta de estudios de variabilidad temporal, solo se tiene estudios de línea base sobre la distribuciín de las especies del genero *Mytilus* en Chile. 4. Falta de información y conocimiento del tema. 5. Realizar cultivo de *M. galloprovincialis* en la VIII Región, lo que incrementaría la cantidad de larvas emitidas al ambiente.	1. Nuevas introducciones a través de aguas de lastre o epibiontes en las embarcaciones que llegan a puerto. 2. Baja en la disponibilidad de juveniles para el cultivo de *M. chilensis*. 3. *M. galloprovincialis* está catalogada como una de las 100 peores especies mas invasivas del planeta. 4. Esta especie posee una alta tasa de crecimiento y es apta para la acuicultura. 5. Incertidumbre acerca de los efectos del cambio climático. 6. Existen otras especies exóticas con un fuerte arraigo en las economías local y nacional.

Fig. 28. Matriz FODA: Desde el punto de vista Productivo de *Mytilus chilensis*.

5. DISCUSIÓN

5.1. Delimitación de especies

Los análisis filogenéticos sustentan la monofilia de *Mytilus chilensis* (Hupé 1954) con fuertes soportes (Fig. 3). Además, se demuestra una clara separación entre las seis especies de *Mytilus*, es decir (1) *M. coruscus*, (2) *M californianus*, (3) *M. trossulus*, (4) *M edulis*, (5) *M. galloprovincialis* y (6) *M. chilensis*. Por otro lado, los análisis de delimitación de especies (bGMYC y PTP) validaron estos resultados (Fig. 2). En este sentido los marcadores mitocondriales tuvieron un mayor poder resolutorio que el marcador nuclear (Fig. 4). Este hecho concuerda con la literatura reciente donde se indica que los marcadores mitocondriales serian más sensibles para delimitar especies complejas que los marcadores nucleares (Ritchie et al. 2016). Es importante destacar que estos son los primeros resultados filogenéticos que validan el estatus específico del mejillón chileno. Asi como también es el primer resultado de delimitación de especies dentro de este grupo. Aunque Gerard et al. (2008) utilizan COI y 16S para la reconstrucción filogenética, no realizarón análisis de delimitacion de especies ni tampoco un analisis con los datos concatenados. El mismo análisis de Gerárd et al. (2008) lo realizaron Astorga et al. (2015). Probablemente por esta razón no se mostraron los linajes de *Mytilus* en dichos estudios. Sin embargo, Astorga et al. (2015) proponen hacer un cambio en la taxonomía del mejillón chileno. Mediante los resutados de este proyecto consideramos que no es correcto dicho cambio taxonómico, precisamente porque *Mytilus chilensis* corresponde a un taxón diferente a los descritos para el hemisferio Norte (i.e. *M. trossulus*, *M. edulis* y *M. galloprovincialis*). Resultados similares han sido descritos por Oyarzún (2016) quien mediante dos vías de delimitación empírica de especies (uno basado en coalescencia y otro en

aislamiento reproductivo), valida el estatus específico del mejillón chileno. Además, afirma que *Mytilus platensis*, corresponde a una sinonimia de *Mytilus edulis*. Precisamente el denominado *M. platensis* ha sido erróneamente confundido con el mejillón chileno (e.g. Gaitán-Espítia et al. 2016). Por otro lado, se corrobora la presencia de *Mytilus galloprovincialis* en los sitios localizados en la región del Biobio. Es decir, los mejillones que habitan alrededor de Concepción corresponden a la misma especie que habita España. Como consecuencia general de lo anterior, la afirmación de Astorga et al 2015 "Following the rules of taxonomic priority, the name frequently used in the literature for samples from the Chilean coast (*Mytilus chilensis*) would cease to be used" (Siguiendo las reglas de prioridad taxonómica, el nombre frecuentemente utilizado en la literatura para muestras de la costa chilena (*Mytilus chilensis*) debería dejar de ser utilizado) no es correcta ya que: 1) los autores no realizan una delimitación empírica de las especies, sino mas bien evaluan hipótesis previas como las de Hilbish et al. (2000) y Gérard et al. (2008) y 2) de acuerdo a nuestros análisis e investigación *M. platensis* no es sinómimo de *M. chilensis*, sino de *M. edulis*.

En conclusión y de acuerdo a todos nuestros análisis: a) *M. chilensis* es una especie taxonómica y filogenéticamente válida para las costas de Chile; b) *M. galloprovincialis* es una especie introducida en Chile y claramente diferenciada de *M. chilensis*. Además es necesario resaltar que para determinar las especies se debe utilizar herramientas moleculares, ya que aparentemente no existen diferencias morfológicas que distingan robustamente ambos taxones (Oyarzún et al. 2014b, Illesca 2015). Para esta finalidad las herramientas moleculares que se recomiendan son los ensayos RFLP del gen de la proteína adhesiva del pie (Santaclara et al. 2006) y el ensayo RFLP del amplicón mitocondrial COIXba (Fernández-Tajes et al. 2011).

La validez del estatus específico de *Mytilus chilensis* ha sido referido en varias ocasiones bajo diversas perpectivas. Martínez-Lage et al. (2005) basandose en una reconstruccion filogenética obtenido de datos DNAs de animales extraídos de la costa de Europa y Chile, afirman lo siguiente: "These results support the taxonomy of Lamy (1936), who proposed that *M. chilensis* is a species apart from *M. edulis* and *M. galloprovincialis* (estos resultados apoyan la taxonomía de Lamy (1936), quien propuso que *Mytilus chilensis* es una especie aparte de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*). De igual forma lo realizan Ouaggajou et al. (2011) cuando comparan los resultados de nueve microsatelites: "lack of efficient amplification of many of these microsatellite loci in other *Mytilus* species suggests that *M. chilensis* is a valid, distinct species within the genus" (la falta de una eficiente amplificacion de muchos de estos microsatelites en las otras especies de *Mytilus* sugieren que *Mytilus chilensis* es una especies valida y distinta dentro del género). Por otro lado, Oyarzún et al (2014a) estudiaron las diferencias de la ultraestructura espermatica en las especies del complejo *Mytilus edulis*. Estos son considerados caracteres taxonómicos debido a que estan involucrados en el aislamiento reproductivo. Los resultados de esta investigacion apunta que *Mytilus chilensis* posee caracteristicas espermáticas unicas y por tanto sustenta el estatus específico de este mejillón. En conclusión, es evidente en la literatura moderna la existencia de informacion que sustenta el estatus especifico de *Mytilus chilensis*. Y a la luz de nuestros resultados concluimos que es así.

Los resultados de la delimitación de especies se plasmaran en un artículo científico que se encuentra en estado de preparación. Este manuscrito se esta confeccionado en conjunto con un investigador extranjero, que ha trabajado arduamente en el área, hablamos del Dr. Jonathan Gardner. El titulo de este manuscrito se encuentra en las referencias (Oyarzún et al. en

preparación). La finalidad de publicar parte de estos resultados radica principalmente en mostrar estos interesantes resultados y validarlos ante la comunidad científica.

5.2. Hibridación

Los resultados de este proyecto revelan que existe un bajo nivel de hibridación en la costa chilena (2,7%). Resultados similares fueron registrados hace dos años por Toro y Oyarzún (2014). Probablemente esto se debe a que existen pocas zonas de contacto biogeográfico. No obstante, la hibridación que se evidencío en la región de Biobio (Mg/Mc) probablemente se deba a: (1) traslados con fines productivos de *M. chilensis* proveniente de Chiloé a Concepción (comn. person. pescadores artesanales región del Biobio) que al parecer fueron realizados en la decada pasada. Y (2) traslado de especimenes producida por la remoción marina dada por eventos estocásticos (como tsunami) lo cuales han provocado cambios biogeográficos importantes en la zona costera del Biobio. Sin embargo, es importante mantener un monitoreo respecto a las zonas de solapamiento biogeográfico, ya que se desconocen los efectos que podria tener la hibridación en la acuicultura nacional. Sin embargo, la hibridación entre especies endémicas y foraneas involucra una invasión al genoma del mejillon chileno (Oyarzún et al. 2016a). Aunque se desconocen las consecuencias de este fenómeno molecular, probablemente el aumento de animales híbridos en poblaciones puras podria intervenir en el normal desarrollo gonadal, considerando que cuando se ha evaluado el *ouput* reproductivo entre especies puras e hibridas, los mayores valores han sido registrados para el taxon puro (Toro et al. 2002).

La determinación de animales híbridos interespecíficos ha sido un desafio para los investigadores. No obstante, las metodologías apropiadas para comprender la hibridación en

mejillones azules han sido los ensayos RFLP y el análisis del polimorfismo de un gen-específico (i.e. gen del proteína del pie – Inoue et al. 1995). Nosotros en esta investigación hemos utilizado ambas aproximaciones moleculares por dos razones: (1) actualmente es la metodología molecular de mayor uso en los manuscritos científicos (i.e. Beaumont et al. 2008, Elliott et al. 2008, Gosling et al. 2008, Brannock y Hilbish 2010, Brook y Farmen 2013, Oyarzún et al. 2016). (2) Consideramos relevante utilizar un metodología validada en la literatura científica moderna para asi poder comparar estos resultados con los reportados en otras regiones costeras del mundo. Especificamente la técnica de biología molecular denominada PCR-RFLP (reacción en cadena de la polimerasa seguida por la digestión con enzimas de restricción), ha demostrado ser útil para el diagnóstico de mutaciones puntuales causada por el cambio de una base nitrogenada, pequeña deleción o inserciones que crean o bien, destruyen un sitio de restricción. Se basa en la deteccion de fragmentos de ADN de distinto peso molecular, de manera que mediante el análisis de los polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción, es posible determinar la presencia o no de la mutación, y por tanto el genotipo del individuo.

Por su parte, un análisis visual de los electroferogramas sirve para descubrir facilmente algunas mutaciones que pueden tener las secuencias. Sin embargo para ello, el electroferograma debe ser de buena calidad mostrando *picks* únicos, bien separados entre sí, y con poco ruido de fondo. En primera instancia, el análisis del electroferograma aparece como una técnica mas directa, no obstante, no permite distinguir entre un heterocigoto y un hibrido, que es el objetivo de este proyecto en el sentido de detectar hibridos entre *M. galloprovincialis* y *M. chilensis*. Se optó entonces por un análisis de PCR-RFLP usando la técnica convencional de PCR amplificando el segmento Me y luego cortando con la enzima de restricción *Aci I*. De hecho

esta técnica permitio a Tarifeño et al. (2012) detectar a *M. galloprovincialis* en Chile, asi como a otros autores describir animales híbridos en el hemisferio Norte (Hilbish et al. 2010, 2012).

Por otro lado, el alto grado de hibridación reportado en el estrecho de Magallanes es similar a los registros en Japón y Europa (Brannock et al. 2010, Hilbish et al. 2010). No obstante, la hibridación tiene una directa relación con la presencia de multiples especies en la zona híbrida (área aledaña al puerto de Punta Arenas). Precisamente este puerto es uno de los que tiene mayor tráfico marítimo en el país. En este contexto, es importante profundizar los conocimientos respecto a los factores bióticos y abióticos que sustentan esta zona híbrida ya que aunque desconocemos el tiempo de esta zona híbrida, debemos comprender rapidamente si este es un fenómeno que persistirá o bien corresponde a un evento de hibridación esporádico que pudiese desaparecer en el corto plazo.

5.3. Filogeografía

Los análisis poblacionales muestran una alta diversidad genética en el chorito endémico (*Mytilus chilensis* - Tabla 7 y 8). De los resultados demográficos se puede inferir que la tendencia poblacional de *Mytilus chilensis* fue al aumento desde el período postglacial, tendencia que se ha demostrado también en otro grupos animales del extremo Sur de Sudamérica (i.e. *Concholepas concholepas* – Cárdenas et al. 2009). Esto indica de que *Mytilus chilensis* a lo menos habita la costa chilena desde hace 15000 años. Ademásm se revela que existe una alta conexión genética entre las localidades estudiadas y por tanto no se evidencia una estructura poblacional. Estudios previos señalan resultados similares (Toro et al. 2004a; Toro et al. 2006; Larraín et al. 2014; Araneda et al. 2016). Probablemente el frecuente

movimiento de animales debido a la actividad mitilicultora (desde centros de captación a centros de engorda) ha ayudado a que el flujo génico sea mayor entre las localidades.

Por otro lado, el análisis poblacional revelo que la diversidad genética de *Mytilus galloprovincialis* es menor que la de *M. chilensis*. Además, los análisis demográficos y filogeograficos indicarian que la introducción de esta especie en Chile es reciente y probablemente ha tenido varios episodios. Precisamente *M. galloprovincialis* se encuentra en Chile en localidades cercanas a uno de los puertos más importantes del país, es decir, el puerto de Talcahuano. Por tanto, existe una alta probabilidad de que la introducción de esta especie se deba al tráfico marítimo. Hay que considerar el alto tráfico maritimo que se ha mantenido entre Europa y América desde el siglo XIX. Por lo tanto estos resultados sientan las bases para futuras investigaciones con el objetivo de comprender cuales son los límites geográficos que mantienen a *M. galloprovincialis* en esta reducida area costera.

5.4. Análisis de riesgo desde el punto de vista productivo y de la biodiversidad

La industria mitilicultora en Chile actualmente se basa en la especie nativa *Mytilus chilensis*, la que ha tenido un enorme incremento en las últimas décadas con producciones de 3.864 ton el año 1993 a sobre las 288.000 ton el año 2011 y una leve baja a 238.000 ton el año 2014 (Sernapesca, 2014). La reciente descripción de nuevas especies del genero *Mytilus* en las costa chilena (Daguin y Borsa 2000; Toro et al. 2005; Larrain et al. 2012; Tarifeño et al. 2012; Oyarzún et al. 2016) pudiese tener potenciales impactos para la especie nativa, al llevar a cabo actividades asociadas con el cultivo, como al traslado de semilla, de adultos y utilización de nuevas áreas geográficas para llevar a cabo el cultivo. Los posibles efectos que estas nuevas especies del genero *Mytilus* descritas para la costa chilena están relacionados con posibles

expansiones de las mismas a nivel latitudinal, procesos de hibridación, introgresión, competencia por alimento y espacio. Además, posible introducción de parásitos, dinoflagelados o diatomeas que producen florecimientos algales nocivos (FAN) etc.

Las especies descritas del género *Mytilus* en ésta investigación para la costa chilena son:

***Mytilus chilensis* (Hupé 1854):** Es la especie del genero *Mytilus* que es nativa de la costa chilena, y es un organismo que tiene mucha importancia económica, no solo por su alta producción a través de la acuicultura, sino que también como generador de principios activos usados en biotecnología (Diaz y Neira 2005; Arenas et al. 2006). Estos aspectos hacen que la posición taxonómica de este mitílido sea importante, ya que cada especie de mitílido tiene, además de sus usos biotecnológicos, diferente palatabilidad y textura, caracteres muy valiosos para efectos de su comercialización. (Aiken 1998; Rego et al. 2002; Farias, 2008; Dias et al. 2011). Recientemente la adopción de la cadena alimentaria (trazabilidad) o el concepto "from farm to fork" hace que la identificación de la especie y su origen sea aún mas valioso y necesario (Negrini et al. 2008; Ogden 2008; Larraín et al. 2014). Publicaciones científicas recientes sobre el estatus taxonómico de la especie nativa Chilena, *Mytilus chilensis*, han corroborado a esta especie como distinta de las otras especies del genero *Mytilus* y como una especie válida (Cárcamo et al. 2005; Santaclara et al. 2006; Fernández-Tajes et al. 2011; Ougajjou et al. 2011; Larrain et al. 2012; Tarifeño et al. 2012; Toro et al. 2012; Oyarzún et al. 2014; Larraín et al. 2014; Astorga et al. 2015; Araneda et al. 2016; Oyarzún et al. 2016; Valenzuela et al. 2016 y el presente Informe).

***Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758):** es una especie dominante de altas latitudes en aguas frías del océano Atlántico, costa este de Estados Unidos y Canadá, el norte de Europa, Argentina, the

Falkland Islands, y Kerguelen Island (Gosling, 2015). El presente proyecto describe la presencia de esta especie en el Estrecho de Magallanes, con una mayor frecuencia de la especie hacia el sector Atlántico del Estrecho (ver objetivo 1). Esta especie no ha sido descrita como especie invasora y se encuentra, dado a que es una especie de aguas frias, establecida principalmente en el sector este del Estrecho de Magallanes. Se observa la presencia de una clina que permite determinar una mayor frecuencia de la especie (*Mytilus edulis*) desde el Atlántico disminuyendo hacia la zona más central del Estrecho (Oyarzún et al. 2016). Una característica importante que tiene esta especie y como todas las del genero *Mytilus*, es la tener el potencial de hibridizar con otras especes del género, entre ellas *Mytilus chilensis* (Oyarzún et al. 2016).

***Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819):** esta especie, originaria del Mar Mediterraneo (Barzotti y Meluzzi, 1968; Anderson et al. 2012), vive en ambientes del intermareal y submareal (Gosling 2015). *M. galloprovincialis*, tiene actualmente una amplia distribución a nivel mundial en aguas cálidas y temperadas, se ecuentra en los países del Mar Mediterraneo, pero también ha colonizado y/o introducido en Irlanda, Reino Unido, norte de Africa (sector Atlántico), Océano Pacífico Oeste (Estados Unidos y Canadá), México, Japón, Hong Kong, Africa del Sur, Australia, Nueva Zelanda y en la zona central de la costa chilena (Seed 1992; Daguin y Borsa, 2000; Branch y Steffani, 2004; Toro et al. 2005; Braby y Somero, 2005; Borsa et al. 2012; Westfall et al. 2010; Larraín et al. 2012; Tarifeño et al. 2012; Gosling 2015). En Chile se ha descrito en la literaura científica la existencia de *M. galloprovincialis* principalmente en la costa central (VIII Región) (Toro et al. 2005; Ruiz et al. 2008; Wesfall y Gardner, 2010; Ouagajjo et al. 2011; Larraín et al. 2012; Borsa et al. 2012; Tarifeño et al. 2012, Toro y Oyarzún 2014), y algunos ejemplares en la X y XII Regiones (Toro et al. 2005; Borsa et

al. 2012; Oyarzún et al. 2016). Una característica importante de esta especie, es la capacidad de hibridizar con otras especies del mismo genero (*Mytilus trossulus, Mytilus edulis, Mytilus chilensis*) (Skibinski y Roderick 1991; Comesaña et al. 1998; Daguin et al. 2001; Bierne et al. 2003; Gilg y Hilbish 2004; Shields et al. 2010; Westfall y Gardner 2010; Toro et al. 2012; Larraín et al. 2012; Assis et al. 2015; Gardner et al. 2016; Oyarzún et al. 2016a). Sin embargo, una característica mucho más importante de esta especie es la de haber sido declarada recientemente una de las 100 peores especies invasoras en el mundo (McQuaid y Phillips 2000; Lowe et al. 2000; Robinson 2002; Branch y Steffani, 2004; Bownes y McQuaid 2006; Lowe et al. 2004; Braby y Somero, 2006; Shinen y Morgan 2009; Hilbish et al. 2010; Bownes y McQuaid 2010; Hockey y Erkom 2010; CABI 2011; Mead et al. 2011; Preda 2012; GISD 2012; Green, 2014; Crego-Prieto et al. 2015).

100 OF THE WORLD'S WORST INVASIVE ALIEN SPECIES

MICRO-ORGANISM

avian malaria	*(Plasmodium relictum)*
banana bunchy top virus	*(Banana bunchy top virus)*
rinderpest virus	*(Rinderpest virus)*

MACRO-FUNGI

chestnut blight	*(Cryphonectria parasitica)*
crayfish plague	*(Aphanomyces astaci)*
Dutch elm disease	*(Ophiostoma ulmi)*
frog chytrid fungus	*(Batrachochytrium dendrobatidis)*
phytophthora root rot	*(Phytophthora cinnamomi)*

AQUATIC PLANT

caulerpa seaweed	*(Caulerpa taxifolia)*
common cord-grass	*(Spartina anglica)*
wakame seaweed	*(Undaria pinnatifida)*
water hyacinth	*(Eichhornia crassipes)*

LAND PLANT

African tulip tree	*(Spathodea campanulata)*
black wattle	*(Acacia mearnsii)*
Brazilian pepper tree	*(Schinus terebinthifolius)*
cogon grass	*(Imperata cylindrica)*
cluster pine	*(Pinus pinaster)*
erect pricklypear	*(Opuntia stricta)*
fire tree	*(Myrica faya)*
giant reed	*(Arundo donax)*
gorse	*(Ulex europaeus)*
hiptage	*(Hiptage benghalensis)*
Japanese knotweed	*(Fallopia japonica)*
Kahili ginger	*(Hedychium gardnerianum)*
Koster's curse	*(Clidemia hirta)*
kudzu	*(Pueraria montana var. lobata)*
lantana	*(Lantana camara)*
leafy spurge	*(Euphorbia esula)*
leucaena	*(Leucaena leucocephala)*
melaleuca	*(Melaleuca quinquenervia)*
mesquite	*(Prosopis glandulosa)*
miconia	*(Miconia calvescens)*
mile-a-minute weed	*(Mikania micrantha)*
mimosa	*(Mimosa pigra)*
privet	*(Ligustrum robustum)*
pumpwood	*(Cecropia peltata)*
purple loosestrife	*(Lythrum salicaria)*
quinine tree	*(Cinchona pubescens)*
shoebutton ardisia	*(Ardisia elliptica)*

LAND PLANT (CONTINUED)

Siam weed	*(Chromolaena odorata)*
strawberry guava	*(Psidium cattleianum)*
tamarisk	*(Tamarix ramosissima)*
wodelia	*(Sphagneticola trilobata)*
yellow Himalayan raspberry	*(Rubus ellipticus)*

AQUATIC INVERTEBRATE

Chinese mitten crab	*(Eriocheir sinensis)*
comb jelly	*(Mnemiopsis leidyi)*
fish hook flea	*(Cercopagis pengoi)*
golden apple snail	*(Pomacea canaliculata)*
green crab	*(Carcinus maenas)*
marate clam	*(Potamocorbula amurensis)*
Mediterranean mussel	*(Mytilus galloprovincialis)*
Northern Pacific seastar	*(Asterias amurensis)*
zebra mussel	*(Dreissena polymorpha)*

LAND INVERTEBRATE

Argentine ant	*(Linepithema humile)*
Asian longhorned beetle	*(Anoplophora glabripennis)*
Asian tiger mosquito	*(Aedes albopictus)*
big-headed ant	*(Pheidole megacephala)*
common malaria mosquito	*(Anopheles quadrimaculatus)*
common wasp	*(Vespula vulgaris)*
crazy ant	*(Anoplolepis gracilipes)*
cypress aphid	*(Cinara cupressi)*
flatworm	*(Platydemus manokwari)*
Formosan subterranean termite	*(Coptotermes formosanus shiraki)*
giant African snail	*(Achatina fulica)*
gypsy moth	*(Lymantria dispar)*
khapra beetle	*(Trogoderma granarium)*
little fire ant	*(Wasmannia auropunctata)*
red imported fire ant	*(Solenopsis invicta)*
rosy wolf snail	*(Euglandina rosea)*
sweet potato whitefly	*(Bemisia tabaci)*

AMPHIBIAN

bullfrog	*(Rana catesbeiana)*
cane toad	*(Bufo marinus)*
Caribbean tree frog	*(Eleutherodactylus coqui)*

FISH

brown trout	*(Salmo trutta)*
carp	*(Cyprinus carpio)*
large-mouth bass	*(Micropterus salmoides)*

FISH (CONTINUED)

Mozambique tilapia	*(Oreochromis mossambicus)*
Nile perch	*(Lates niloticus)*
rainbow trout	*(Oncorhynchus mykiss)*
walking catfish	*(Clarias batrachus)*
Western mosquito fish	*(Gambusia affinis)*

BIRD

Indian myna bird	*(Acridotheres tristis)*
red-vented bulbul	*(Pycnonotus cafer)*
starling	*(Sturnus vulgaris)*

REPTILE

brown tree snake	*(Boiga irregularis)*
red-eared slider	*(Trachemys scripta)*

MAMMAL

brushtail possum	*(Trichosurus vulpecula)*
domestic cat	*(Felis catus)*
goat	*(Capra hircus)*
grey squirrel	*(Sciurus carolinensis)*
macaque monkey	*(Macaca fascicularis)*
mouse	*(Mus musculus)*
nutria	*(Myocastor coypus)*
pig	*(Sus scrofa)*
rabbit	*(Oryctolagus cuniculus)*
red deer	*(Cervus elaphus)*
red fox	*(Vulpes vulpes)*
ship rat	*(Rattus rattus)*
small Indian mongoose	*(Herpestes javanicus)*
stoat	*(Mustela erminea)*

Species were selected for the list using two criteria: their serious impact on biological diversity and/or human activities, and their illustration of important issues of biological invasion. To ensure a wide variety of examples, only one species from each genus was selected. **Absence from the list does not imply that a species poses a lesser threat.**

Development of the *100 of the World's Worst Invasive Alien Species* list has been made possible by the support of the Fondation d'Entreprise TOTAL (1998 - 2000).

For further information on these and other invasive alien species consult The *Global Invasive Species Database*: **www.issg.org/database**

APPENDIX VI Middle School Curriculum

100 WORST GLOBAL INVASIVE SPECIES

Fig. 29. Las 100 peores especies invasoras del mundo. From Global Invasive Species Database (isss.org) (se incluye en invertebrados acuáticos al "Mediterranean mussel" *Mytilus galloprovincialis*).

En la literatura científica existen claras evidencias de los efectos de la introducción accidental (a través de aguas de lastre, fouling) o deliverada (para propósitos de acuicultura)(Mooney & Cleland 2001) en California (Braby y Somero, 2006; Saarman y Pogson, 2015); Canadá (Crego-Prieto et al. 2015); Noruega (Brook y Farmen 2013) y en Sudafrica (McQuaid y Phillips 2000; Robinson et al. 2005; Robinson et al. 2007; Zardi et al. 2008; Bownes y McQuaid 2010; McQuaid et al. 2015; Alexander et al. 2015; Lathlean et al. 2016; Puccinelli et al. 2016; Pollard y Hodgson 2016). En Sudafrica, la introducción de *Mytilus galloprovincialis*, por ejemplo, desplazó a la especie nativa *Aulacomya ater*, debido a la

competencia por sustrato (Branch y Steffani 2004; Steffani & Branch 2005; Hockey y van Erkom 2010) e invadió más de 2000 km de costa desde su introducción anterior al año 1970 (Robinson et al. 2004; Robinson et al. 2005). En la costa de California *M. galloprovincialis* desplazó a la especie nativa *Mytilus trossulus* (Geller 1999; Shinen y Morgan 2009; Tomanec y Zuzow 2010). En Japón *M. galloprovincialis* colonizó la costa e hibridizó con *M. trossulus*, generando también introgresion en varias localidades de la costa japonesa (Brannock 2011).

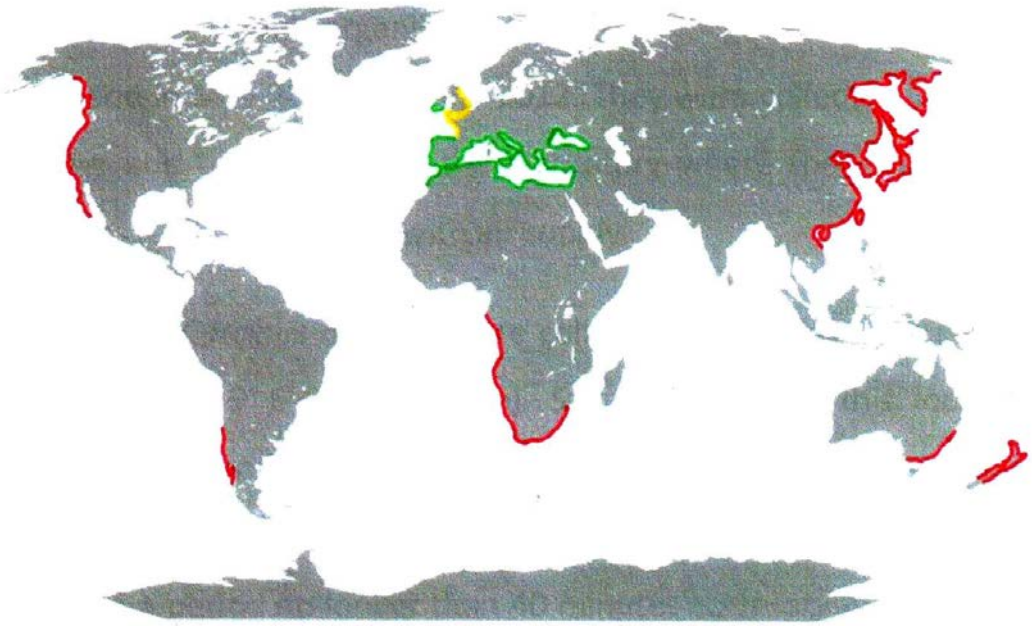


Fig 30. Mapa de distribución de *Mytilus galloprovincialis* (adaptado de GISD & Paiva, 2014). En verde las áreas que representan el rango nativo de la especie, en rojo las áreas en que se ha confirmado su invasión y en Amarillo las áreas que representan posible extensión del rango nativo.

A partir de los extensos muestreos llevados a cabo en l presente proyecto no se detectó la presencia de la especie ***Mytilus trossulus.*** Esta especie habita aguas frias, está decrita para el oceano Pacífico norte, Atlantico norte y Mar Báltico (Gosling 2015). Solo se detectó en el presente proyecto, la presencia de alelos de esta especie, al igual como lo reportan Fernández-

Tajes et al. (2011), Larrain et al. (2012) y Oyarzún et al. (2016a). Ello es un resultado importante ya que *M. trossulus*, a pesar de no estar descrita como una especie invasora, su presencia en áreas donde se cultiva *Mytilus chilensis*, podría causar grandes pérdidas debido a su lenta tasa de crecimiento, su fragilidad valvar (Mallet y Carver 1995; Penney y Hart 1999; Penney et al. 2002, 2006, 2008) y porque además sufre de neoplasia hemolitica, que limita su crecimiento.

Análisis de riesgo: Dentro de las características de estas especies que pudiesen crear riesgos para la especie nativa *Mytilus chilensis*:

- Todas estas especies poseen una alta dispersión larval (flujo génico) que va entre las 3 y 5 semanas, lo que permite desplazarse a través de corrientes oceanicas hasta por sobre 200 km (Suchaneck et al. 1997) y de esta forma colonizar nuevos habitats si las condiciones ambientales son las adecuadas para la especie (Branch y Stefani 2004). Además, el estado de larva planctónica puede sobrevivir en aguas de lastre por algunas semanas según Geller et al. (1994), quienes encontraron larvas de *M. galloprovincalis* en agua de lastre en buques de carga que realizaban el trayecto desde Japón a Oregón (Estados Unidos) (Green 2014; Paiva 2014).

- Las especies *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis*, tienen el potencial de hibridizar con *Mytilus chilensis* (Toro et al. 2012; Larraín et al. 2012; Oyarzún et al. 2016a)

- Las poblaciones de *Mytilus galloprovincilis* en Europa raramente habitan areas donde la temperatura promedio mensual es menor a 9°C, sin embargo, pueden soportar temperaturas incluso por sobre los 26°C (Aral 1997; Anestis 2007; Dutton y Hofmann, 2009; Tomanek y Zuzow 2010; Fly y Hilbish 2013; Fly et al. 2015).

- La mayoría de las poblaciones de *Mytilus edulis* habitan areas de su distribución natural donde la temperatura promedio mínima puede ser menor a 6°C, incluso soportar –10°C (Bourget 1983) y la máxima nunca sobrepasa los 20°C (Fly et al. 2015).

- La tasa de crecimiento de estos organismos está asociada a respuestas fisiológicas que se relacionan con las condiciones ambientales. Estudios comparativos entre algunas de estas especies realizados en condiciones controladas en donde el ambiente esta estandarizado, permiten determinar las tasas de crecimiento entre especies. Koop et al. (2005), comparó el crecimento entre *M. galloprovincialis* y *Mytilus edulis* en Francia, demostrando que *M. galloprovincialis* presentó una significativamente mayor tasa de crecimiento. Se ha descrito que la especie *M. galloprovincialis* posee una tasa de crecimiento mayor que las otras especies del genero *Mytilus* (Hilbish et al. 1994; Penney et al., 2002; Mckinsey et al., 2007, Oyarzún et al. 2013), incluso puede alcanzar los 70 mm de longitud valvar en el primer año de vida (Picker & Griffins, 2011). Camacho et al. (1995) describe que el crecimiento mensual fue de entre 6.3 y 11.5 mm/mes para *M. galloprovincialis* en Galicia, España. Ruiz et al. (2008) describe que el crecimiento larval de *Mytilus galloprovincialis* es superior al de *M. chilensis* en el rango de temperturas de 16 a 20 °C. En un estudio llevado a cabo para determinar el crecimiento larval y juvenil entre las especies *Mytilus chilensis*, *M. galloprovincialis* y sus híbridos, los resultados indican que tanto en longitud de la valva como en peso vivo, los híbridos tuvieron una tasa de crecimiento significativamente mayor a los 5 meses de edad (Toro et al., 2012). En otro estudio en donde se analizó la composición genética a través de microsatélites, se pudo determinar que los híbridos de los cruzamientos (producidos en Toro et al. 2012 entre *Mytilus chilensis* y *M. galloprovincialis*) tenían un

mayor grado de heterocigosidad que los individuos de los cruzamientos de especies puras (Valenzuela et al. 2016), lo que posiblemente le puede entregar ventajas energéticas (Shields et al. 2008; Tremblay et al. 2011).

- Las especies del genero *Mytilus* presentan ciclos anuales de reproducción. En un estudio que compara el ciclo reproductivo anual entre *Mytilus edulis*, *Mytilus trossulus* y sus híbridos naturales (Toro et al. 2002), se observó diferencias en los períodos de desove entre ambas especies, *M. trosulus* desova durante un período de tiempo mucho mas prolongado (entre fines de primavera e inicios de otoño) mientras que *M. edulis* que lo hace en 3 semanas durante el verano. Ello explicaria la presencia del bajo porcentaje de hibridos en esa localidad. Un mayor potencial reproductivo (reproductive output) mostró la especie *M. trossulus* en comparación a *M. edulis*, mientras que los híbridos mostraron valores intermedios (Toro et al. 2002). El tamaño de los ovocitos de *M. trossulus* fue menor que los de *M. edulis* e híbridos, lo que evidencia una estrategia reproductiva distinta (Toro et al. 2002). Otro estudio en la costa sur de Sudafrica, compara el ciclo reproductivo de la especie invasora *M. galloprovincialis* con el de la especie nativa el bivalvo *Perna perna*. Ambas especies tuvieron un desove mayor y otro menor durante el año donde la temperatura fluctuó entre 15.5 ^{o}C y 22 ^{o}C a lo largo del año. El índice gonadosomático (IGS) como una medida del potencial reproductivo, fue mucho mayor en la especie *M. galloprovincialis*, lo que concuerda con lo reportado por otros investigadores (Van Erkom Schurink y Griffiths 1991; Harris et al. 1998). Estudios llevados a cabo en Chile indican que *M. chilensis* tiene un ciclo reproductivo que varía de acuerdo a la latitud (Oyarzún et al 2011), y que presentan mas de un desove anual en los sitios estudiados (Chaihuín, XIV Región y Bahía Yal, X Región). Lopez

(2013), en Pullao, Chiloé también describe mas de un desove anual para *M. chilensis*, con temperaturas que fluctuaron entre los 11 y 16 ^{o}C. Vargas (2012), en un estudio llevado a cabo en Caleta Tumbes (VIII Región), estimó el ciclo reproductivo de *M. galloprovincialis* y *M. chilensis* entre septiembre 2009 y febrero 2011. El análisis cuantitativo llevado a cabo determinó que *M. chilensis* presentó desoves durante el invierno, mientras que *M. galloprovincialis* desovó durante el verano y el invierno. Los promedios de las temperaturas superficiales fluctuaron entre los 10.7 y 17.8 ^{o}C durante el período del estudio. Un resultado que llama la atención fué la presencia de atresia gonadal en hembras de *M. galloprovincialis,* algo muy inusual ya que existen pocos reportes en la literatura para esta especie (Suarez et al. 2007). La frecuencia de la atresia fluctuó entre el 8 y 60 % durante el período del estudio (Vargas 2012). Este fenómeno se asocia a efecto de la temperatura sobre el desarrollo de la gónada, donde existiría una sobremaduración y reabsorción de ésta debido a condiciones desfavorables para el desove (bajas temperaturas y escasez de alimento) (Pipe 1987; Borzone et al. 2003). En el caso de la especie *M. galloprovincialis*, proveniente del mediterraneo y por ende adaptada a aguas mas cálidas-temperadas, es posible que este fenómeno se asocie a anomalías de baja temperatura (Toro et al. 2016 en preparación). Esto implicaría que la reproducción en esta especie (*M. galloprovincialis*) en esta localidad se vería afectada por el fenómeno de la atresia gonadal, tal como lo señala Sprung (1993) que sugiere que el desove ocurre solo dentro de un rango crítico de temperatura.

- Fisiología de las especies de *Mytilus* y cambio climatico: Estudios sobre la fisiología de estos organismos sésiles permiten estimar los límites de sus distribuciones geográficas (Tomanek 2008; Jones et al. 2010; Hilbish et al. 2010). A nivel internacional, Fly y

Hilbish (2013) realizaron un estudio comparativo para las especies *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus trossulus* para determinar el potencial de crecimiento (SFG) a distintas temperaturas. El potencial de crecimiento representa la energía disponible para crecimiento y reproducción, sobre lo requerido para mantenimiento. El potencial de crecimiento de *M. galloprovincialis*, especie adaptada a aguas mas cálidas (Braby y Somero 2006; Schneider 2008), se desplazó en los experimentos hacia las temperaturas mas cálidas comparadas con las otras dos especies, manteniendo un potencial de crecimiento positivo hasta cerca de los 30 ^{o}C. *Mytilus edulis*, especie de aguas frias a temperadas mantuvo su potencial de crecimiento positivo hasta los 23 ^{o}C. *Mytilus trossulus* una especie de aguas frias boreales (Braby y Somero 2006), no pudo mantener un potencial de crecimiento positivo sobre los 17 ^{o}C y decae a partir de los 15 ^{o}C (Fly y Hilbish 2013).

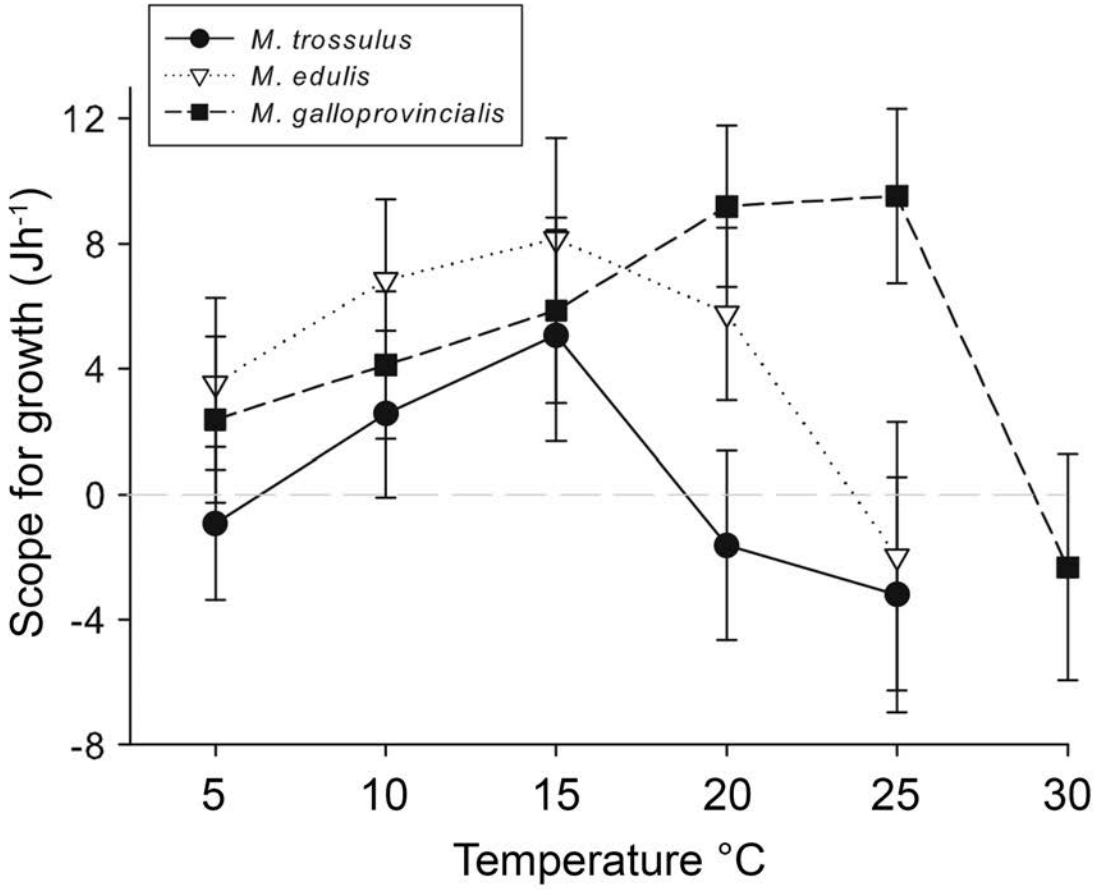


Fig. 31. Resultados del crecimiento potencial (scope for growth) en relacion a la temperatura de exposición para las especies *M. trossulus*, *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. Extraído y adaptado de Fly & Hilbish (2013).

Estudios fisiológicos llevados a cabo en Chile, indican que el potencial de crecimiento a 13 ^{o}C es significativamente mayor en *Mytilus chilensis* en relación a *M. galloprovincialis* y sus híbridos (Oyarzún et al. 2013). En otro estudio Guenuman (2014), estimó el potencial de crecimiento de *Mytilus chilensis*, *M. galloprivincialis* y sus híbridos en 3 diferentes temperaturas (9, 13 y 18 ^{o}C). Los resultados obtenidos otorgan a *M. galloprovincialis* un mayor

potencial de crecimiento a los 9 y 13 ^{o}C, siendo superado por los híbridos a los 18 ^{o}C. *Mytilus chilensis* mostró un menor potencial de crecimiento y siendo superado por los híbridos en todas temperaturas analizadas (Guenuman, 2014). Considerando que las temperaturas del agua a los 4 metros de profundidad en la X Región fluctuan entre los 9° y los 13,8 ^{o}C (Toro et al 1999; Lopez 2013) y que las temperaturas superficiales del mar continuan incrementando con el cambio climático (Mann y Jones, 2003; Meehl et al. 2007; Rahel y Olden, 2008; Jones et al. 2010), la fisiología energética de estas especies proveen las bases para el desarrollo de modelos mecanisticos para predecir futuras distribuciones y cambios en la productividad en las poblaciones naturales de estas especies del genero *Mytilus* (Tremblay et al. 2011; Jones et al. 2010; Fly y Hilbish 2013; Fly et al. 2015).

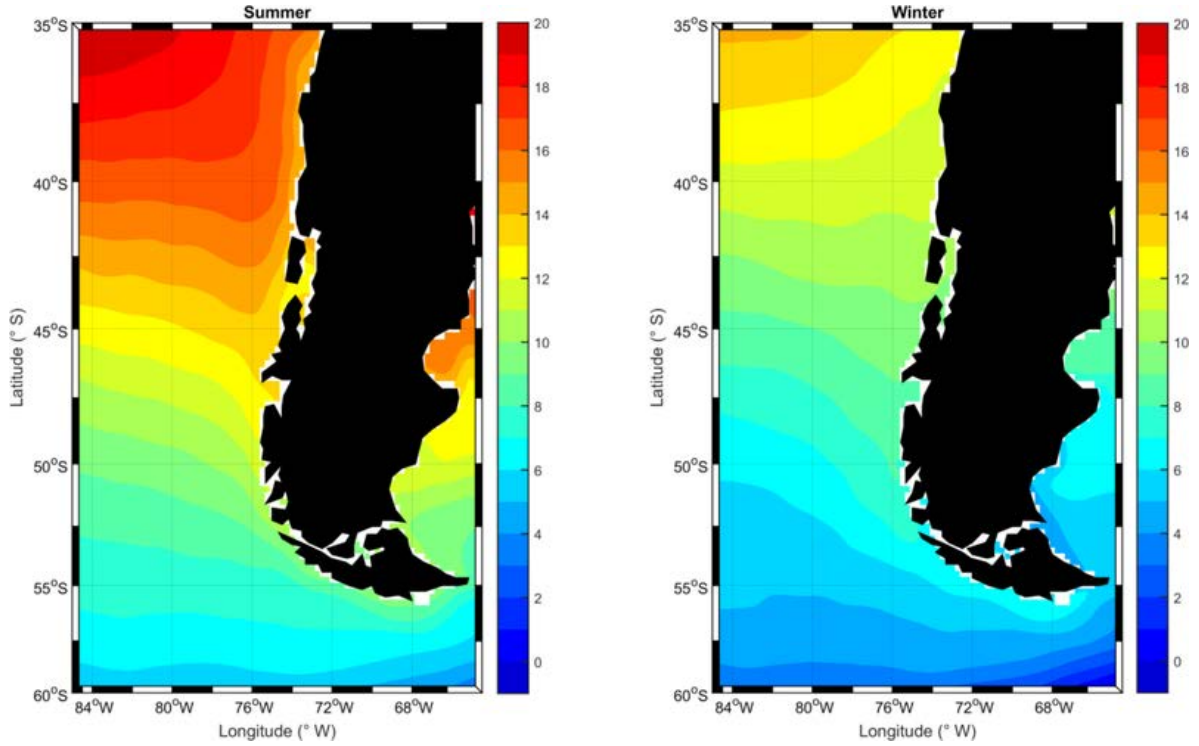


Fig 32. Temperaturas superficiales en verano e invierno a lo largo de la costa chilena. (Garces, J. 2016) comunicación personal.

Se evaluaron las siguientes variables para confeccionar la matriz del análisis FODA, desde el punto de vista productivo y de biodiversidad considerando los componentes probabilidad de establecimiento y consecuencias del establecimiento:

Actual distribución de las especies de *Mytilus*: Un resultado muy importante establecido en el primer objetivo del proyecto, tiene que ver con la confirmación de que la especie *Mytilus chilensis*, es una especie distinta y separada de las otras especies de *Mytilus* descritas en Chile. Este resultado es muy importante para los efectos del anásis FODA que se lleva a cabo, pues indica claramente que la especie *Mytilus chilensis*, que se cultiva a gran escala en Chile y que abunda mayoritariamente en los bancos naturales de la zona sur-austral de nuestro país es una especie distinta y válida. Por otro lado la distribución geográfica y las frecuencias de las especies e hibridos de *Mytilus* por localidad muestreada es un aporte muy importante ya que genera una línea base y además permite correlacionar su distribución con características ambientales (temperatura) y vias de posibles introducciones (naturales o accidentales) de las especies exóticas (*Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis*). Los resultados descritos para el objetivo 4.1. establecen claramente la distribución geográfica de las especies y los híbridos de *Mytilus* presentes en Chile, lo que nos permite asociar su habitat con la temperatura a lo largo del rango latitudinal en la costa de Chile. Las descripción de la presencia de la especie *Mytilus edulis* en la zona este del Estrecho de Magallanes, es también un hallazgo, a pesar de que su distribución se asocia principalmente a ese lugar, con algunos híbridos con *M. chilensis*, mas hacia la zona central del Estrecho. A su vez la confirmación de la presencia de la especie *Mytilus galloprovincialis* en la costa de la VIII Región, es importante para efectos del análisis que se realiza, pues es una especie que ha sido catalogada como una de las 100 peores especies invasoras del planeta. En Chile es necesario llevar a cabo estudios para evaluar y calificar la

condición de invasividad de esta especie en consideración a los potenciales efectos nocivos que pudiese tener sobre la biodiversidad.

Origen y vías de introducción: A partir del anásis de los datos aportados por los estudios de frecuencias de haplotipos y de los estudios filogenéticos, obtenidos en el los objetivos 4.1 y 4.3, se establece que el origen de la especie exótica *Mytilus galloprovincialis* es Europa y que la vía de introducción (por la alta frecuencia de la especies en esa zona) fue la Bahía de Concepción (ello posiblemente a través de aguas de lastre de embarcaciones a los puertos de la VIII Región). La especie *M. galloprovincialis* es originaria del Mar Mediterráneo, y se ha introducido en forma accidental a varios paises (ver estado del arte).

Conocimiento y características biológicas y ecológicas de las especies involucradas: para esta variable se considera a) tasa de crecimiento y b) output reproductivo.

La tasa de crecimiento de una especie, es una variable sin lugar a duda relevante, pues ello incide en una rápida colonización y competencia por espacio y alimento (ello permite evaluar su potencial como especie para la acuicultura). Como ya se describió en el análisis de riesgo, *Mytilus galloprovincialis* tiene una tasa de crecimiento superior a las otras especies del genero *Mytilus* dentro del rango de temperatura entre los 10 y 20 ^{o}C.

En relación a la variable output reproductivo, es una variable que permite establecer, por un lado su potencial reproductivo y potencial de colonización o repoblamiento. En los estudios llevados a cabo en Chile (Vargas 2012), la especie *Mytilus galoprovincialis* posee un mayor output reproductivo que *M. chilensis* bajo las condiciones donde fue realizado el estudio (VIII Región). Una consideración respecto a esta variable, es que se debe considerar la biomasa total de la especie (o una aproximación del número de individuos) ya que no es lo mismo unos pocos

bancos naturales (no se conoce su magnitud ni ubicación), que el cultivo masivo de la especie, que genera miles de toneladas y por ende la emisión de enormes cantidades de gametos (larvas) con un potencial de colonización muchísimo más grande.

Potencial de dispersión: la duración del período larval pelágico (flujo génico) y el tipo de sustrato que ocupan las especies del genero *Mytilus* son muy similares. Esta variable nos permite estimar la probabilidad que la especie se disperse fuera del área colonizada originalmente (población natural). Las especies de *Mytilus* presentes en Chile (*M. chilensis, M. galloprovincialis, M. edulis*) poseen un período de vida larval pelágica que va entre los 3 y 5 semanas, dependediendo de variables como temperatura y alimentación (Gosling 2015). El período de vida larval pelágico en caso de *M. galloprovincialis* depende de la temperatura y es de 28 días a 17 ^{o}C, 20 días a 20 ^{o}C y 15 dias a 22 ^{o}C (Gosling 2015) por su parte Ruiz et al (2012) en un estudio en laboratorio menciona que dura 24 dias a 12 ^{o}C, 20 dias a 16 ^{o}C y 16 dias a 20 ^{o}C. Para el caso de *Mytilus chilensis* el período larval pelágico hasta su asentamiento en laboratorio dura 40 días a 16 ^{o}C (Toro et al. 2004) y 30 días a 18 ^{o}C (Toro et al. 2012). La dispersión larval que conlleva a reclutamientos distantes a la fuente de las larvas, se ha descrito en la literatura para la especie *Mytilus galloprovincialis* que luego de 4 años de introducida en Sudafrica alcanzó una dispersión de 42 km (McQuaid y Phillips, 2000), y para un estudio realizado para larvas de *Mytilus trossulus* en el Mar Báltico entre 8 y 46 km (Corell et al. 2012). Además, esta variable contiene un factor no menor que es el factor antrópico (traslado de semillas o adultos entre localidades).

Características fisiológicas: Para los invertebrados marinos y en este caso especies del genero *Mytilus*, dado a que son organismos heterotermos es una variable importante ya que las especies

tienen óptimos fisiológicos determinados por variables ambientales como la temperatura. La existencia previa de datos de estudios fisiológicos con las especies *Mytilus chilensis*, *M. galloprovincialis* y sus híbridos en nuestro laboratorio (Guenumann 2014) nos entregan datos para establecer los óptimos fisiológicos de estos organismos bajo diferentes temperaturas (*M. galloprovincialis* es originario del Mar Mediterráneo y por ende adaptado a mayores temperaturas (12 - 22 ^{o}C) que las que existen en el sur de Chile donde habita *Mytilus chilensis* (9.7 – 16.8 ^{o}C). El óptimo fisiológico condensado en la variable fisiológica "Potencial de Crecimiento" es el que permite que la especie genere mayor cantidad de energía para crecimiento y reproducción; por ello este indice es indicativo de condiciones de stress. Esta variable bajo diferentes temperaturas se utilizó en los análisis llevado a a cabo por Oyarzún et al. (2013) y Guenuman (2014). Así mismo los resultados de la distribución de las especies de *Mytilus* nos permite estimar correlaciones entre la actual distribución de estas especies y las temperaturas del agua de mar. Otra variable importante que se debe considerar es el cambio climático, con escenarios de incremento y disminución de temperatura, para efectos de distribución de estas especies (Fly y Hilbish 2013; Oyarzún et al. 2016b).

Impactos ambientales y biodiversidad: Esta variable, tiene aspectos de variables ya mencionadas, sin embargo, no existen estudios que determinen la condición de invasividad de las nuevas especies de *Mytilus* descritas para la costa chilena. Se deben iniciar estudios ecológicos y genéticos (Sherman et al. 2016) que permitan estimar el impacto ambiental en caso de que el organismo llegue a establecerse y colonizar nuevos hábitats. Los aspectos a considerar: la desestabilización, modificación o degradación del ecosistema (por competencia por espacio) con sus efectos en la reducción de la biodiversidad nativa. Debido a ello y hasta que no se realicen estos estudios (reclutamiento en distintos sectores de la Bahía de Concepción

y establecimiento de la magnitud y ubicación de los bancos naturales de *M. galloprovincialis*), no se debería considerar el traslado de semillas (juveniles) o adultos desde la VIII Región hacia el sur ó desde la XII Región hacia la X por los potenciales riesgos del porte de enfermedades, parásitos, dinoflagelados o diatomeas generadoras de (FAN). Este factor cualitativo es muy relevante cuando se considera la reciente noticia (20 de Abril 2016) de la aparición de VPM en la localidad de Calbuco y en la Región de los Ríos. Se debe aplicar el principio precautorio hasta no contar con mayor información basada en estudios científicos. Lo anterior especialmente debido a los efectos del cambio climático sobre la fisiología y ditribución de las especies (Hilbish et al. 2010; Hilbish et al. 2012; Boni et al. 2016).

Impactos económicos potenciales: Comparando los los output reproductivos y los potenciales de crecimiento de las especies exóticas (*Mytilus edulis* y *M. galloprovincialis*), se puede comparar con la especie nativa *M. chilensis*. Sin duda que la especie *M galloprovincialis* es una excelente candidata para realizar acuicultura, debido a su rápido crecimiento y gran output reproductivo, sin embargo, sin antes haber realizado los estudios que evaluen la condición de invasividad de esta especie (Considerada una de las 100 peores especies invasivas a nivel mundial), no sería pertinente realizar cultivo (Crego-Prieto et al. 2015) ya que ello incremetaría la biomasa de la especie a muchas toneladas y con ello el volúmen de gametos emitidos al ambiente. De constatarse que esta especie se comporta en forma invasiva como en otros países, podría competir con especies nativas y ser un potencial riesgo para la biodiversidad y la acuicultura de *M. chilensis* (Byers 2009; Robinson y Griffiths 2015).

Influencias sociales y culturales: Esta variable de tipo cualitativa considera aspectos de la cultura nacional y regional: importancia de la especie para el uso en acuicultura a pequeña escala, conocimiento sobre su cultivo y comercialización. Potenciales efectos sobre la biodiversidad y otros recursos con importancia económica para personas que habiten la zona costera. Para esta variable es también necesario realizar estudios del impacto de las especies no nativas sobre el ecosistema a través de diseños que incorporen indicadores de reclutamiento en distintas zonas de la VIII Región).

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Aiken D (1998). Bivalve culture in Chile. World Aquaculture, 24: 7-19.

Anderson AS, Bilodeau AL, Gilg M & Hilbish TJ (2002). Routes of introduction of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) to Puget Sound and Hood Canal. Journal of Shellfish Research, 21: 75-79.

Anestis A, Lazou AO, Portner H & B Michaelidis (2007). Behavioral, metabolic, and molecular stress responses of marine bivalve *Mytilus galloprovincialis* during long-term acclimation at increasing ambient temperature. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 293: R911–R921.

Anisimova M & Gascuel O (2006). Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. Systematic Biology 55: 539-552.

Alexander ME, Adams R, Dick JTA & Robinson TB (2015) Forecasting invasions: resource use by mussels informs invasion patterns along the South African coast. Marine Biology 162: 2493-2500.

Aral O (1999). Growth of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis* Lam., 1819) on ropes in the Black Sea, Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 23: 183-189.

Araneda C, Larrain MA, Hecht B & Narum S (2016). Adaptive genetic variation distinguishes Chilean blue mussels (*Mytilus chilensis*) from different marine environments. Ecology and Evolution, doi: 10.1002/ece3.2110.

Arenas G, Marshall SH, Espinoza V, Ramirez I & Peña-Cortes H (2006). Protective effect of an antimicrobial peptide from *Mytilus edulis chilensis* expressed in *Nicotiana tabacum* L. Electronic Journal of Biotechnology 9: 144-151.

Assis J, Zupan M, Nicastro KR, Zardi GI, McQuaid CD & Serrao EA (2015). Oceanographic conditions limit the spread of a marine Invader along southern African shores. Plos One 10: 1-17.

Astorga MP, Cárdenas L & Vargas J (2015). Phylogenetic approaches to delimit genetic lineages of the *Mytilus* complex of South America: How many species area there? Journal of Shellfish Research, 34: 1-12

Barzutti G & Meluzzi C (1968). Ossrvazionisu *Mytilus edulis* L e *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. Conchiglie, 4: 50-58.

Bates JA & Innes DJ (1995). Genetic variation among populations of *Mytilus* spp. in eastern Newfoundland. Marine Biology 124: 417-424

Bandelt HJ, Forster P & Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution 16: 37–48.

Bazinet AL, Zwickl DJ, Cummings MP (2014). A gateway for phylogenetic analysis powered by grid computing featuring GARLI 2.0. Systematic Biology 63: 812-818.

Beaumont A, Hawkins M, Doig F, Davies I & Snow M (2008). Three species of *Mytilus* and their hybrids identified in a Scottish Loch: natives, relicts and invaders? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 367: 100–110.

Bendezu IF, Slater JW & Carney BF (2005). Identification of *Mytilus* spp. and *Pecten maximus* in Irish Waters by Standard PCR of the 18S rDNA Gene and Multiplex PCR of the 16S rDNA Gene. Marine Biotechnology 6: 687-696.

Bierne N, Borsa P, Daguin C, Jollivet D, Viard F, Bonhomme F & David P (2003). Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. Molecular Ecology 12: 447- 461.

Boni R, Gallo A, Montanino M, Macina A & Tosti E (2016). Dynamic changes in the sperm quality of *Mytilus galloprovincialis* under continuous thermal stress. Molecular Reproduction and Development 83: 162-173.

Borsa P, Rolland V & Daguin-Thiebaut C (2012). Genetics and taxonomy of the Chilean smooth-shelled mussel *Mytilus* spp (Bivalvia: Mytilidae). Comptes Rendus Biologies 335: 51-61.

Bownes SJ & McQuaid CD (2006). Will invasive mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck replace the indigenous *Perna perna* L. on the south coast of South Africa? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 338: 140-151.

Bownes SJ & McQuaid CD (2010). Mechanisms of habitat segregation between an invasive (*Mytilus galloprovincialis*) and ad indigenous (*Perna perna*) mussel: adult growth and mortality. Marine Biology 157: 1799-1810.

Bourget E (1983). Seasonal variations in cold tolerance in intertidal mollusks and their relation to environmental conditions in the St. Lawrence estuary. Canadian Journal of Zoology 61: 1193-1201.

Braby CE & Somero GN (2005). Ecological gradients and relative abundance of native (*Mytils trossulus*) and invasive (*Mytilus galloprovincialis*) blue mussels in the California hybrid zone. Marine Biology 148: 1249-1262.

Braby CE & Somero GN (2006). Following the heart: temperature and salinity effects on heart rate in native and invasive species of blue mussels (genus *Mytilus*). The Journal of Experimental Biology 209: 2554-2566.

Branch GM & Steffani CN (2004). Can we predict the effects of alien species? A case-history of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 300: 189-215.

Branch GM, Odendaal F & Robinson TB (2008). Long–term monitoring of the arrival, expansion an effects of the alien mussel *Mytilus galloprovincialis* relative to wave action. Marine Ecology Progress Series 370: 171-183.

Brante A, Fernandez M & Viard F (2012). Phylogeography and biogeography concordance in the marine gastropod *Crepipatella dilatata* (Calyptraeidae) along the southeastern Pacific coast. Journal of Heredity 103: 630–637.

Brannock PM, Wethey DS & Hilbish TJ (2009). Extensive hybridization with minimal introgression in *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* in Hokkaido, Japan. Marine Ecology Progress Series 383: 161-171.

Brannock PM & Hilbish TJ (2010). Hybridization results in high levels of sterility and restricted introgression between invasive and endemic marine blue mussels. Marine Ecology Progress Series 406:161-171.

Brannock PM (2011). The Genetic Impacts of *Mytilus galloprovincialis* on *M. trossulus* In Northern Japan. (Doctoral dissertation). Retrieved from http://scholarcommons.sc.edu/etd/488.

Brooks SJ & Farmen E (2013). The distribution of the mussels *Mytilus* species along the Norwegian coast. Journal of Shellfish Research 32: 265 - 270.

Byers JE (2009). Competition in Marine Invasions, In: Biological Invasions in Marine Ecosystems (Rilov, G & J.A. Crooks eds). Springer-Verlag Berlin 245-260 pp.

Buchner J (2016). Identificación de especies del genero *Mytilus* en diferentes localidades de la costa de Chile, utilizando los marcadores moleculares mac1- y EFbis. Practica profesional, Biología marina, Universidad Austral de Chile.

CABI (2011). Invasive Species Compendium. *Mytilus galloprovincialis* datasheet.http://www.cabi.org/isc/datasheet/73756

Camacho AP, Labarta U & Berias R (1995). Growth of mussels (*Mytilus edulis galloprovincilis*) on cultivation rafts: influence of sees source, cultivation site and phytoplankton availability. Aquaculture 138: 349-362.

Cao L, Kenchington E, Zouros E & Rodakis GC (2004). Evidence that the large noncoding sequence is the main control region of maternally and paternally transmitted mitochondrial genomes of the marine mussel (*Mytilu*s spp.). Genetics 167: 835-850.

Cárcamo C, Comesaña AS, Winkler FM & SanJuan A (2005). Allozyme identification of mussels (Bivalvia: *Mytilus*) on the pacific coast of South America. Journal of Shellfish Research 24: 1101-1115.

Carstens BC & Dewey TA (2010). Species delimitation using a combined coalescent and information theoretic approach: an example from North American *Myotis* bats. Systematic Biology 59: 400-444.

Cárdenas L, Castilla JC, Viard F (2009). A phylogeographical analysis across three biogeographical provinces of the south-eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. Journal of Biogeography 36: 969-981.

Comesaña AS, Toro JE, Innes DJ & Thompson RJ (1998). A molecular approach to the ecology of a mussel (*Mytilus edulis* - *Mytilus trossulus*) hybrid zone on the east coast of Newfoundland, Canada. Marine Biology 133: 213-221.

Côrte-Real HBSM, Dixon DR & Holland PWH (1994). Intron-targeted PCR: a new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve populations. Marine Biology 120: 407-413.

Corell H, Per-Olav M, Engqvist A, Döös & Jonsson PR (2012). Depth distribution of larvae critically affects their dispersal and the efficiency of marine protected areas. Marine Ecology Progress Series 467: 29-46.

Crego-Prieto V, Andura A, Juanes F, Roca A, Taylor JS & Gárcia-Vazquez E (2015). Aquaculture and the spread of introduced mussel genes in British Columbia. Biological Invasions 17: 2011-2016.

Daguin C & Borsa P (2000). Genetic relationships of *Mytilus galloprovincialis* populations worldwide: evidence from nuclear-DNA markers, In: A. Crame, E. Harper & J. Taylor (Eds). Bivalve Systematics and Evolution. Geological Society of London Special 177: 389-397.

Daguin C, Bonhomme F & Borsa P (2001). The zone of sympatry and hybridization of *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*, as described by intron length polymorphism at locus mac-1. Heredity 86: 342-353.

Diaz N & Neira R (2005). Biotecnología Aplicada a la Acuicultura. I. Biotecnologías clásicas aplicadas a la reproducción de especies cultivadas. Ciencia e Investigación Agraria 32: 45-59.

Diaz C, Figueroa Y & Sobenes C (2011). Effect of different longline farming designs over the growth of *Mytilus chilensis* (Hupe, 1854) at Llico Bay, VIII Region of BíoBío, Chile. Aquacultural Engineering 45: 137-145.

Distel D (2000). Phylogenetic Relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S rRNAData Suggest Convergence in Mytilid Body Plans. Molecular Phylogenetics and Evolution 15:25-33.

Dutton JM & Hofmann GE (2009). Biogeographic variation in *Mytilus galloprovincialis* heat shock gene expression across the eastern Pacific Range.Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 376: 37-42.

Drummond A & Rambaut A (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. Evolutionary Biology 7:214.

Drummond A, Rambaut A, Shapiro B & Pybus OG (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from Molecular Sequences. Molecular Biology and Evolution 22: 1185-1192.

Elliott J, Holmes K, Chambers R, Leon K & Wimberger P (2008). Differences in morphology and habitat use among the native mussel *Mytilus trossulus*, the non-native *Mytilus galloprovincialis*, and their hybrids in Puget Sound, Washington. Marine Biology 156: 39–53.

Farías A (2008). Nutrición y alimentación en moluscos bivalvos. En A. Lovatelli, A. Farias e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20-24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. Roma, FAO. pp. 297–308.

Fernández-Tajes J, Longa A, Garcia-Gil J; Chiu YW, Huang YS, Mendez J & Lee RS (2011). Alternative PCR-RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification. European Food Research and Technology 223: 791-796.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.

Filatov DA (2002). Proseq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data set. Molecular Ecology 2: 621-624.

Fly EK & Hilbish TJ (2013). Physiological energetics and biogeographic range limits of three congeneric mussel species. Oecologia 172: 35-46.

Fly EK, Hilbish TJ, Wethey DS & Rognstan RL (2015). Physiology and biogeography: the response of European mussels (*Mytilus* spp.) to climate change. American Malacological Bulletin 33: 136-149.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R & Vrijenhoek R (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology 3: 294-299.

Fujisawa T & Barraclough TG (2013). Delimiting species using Single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. Systematic Biology 62: 707-724.

Gaitán-Espitia JD, Quinteros-Galvis JF, Mesa A & D' Elia G (2016). Mitogenomics of southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Pteriomorphia): Insights into the evolutionary characteristics of the *Mytilus edulis* complex. Scientific Reports doi:10.1038/srep26853.

Gardner JPA, Zbawicka M, Westfall K & Wenne R (2016). Invasive blue mussels threaten regional scale genetic diversity in mainland and remote offshore locations: the need for baseline data and enhanced protection in the Southern Ocean. Global Change Biology 22: 3182-3195.

Geller JB, Carlton JT & Powers DA (1994). PCR-based detection of mtDNA haplotypes of native and invading mussels on the northeastern Pacific coast: latitudinal patterns of invasion. Marine Biology 119: 243-249.

Geller JB (1999). Decline of a native mussel masked by sibling species invasion. Conservation biology 13: 661-664.

Global Invasive Species Database (2016) Species profile: *Mytilus galloprovincialis*. Downloaded from http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=102 on 13-10-2016.

Green A (2014). Invasive Species Report, Mediterranean Mussel *Mytilus galloprovincialis*. Fish 423, University of Washington, 12 pp.

Gérard K, Bierne N, Borsa P, Chenuil A & Féral J-P (2008). Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. Mussels from Northern and Southern Hemisphere and strong genetic differentiation among southern populations. Molecular Phylogenetics and Evolution 49: 84-91.

Gérard K, Roby Ch, Bierne N, Borsa P, Feral J & Chenuil A (2015). Does natural selection explain the fine scale genetic structure at the nuclear exon Glu-5' in blue mussels from Kerguelen? Ecology and Evolution 5: 1456-1473.

Gilg MR & Hilbish TJ (2004). Spatial-temporal patterns in the genetic structure of recently settled blue mussels (*Mytilus* spp) across a hybrid zone. Marine Biology 143: 679-690.

GISD (2012) Global Invasive species Database – *Mytilus galloprovincialis* – available from http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=102&fr=1&sts=sss&lang=EN

Giantsis IA, Abatzopulus TJ, Angilidis P & Apostolidis AP (2014). Mitochondrial Control Region Variability in *Mytilus galloprovincialis* Populations from the Central-Eastern Mediterranean Sea. International Journal of molecular sciences 15: 11614-11625.

Gosling EM (1992). Genetics of *Mytilus*. In: The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. EM Gosling (Ed), Elsevier, Amsterdam. 309-382 pp.

Gosling E, Doherty S & Howley N (2008). Genetic characterization of hybrid mussel (*Mytilus*) populations on Irish coasts. Journal of the Marine Biological Association UK 88: 341-346.

Gosling E (2015). Marine bivalve Molluscs, 2nd. Ed. John Wiley & Sons, Ltd. Published. 1-527 pp.

Guenuman M (2014). Efectos del cambio de temperatura del agua de mar sobre el balance energético en adultos de *Mytilus chilensis*, *Mytilus galloprovincialis* y sus híbridos, bajo condiciones de laboratorio. Tesis pregrado, Biología marina. Universidad Austral de Chile.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W & Gascuel O (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic Biology 59: 307-21.

Guzmán BE, Nuñez JJ, Vejar A, Barriga EH & Gallardo CS (2011) Genetic diversity and population structure of two South American marine gastropods, Crepipatella dilatata and C. fecunda (Calyptraeidae): distinct patterns based on developmental mode. Italian Journal of Zoology, 78: 444-454.

Harris JM, Branch GM, Elliott BL, Currie B, Dye AH & Mcquaid CD (1998). Spatial and temporal variability of recruitment of intertidal mussels around the coast of South Africa. South Africa Journal of Zoology 33: 1- 11.

Harrington RC & Near TJ (2012). Phylogenetic and coalescent strategies of species delimitation in snubnose darters (Percidae: *Etheostoma*). Systematic Biology 61: 63-69.

Heath DD, Rawson PD & Hilbish TJ (1995). PCR-based nuclear markers identify alien blue mussel (*Mytilus* spp.) genotypes on the west coast of Canada. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 52: 2621-2627.

Hilbish TJ, Bayne BL & Day A (1994). Genetics of physiological differentiation within the marine mussel genus *Mytilus*. Evolution 48: 267-286.

Hilbish TJ, Mullinax A, Dolven SI, Meyer A, Koehn RK & Rawson PD (2000). Origen of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp): routes and timing of transcuatorial migration. Marine Biology 136: 69-77.

Hilbish TJ, Brannock PM, Jones KR, Smith AB, Bullock BN & Wethey DS (2010). Historical changes in the distributions of invasive and endemic marine invertebrates are contrary to global warming predictions: the effects of decadal climate oscillations. Journal of Biogeography 2010: 423 - 431.

Hilbish TJ, Lima FP, Brannock PM, Fly EK, Rognstad RL & Wethey DS (2012). Change and stasis in marine hybrid zones in response to climate warming. Journal of Biogeografy 39: 676 - 687.

Hillis DM & Bull JJ (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. Systematic Biology 42:182-192.

Ho SYW& Shapiro B (2011). Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. Molecular ecology resources 11: 423 - 34

Hockey PAR & Van Erkom C (2010). The invasive Biology of the mussel *Mytilus galloprovincialis* on the southern African coast. Transactions of the Royal Society of South Africa 48: 123-139.

Hudson DH & Bryant D (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. Molecular Biology and Evolution 23: 254-267.

Huelsenbeck JP & Rannala P (2004). Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. Systematic Biology 53: 904–913.

Inoue K, Waite JH, Matsuoka M, Odo S & Harayama S (1995). Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, and *Mytilus trossulus*. Biological Bulletin 189: 370-375.

Illesca AF (2015). Análisis de la forma valvar entre lase especies del complejo *Mytilus edulis* (*M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. chilensis*) (Mollusca: Bivalvia) de la costa sur de Chile y en un gradiente latitudinal en *Mytilus chilensis* (Hupé, 1854) utilizando morfología geométrica. Tesis de pre-grado. Biología marina. Universidad Austral de Chile.

Jones SJ, Lima FP & Wethey DS (2010). Rising environmental temperaturas and biogeography: poleward range contraction of the blue mussel, *Mytilus edulis* L., in the western Atlantic. Journal of Biogeography 37: 2243-2259.

Jones G, Aydin Z & Oxelman B (2014). DISSECT: an assignment-free Bayesian discovery method for species delimitation under the multispecies coalescent. Bioinformatics, btu770. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu770.

Katoh K, Kuma K, Toh H & Miyata T (2005). MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. Nucleic Acids Research 33: 511-518.

Katoh K, Standley DM (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. Molecular Biology and Evolution 30: 772-780.

Kimura M. 1981.Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. Procedings of the National Academy of Science 78: 454-458.

Knowles LL & Carstens BC (2007). Delimiting species without monophyletic gene trees. Systematic Biology 56: 887–895.

Koehn RK (1991). The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus.* Aquaculture 94: 125-145.

Lanfear R, Calcott B, Ho SYW & Guindon S (2012). PartitionFinder: Combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. Molecular Biology and Evolution 29: 1695-1701.

Larraín MA, Diaz NF, Lamas C, Vargas C & Araneda C (2012). Genetic composition of *Mytilus* species in mussel populations from southern Chile. Latin American Journal Aquatic Research 40: 1077-1084.

Larraín MA, Diaz N, Lamas C, Uribe C & Araneda C (2014). Traceability of mussel (*Mytilus chilensis*) in southern Chile using microsatellite molecular markers and assignment algorithms. Exploratory survey. Food Research International 62: 104-110.

Larraín MA, Diaz NF, Lamas C, Uribe C, Jilberto F & Araneda (2015). Heterologous microsatellite-based genetic diversity in blue mussel (*Mytilus chilensis*) and differentiation among localities in southern Chile. Latin American Journal Aquatic Research 43: 998-1010.

Lasota R, Pilczynska J, Williams ST, Wolowicz M (2013) Fast and easy method for total DNA extraction and gene amplification from larvae, spat and adult mussels *Mytilus trossulus* from the Baltic Sea. Oceanological and hydrobiological studies 42: 486-489

Lathlean JA, Seuront L, McQuaid CD, Ng TPT, Zardi GI & Nicastro KR (2016). Cheating the Locals: invasive mussel steal and Benedit from the cooling effect of indigenous mussels. Plos One 11: e0152556.

Li J, Ye Y, Wu C, Qi P, Guo B & Chen Y (2013). Genetic variation of *Mytilus coruscus* Gould (Bivalvia: Mytilidae) populations in the East China Sea inferred from mtDNA COI gene Sequence. Biochemical Systematics and Ecology 50: 30-38.

López J A (2013). Respuesta fisiológica de *Mytilus chilensis* (chorito) en cultivo suspendido (Dalcahue, Chiloé) y su relación con las variables ambientales. Tesis de grado, Universidad Austral de Chile, 1-85 pp.

Lowe S, Browne M, Boudjelas S & De Poorter M (2000). 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the Global Invasive Species Database. The Invasive Species Group. Available at: http://www.issg.org/pdf/publications/ worst_100/english_100_worst.pdf.

Lowe S *et al.* (2004). 100 of the world's worst invasive alien species, a selection from the global invasive species database. Published by The Invasive Species Specialist Group (ISSG), Specialist group of species survival commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), 12 pp.

Mallet AL & Carver CEA (1995). Comparative growth and survival patterns of *Mytilus trossulus* and *Mytilus edulis* in Atlantic Canada. Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences 52: 1873-1880.

Martínez-Lage A, Rodríguez-Fariña F, González-Tizón A & Méndez J (2005) Origin and evolution of Mytilus mussel satellite DNAs. Genome 48: 247-256.

Meehl G A, Tebaldi C, Teng H & Peterson TC (2007). Current and future US weather extremes and El Niño. Geophysical Research Letters 34(20).

McDonald JH, Seed R & Koehn RK (1991). Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the northern and southern hemispheres. Marine Biology 111: 323-333.

McKindsey CW, Landry T, O´Beirn FX & Davies IM (2007). Bivalve aquaculture and exotic species: a review of ecological considerations and managements issues. Journal of Shellfish Research 26: 281-294.

McQuaid CD & Phillips TE (2000). Limited wind-driven dispersal of intertidal mussel larvae: in situ evidence from the plankton and the spread of the invasive species *Mytilus galloprovincialis* in South Africa. Marine Ecology Progress Series 201: 211-220.

McQuaid CD, Porri F, Nicastro K & Zardi GI (2015). Simple scale-dependant patterns emerge from very complex effects – Anexample from the intertidal mussel *Mytilus galloprovincialis* and *Perna perna*. Oceanography and Marine Biology: Annual Review 53: 127-156.

Monaghan MT, Wild R, Elliot M, Fujisawa T, Balke M, Inward DJG, Lees DC, Ranaivosolo R, Eggleton P, Barraclough TG, & Vogler AP (2009). Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent based models of species delineation. Systematic Biology 58: 298-311.

Mann ME & Jones PD (2003). Global surface temperatures over the past two millennia. Geophysical Research Letters 108: 4203.

Mooney HA & Cleland EE (2001). The evolutionary impact of invasive species. Procedings of the National Academy of Science 98: 5446-5451.

Negrini R, Nicoloso L, Crepaldi P, Milanesi E, Marino R, Perini D, Pariset L, Dunner S, Leveziel H, Williams JL & Marsan PA (2008). Traceability of four European protected geographical indication (PGI) beef products using Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) and Bayesian statistics. Meat Science 80: 1212-1217

Ogden R (2008). The use of DNA tools for improving compliance traceability and enforcement in the fishing industry. Fish and Fisheries 9: 462-472.

Ohresser M, Borsa P & Delsert C (1997). Intron-length polymorphism at the actin gene locus mac-1: a genetic marker for population studies in the marine mussels *M. galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. Molecular Marine Biology Biotechnology 6:123-130.

Ouagajjou Y, Presa P, Astorga M & Perez M (2011). Microsatellites of *Mytilus chilensis*: a genomic print of its taxonomic status within *Mytilus* sp. Journal of Shellfish Research 30: 325-330.

Oyarzún PA, Toro JE, Jaramillo R, Guiñez R, Briones C, Astorga M (2011). Ciclo gonadal del chorito *Mytilus chilensis* (bivalvia :Mytilidae) en dos localidades del sur de Chile. Latin American Journal of Aquatic Research 39: 512-525.

Oyarzún PA, Toro JE & Navarro JM (2013). Comparison of the physiological energetics between *Mytilus chilensis, Mytilus galloprovincialis* and their hybrids, under laboratory conditions. Aquaculture Research 44: 1805-1814.

Oyarzún PA, Toro JE, Garrido O, Briones C & Guiñez R (2014a). Differences in sperm ultrastructure between the Chilean native blue mussel and *Mytilus galloprovincialis* (Bivalvia, Mytilidae). Could be used as a taxonomic trait? Latin American Journal of Aquatic Research 42: 172- 179.

Oyarzún PA, Toro JE, González A (2014b). Analisis morfométrico de las valvas de Mytilus spp (Bivalvia:Mollusca) en el sur de Chile. Congreso de ciencias del Mar, Osorno.

Oyarzún PA, Toro JE, Cañete J, & Garder J (2016a). Bioinvasion threatens the genetic integrity of native diversity and a natural hybrid zone: smooth-shelled blue mussels (*Mytilus*spp) in the Strait of Magellan. Biological Journal of the Linnean Society 117:574-585.

Oyarzún PA, Toro JE, Garcés-Vargas J, Alvarado C, Guiñez R, Jaramillo J, Briones C, Campos B (2016b). Reproductive patterns of mussels *Perumytilus purpuratus* (Bivalvia: Mytilidae), along the Chilean coast: effects caused by climate change? Journal of the Marine Biological Association of the UK. doi.org/10.1017/S0025315416001223

Oyarzún PA (2016). Phylogeny and species delimitation in the *Mytilus edulis* complex (Mollusca: Bivalvia) of the coasts of South America. PhD Thesis. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile.

Oyarzún PA, Toro JE, Nuñez J, Gardner JPA (En preparación) Species delimitation and phylogenetic relationships of the smooth-shelled blue mussels of the *Mytilus edulis* complex in southern South America.

Palumbi SR (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. In: Molecular Systematics. Hillis D.M., Morris C., Mabel B.K., eds. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts USA. pp. 205-247.

Paiva FA (2014). Ship transport of marine invasive species and its stress resistance. M.Sc. Thesis. Universidad Técnica de Lisboa, 110 pp.

Penney RW & Hart MJ (1999). Distriution, genetic structure, and morphometry of *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus* within a mixed species zone. Journal Shellfish Research 18: 367-374.

Penney RW, Hart MJ & Templeman N (2002). Comparative growth of cultured mussels, *Mytilus edulis, Mytilus trossulus* and their hybrids, in naturally occurring mixed-species stocks. Aquaculture Research 33: 693-702.

Penney RW, Hart MJ & Templeman ND (2006). Genotype dependent survival, growth, and production in cultured blue mussels, *Mytilus* spp.: results of a reciprocal seed transfer experiment. Journal Shellfish. Research 25: 515-525.

Penney RW, Hart MJ & Templeman ND (2008). Genotype-dependent variability in somatic tissue and shell weights and its effect on meat yield in mixed species (*Mytilus edulis-Mytilus trossulus*, and their hybrids) cultured mussel populations. Journal Shellfish Research 27: 827-834.

Picker MD & Griffins CL (2011). Alien and invasive Animals – A South African Perspective.Randomhouse/Struik Cape Town. 240 pp.

Pipe RK (1987). Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis. Marine Biology 96: 519-528.*

Pollard M & Hogson AN (2016). *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca: Bivalvia) in a warm-temperate South African estuarine embayment. African Journal of Aquatic Science 41: 57-65.

Pons J, Barraclough TG, Gomez-Zurita J, Cardoso A & Duran DP (2006). Sequence based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. Systematic Biology 55: 595–609.

Posada D (2003). Using Modeltest and PAUP* to select a model of nucleotide substitution. In: Baxevanis AD, Davison DB, Page RDM, Petsko GA, Stein LD, Stormo GD, editors. Current Protocols in Bioinformatics. New York: John Wiley & Sons. p. 6.5.1–6.5.14.

Posada D & Crandall KA (2001). Intraspecific phylogenetics: Trees grafting into networks. Trends in Ecology and Evolution 16: 37-45.

Posada D (2006). Collapse: Describing Haplotypes From Sequence Alignments. Available at: http://darwin.uvigo.es/software/collapse.html

Preda C (2012). Early detection of potentially invasive invertebrate species in *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 dominated communities in harbours. Helgoland Marine Research 66: 545-556.

Puccinelly E, Noyon M, MaQuaid CD (2016). Trophic signatures of co-existing invasive and indigenous mussels: selective feeding or different metabolic pathways? Hydrobiologia doi: 10.1007/s10750-016-2873-9

Powell JR, Monaghan MT, Opik M & Rillig MC (2011). Evolutionary criteria outperform operational approaches in producing ecologically relevant fungal species inventories. Molecular Ecology 20: 655–666.

Rahel FJ & Olden JD (2008). Assessing the effects of climate change on Aquatic Invasive Species. Conservation Biology 22: 521-533.

Reid NM & Carstens BC (2012). Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. BMC Evolutionary Biology 12:196

Rego I, Martínez A, González-Tizón A, Vieites J, Leira F & Méndez J (2002). PCR technique for identification of mussel species. Journal Agricultural and Food Chemistry 50: 1780-1784.

Ritchie AM, Lo N, Ho SYW (2016) Examining the sensitivity of molecular species delimitations to the choice of mitochondrial marker. Organisms Diversity & Evolution 16: 467-480.

Robinson TB (2002). Invasion of Langebaan Lagoon, South Africa, by *Mytilus galloprovincialis* – effects on natural communities. African Zoology 37: 151-158.

Robinson TB (2004). Distribution and status of marine invasive species in and bordering the West coast National Park. Koedoe 47: 79-87.

Robinson TB, Branch GM, Griffiths CL, Govender A, Hockey PA (2007). Changes in South African rocky intertidal invertebrate community structure associated with the invasion of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Marine Ecology Progress Series 340: 163-171.

Robinson TB, Griffiths CL, McQuaid CD & Rius M (2005). Marine alien species of South Africa – status and impacts. African Journal of Marine Science 27: 297-306.

Robinson TB (2015). Marine invasions in South Africa: patterns and trends. Quest 11: 44-45.

Robinson TB & Griffiths CL (2015). Invasion of Langebaan Laggoon, South Africa, by *Mytilus galloprovincialis* – effects on natural communities. African Zoology 37: 151-158.

Ronquist F, Teslenko M, Van der Mark P, Ayres D, Darling A, Hohna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, & Huelsenbeck JP (2011). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. Systematic. Biology 61: 539–542.

Librado C & Rozas J (2009). DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. In Posada, D. (ed.) Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series Vol. 537. Humana Press NJ, USA. pp. 337-350.

Ruiz M, Tarifeño E, Llanos-Rivera A, Padget C & Campos B (2008). Temperature effect in the embryonic and larval development of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819). Revista de Biología Marina y Oceanografía 43: 51-61.

Saarman NP & Pogson GH (2015). Introgression between invasive blue mussels (genus *Mytilus*) in the central California hybrid zone. Molecular Ecology 24: 4723-4738.

Santaclara FJ, Espiñeira AG, Cabado A, Aldasoro N, Gonzalez-Lavin N & Vieites JM. (2006). Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 8461-8470.

Seed R (1992). Systematics evolution and distribution of mussels belonging to the genus *Mytilus*: an overview. American Malacological Bulletin 9: 123-137.

Sernapesca (2014). Anuario Estadístico de Pesca 2014. www.sernapesca.cl

Schneider KR (2008). Heat stress in the intertidal: comparing survival and growth of an invasive and native mussel under a variety of thermal conditions. The Biological Bulletin 215: 253-264.

Sherman CDH, Lotterhos KE, Richardson MF, Tepolt CK, Rollins LA, Palumbi SR & Miller AD (2016). What are we missing about marine invasions ?Filling the gaps with evolutionary genomics. Marine Biology 163: 198 DOI: 10.1007/s00227-016-2961-4

Shields JL, Barnes P, Heath DD (2008). Growth and survival differences among native, introduced and hybrid blue mussels (*Mytilus* spp.): genotype, environment and interaction effects. Marine Biology 154: 919-928.

Shields JL, Heath JW & DD Heath. (2010). Marine landscape shapes hybrid zone in a broadcast spawning bivalve: introgression and genetic structure in Canadian west coast *Mytilus*. Marine Ecology Progress Series 399: 211-223.

Shinen JL & Morgan SG (2009). Mechanisms of invasion resistance: competition among intertidal mussels promotes establishment of invasive species and displacement of native species. Marine Ecology Progress Series 383: 187-197.

Skibinski DOF & Roderick EE (1991). Evidence of selective mortality in favor of the *Mytilus galloprovincialis* Lmk phenotype in British mussel populations. Biological Journal of the Linnen Society 42: 351-366.

Steffani CN & Branch GM (2005). Mechanisms and consequences of competition between an alien mussel, *Mytilus galloprovincialis*, and an indigenous limpet, *Scutellastra argenvillei*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 317: 127-142.

Steiner G & Müller M (1996). What can 18S rDNA do for bivalve phylogeny? Journal Molecular Evolution 43:58–70.

Smietanka B, Burzynski A, Hummel H & Wenne R (2014). Glacial history of the European marine mussels *Mytilus*, inferred from distribution of mitochondrial DNA lineages. Heredity 113: 250-258.

Sprung, M. 1993. The other life: an account of present knowledge of the larval phase of *Dreissena polymorpha*, in Nalepa, T.F., and D.W. Schloesser (eds.), Zebra mussels: biology impacts and control, Lewis Publishers, Boca Raton, FL. pp. 39-53

Suarez-MP. Gonzalez A, Garcia MP & Serrano F (2007). Atresia gonadal durante el ciclo gametogénico de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 cultvado en la Ria de Vigo (Noroeste de la península Iberica). Boletin Instituto Español de Oceanografía, 23: 3-10.

Suchaneck TH, Geller JB, Kreiser BR & Mitton JB (1997). Zoogeographic distributions of the sibling species *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus trossulus* (Bivalvia: Mytilidae) and their hybrids in the north pacific. Biological Bulletin 193: 187-194.

Tamura K & Nei M (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology Evolution 10: 512-526.

Tarifeño E, Gallegillos R, Llanos-Rivera A, Arriegada D, Ferrada S, Canales-Aguirre CB & Seguel M (2012). Identificación errónea del mejillón, *Mytilus galloprivincialis* (Lamarck 1819) como la especie, *Mytilus chilensis* (Hupé 1854) en la Bahía de Concepción, Chile. Gayana 76: 167-172.

Taylor JD, Glover EA, Smith L, Dyal P & Williams ST (2011). Molecular phylogeny and classification of the chemosymbiotic bivalve family Lucinidae (Mollusca: Bivalvia). Zoological Journal of the Linnean Society 163: 15–49.

Tomanek L (2008). The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. Physiological and Biochemical Zology 81: 709-717.

Tomanek L & Zuzow MJ (2010). The proteomic response of the mussel congeners *Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus trossulus* to acute heat stress: implications for thermal tolerance limits and metabolic coasts of thermal stress. Journal Experimental Biology 213: 3559-3574

Tremblay R, Landry T, Leblanc N, Pernet F, Barkhouse C (2011). Physiological and biochemical indicators of mussel seed quality in relation to temperatures. Aquatic Living Resources 24: 273-282.

Toro JE, Aguila P, Vergara AM & Newkirk GF (1994). Realized heritability estimates for growth from data on tagged Chilean native oyster (*Ostrea chilensis*). World Aquaculture 25: 29-30.

Toro JE. (1998a). 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 JE (1998b). Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: The potential use in studies involving planktonic surveys. Journal of Shellfish Research 17: 4. 1203-1205

Toro JE, Paredes PI, Villagra DJ, Sen CM (1999). Seasonal variation in the phytoplankton community, seston and environmental variables during a 2-year period and oyter growth at two mariculture sites, southern Chile. P.S.Z.N. Marine Ecology 20: 63-89.

Toro JE, Thompson RJ & Innes DJ (2002). Reproductive isolation and reproductive output in two coexisting mussel species (*Mytilus edulis*, *Mytilus trossulus)* and their hybrids from Newfoundland. Marine Biology 141: 897-909.

Toro JE, Ojeda JA & Vergara AM (2004a). The genetic structure of *Mytilus chilensis* (Hupé 1854) populations along the Chilean coast based on RAPDs analysis. Aquaculture Research 35: 1466 – 1471.

Toro JE, Innes DJ & Thompson RJ (2004b). Genetic variation among life-history stages of mussels in a *Mytilus edulis – Mytilus trossulus* hybrid zone. Marine Biology 145: 713 – 725.

Toro JE, Ojeda JA, Vergara AM, Castro GC & Alcapán AC (2005). Molecular characterization of the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis,* Hupé 1854) demonstrates evidence for the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* in southern Chile. Journal Shellfish Research 24: 1117 – 1124.

Toro JE, Castro GC, Ojeda JA & Vergara AM (2006). Allozymic variation and differentiation in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis*, along its natural distribution. Genetics and Molecular Biology 29: 174-179.

Toro JE, Oyarzún PA, Peñaloza C, Alcapán C, Videla V, Tillería J, Astorga M & Martínez V (2012). Production and performance of pure species and hybrid larvae and spot of *Mytilus chilensis* and *Mytilus galloprovincialis* from laboratory crosses. Latin American Journal of Aquatic Research 40: 243-247.

Toro JE & Oyarzún PA (2014). Estudios genéticos en mejillones del genero *Mytilus* presentes en Chile, código 2013-21-DAC-14. Proyecto Subpesca.

Toro JE et al (2016). Determinación del fenómeno de atresia en el ciclo gonadal de *Mytilus galloprovincialis* en la caleta Tumbes (VIII Region). En preparación

Valenzuela A, Astorga MP, Oyarzún PA & Toro JE (2016). Caracterización genética de híbridos entre las especies *Mytilus edulis platensis* y *Mytilus galloprovincialis* (Mytilidae: Bivalvia) en la costa chilena. Latin American Journal of Aquatic Research 44: 171-176.

Van Erkom Schurink & Griffiths C (1991). A comparison of reproductive cycles and reproductive output in 4 southern African mussels. Marine EcologyProgress Series 76: 123-134.

Vargas CA (2012). Ciclo reproductivo de *Mytilus chilensis* y *Mytilus galloprovincialis* en Caleta Tumbes (VIII Región, Chile), determinado a través de análsis cuantitativos y cualitativos. Tesis de pregrado, Universidad Austral de Chile 1-60 pp.

Westfall KM, Winberger PH & Garder JPA (2010). An RFLP mtDNA assay to determine if *Mytilus galloprovincialis* (Mytilidae; Bivalvia) is of Northern or Southern hemisphere origin. Molecular Ecology Resources 10: 573-575.

Westfall KM & Gardner JPA (2010). Genetic diversity of Southern hemisphere blue mussels (Bivalvia: Mytilidae) and the identification of non-indigenous taxa. Biological Journal Linnean Society 101: 898-909.

Westfall KM & Gardner JPA (2013). Interlineage *Mytilus galloprovincialis* Lmk. 1819 hybridization yields inconsistent genetic outcomes in the Southern hemisphere. Biological invasions 15: 1493-1506.

Xia XH (2013) DAMBE5: A Comprehensive Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. Molecular Biology and Evolution 30: 1720-1728.

Xia XH, Xie Z, Salemi M, Chen L & Wang Y (2003). An index of substitution saturation and its application. Molecular Phylogenetics and Evolution 26: 1-7.

Yang Z, & Rannala B (2014). Unguided species delimitation using DNA sequence data from multiple loci. Molecular Biology and Evolution 31: 3125-3135.

Zardi GI, Nicastro KR, McQuaid CD & Erlandsson J (2008). Sand and wave induced mortality in invasive (*Mytilus galloprovincialis*) and indigenous (*Perna perna*) mussels. Marine Biology 153: 853-858.

Zhang C, Zhang DX & Yang Z (2011).Evaluation of a Bayesian coalescent method of species delimitation. Systematic Biology 60: 747–761.

Zhang J, Kapli P, Pavlidis P & Stamatakis A (2013). A General Species Delimitation Method with Applications to Phylogenetic Placements. Bioinformatics 29: 2869-2876.

.

7. ANEXOS

ANEXO 01

REPÚBLICA DE CHILE
MINISTERIO DE ECONOMÍA, FOMENTO Y TURISMO
SUBSECRETARÍA DE PESCA Y ACUICULTURA
CASILLA 100 - V
VALPARAÍSO

MINISTERIO DE ECONOMIA - SUBS. DE PESCA Y ACUICULTURA
DIVISION JURIDICA

AUTORIZA A JORGE EDUARDO TORO YAGUI PARA REALIZAR PESCA DE INVESTIGACIÓN QUE INDICA.

(EXTRACTO)

Por Resolución Exenta Nº 2898 de esta Subsecretaría, autorízase a Jorge Eduardo Toro Yagui para efectuar una pesca de investigación de conformidad con los Términos Técnicos de Referencia del Proyecto ***"Caracterización Genética y Distribución Espacial del Género Mytilus en Chile."***.

La pesca de investigación se efectuará por el término de 15 meses contados desde la publicación de la presente resolución de conformidad con la Ley General de Pesca y Acuicultura, donde podrá extraer 1.110 individuos del recurso chorito, en los términos indicados en la resolución extractada.

El texto íntegro de la presente resolución se publicará en el sitio de dominio electrónico de la Subsecretaría de Pesca y Acuicultura.

REPUBLICA DE CHILE
MINIST. DE ECON. F. Y TURISMO
SUBSECRETARIO DE PESCA Y ACUICULTURA

RAÚL SÚNICO GALDAMES
Subsecretario de Pesca y Acuicultura

VALPARAÍSO, 30 OCT. 2015

ANEXO 02

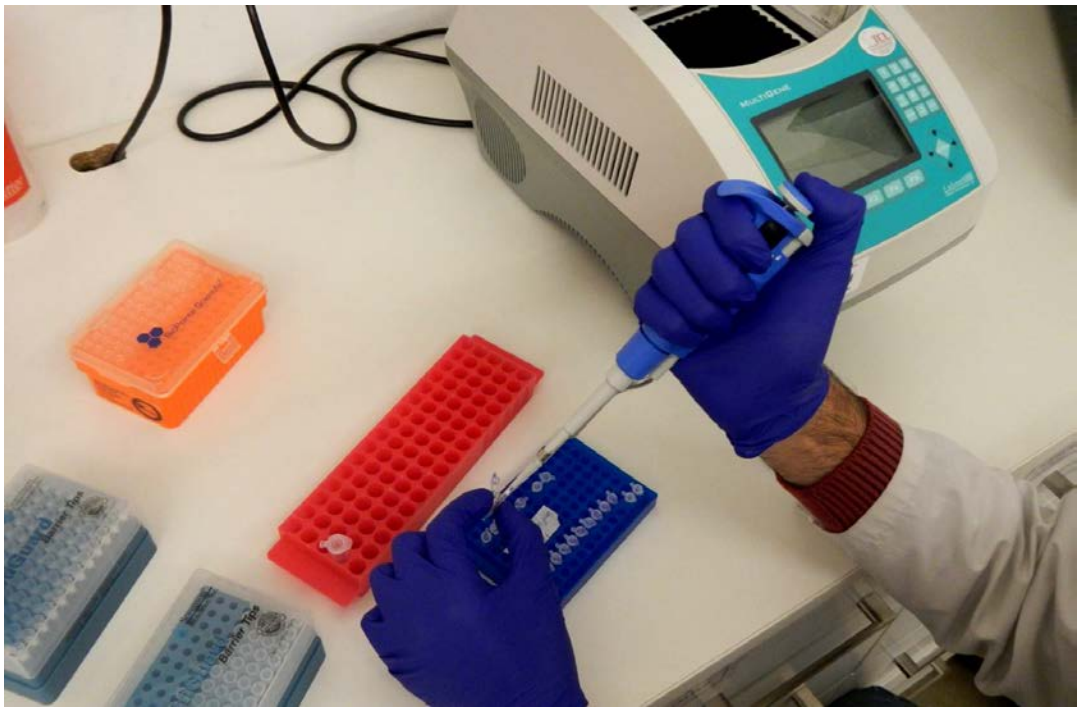
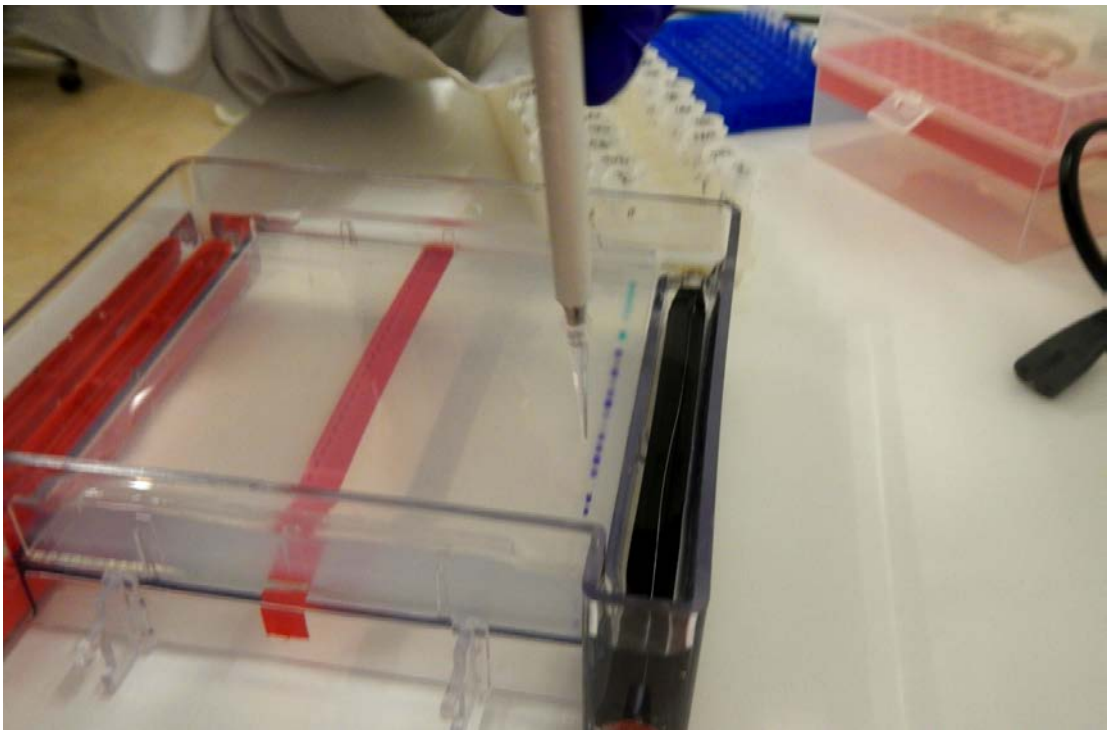


Imagen del procedimiento de PCR, frente a un termociclador.

ANEXO 03

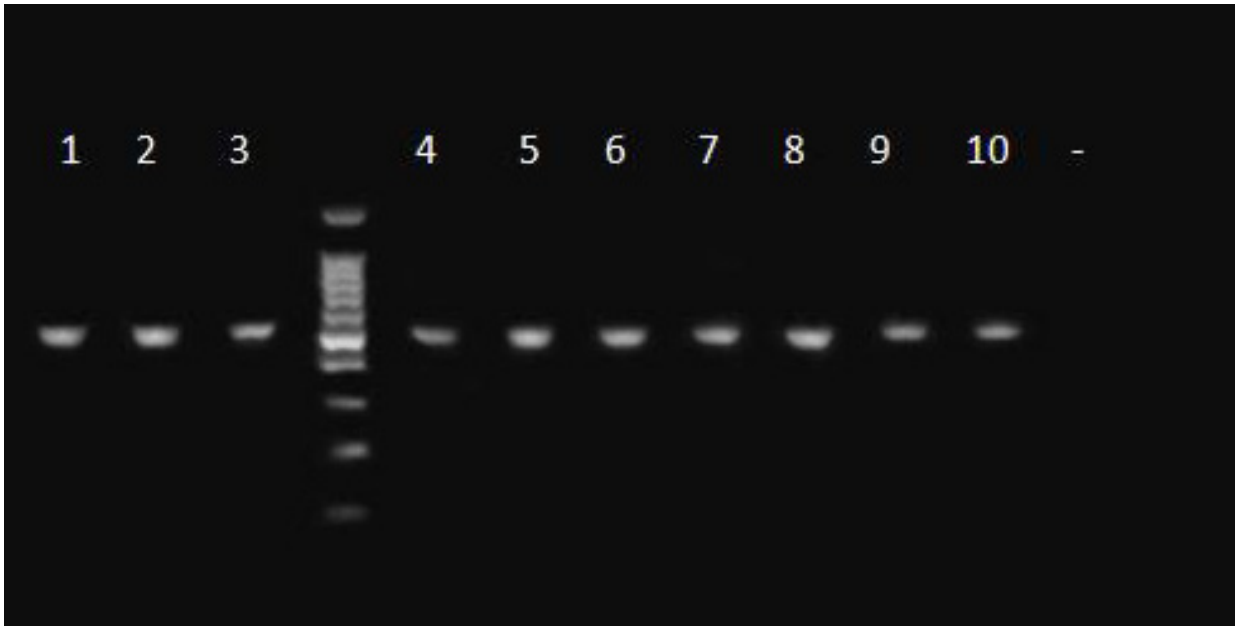


Carga de las muestras en el gel de agarosa (2%) inmerso en buffer TBE (0,5X) en cámara de electroforesis.

ANEXO 04

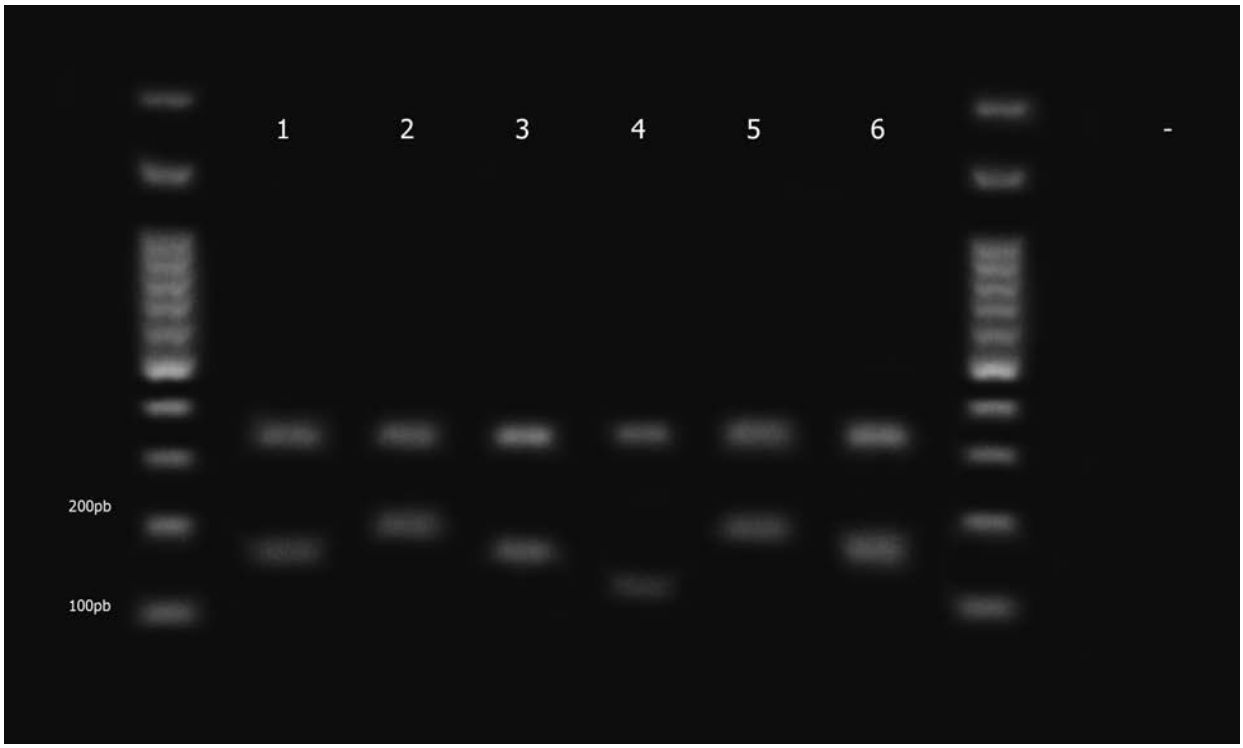
ITS: Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica el producto de PCR del locus nuclear ITS. Ejemplares de **(1)** Buque Quemado, Magallanes; **(2)** Cornwell, Reino Unido, **(3)** Galicia, España, **(4)** Lota, Chile, **(5)** Puerto Williams, Chile, **(6)** Muelle Loreto, Magallanes Chile, **(7)** Bras d'Or Lake, Canada, **(8)** Muelle Loreto, Magallanes Chile, **(9)** Bras d'Or Lake, Canada). (-) Control negativo. El amplicón tiene un tamaño de 800 pb.

ANEXO 5



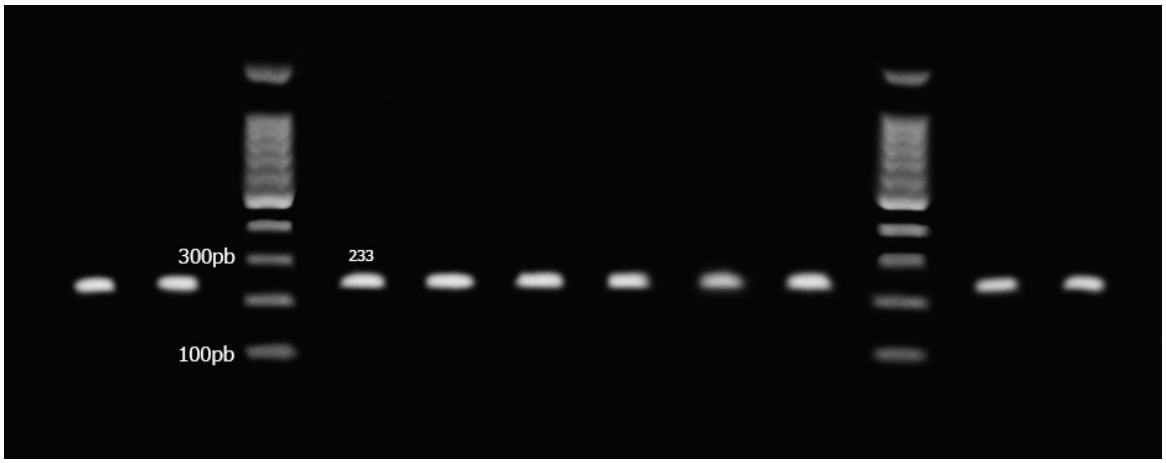
16S: Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica el producto de PCR del locus mitocondrial 16S. **(1)** Metri; **(2)** Lota **(3)** San Gregorio, **(4)** Lota, **(5)** Puerto Cisne, **(6)** Puerto Williams, **(7)** Porvenir, **(8)** Hibrido Me/Mg (Muelle Loreto, Magallanes Chile), **(9)** Huildad, Chiloé, **(10)** Chaihuin. para muestras de *Mytilus* spp, el cual otorga un amplicón de 537 pb. Marcador de peso molecular (100pb).(-) Control negativo.

ANEXO 6



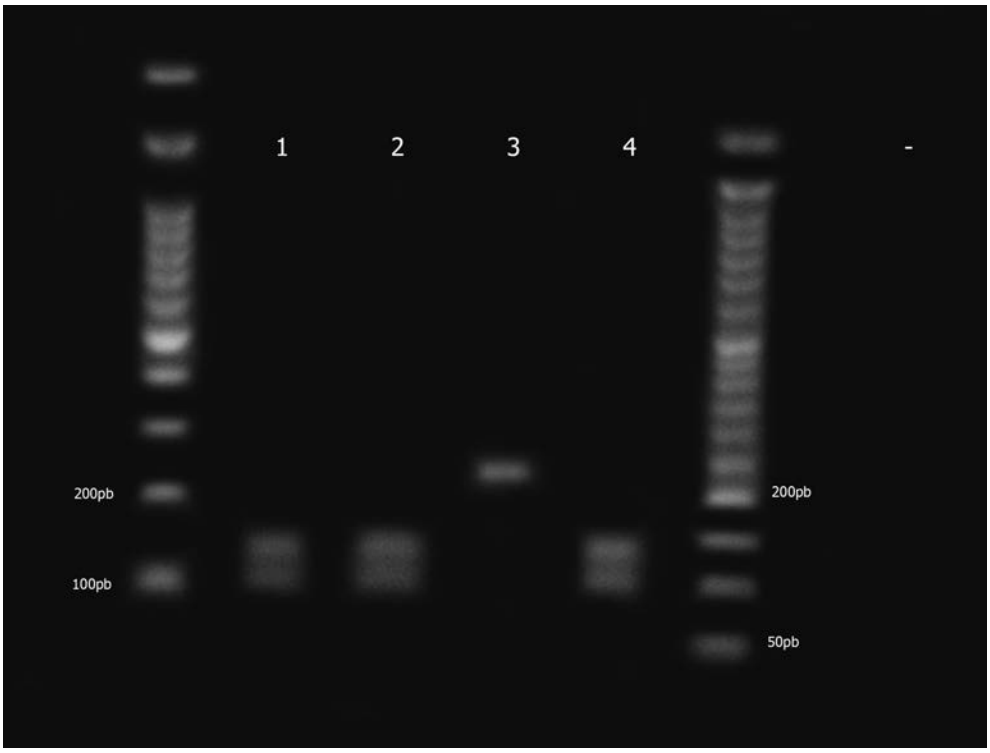
RFLP 16S: Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica los patrones de RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) después de la digestión con: *Eco*RV, *Nhe*I y *Spe*I (primer 16sAR/16sBR). *M.chilensis* (fragmentos de 342 pb y 167 pb), *M. galloprovincialis* (fragmentos de 342 pb y 195 pb), híbrido *M.edulis*/*M.chilensis* (fragmentos de 342, 85, 82 y 28 pb). Los fragmentos bajo los 100 pb son difíciles de visualizar, sin embargo, esto no afecta la caracterización, tal como lo indica el trabajo original (Westfall et al. 2010). **(1)** Mc (Metri, Chile), **(2)** Mg (Galicia, España), **(3)** Mc (San Gregorio, Magallanes Chile), **(4)** Mc (Lota, Chile), **(5)** Mg (Lota, Chile), **(6)** Mc (San Gregorio, Magallanaes Chile). (-) Control negativo.

ANEXO 7



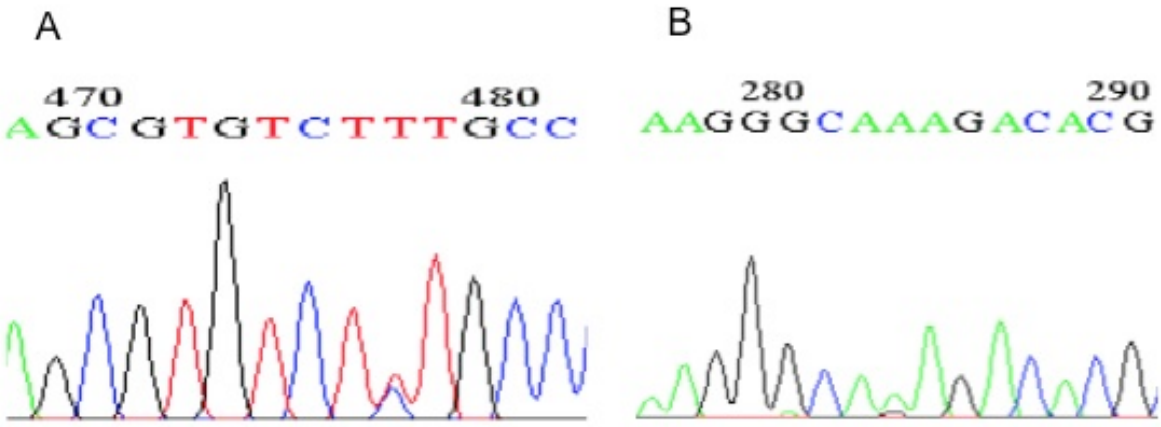
COIXba: Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica el producto de PCR del locus mitocondrial COIXba para muestras de *Mytilus* spp. El amplicón resultante es de 233 pb para *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*.

ANEXO 8



RFLP COIXba. Imagen de un gel de agarosa (2%) teñido con *sybr safe* que indica los patrones de RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM) después de la digestión con: *XbaI* (primer COIXba). **(1)** Mc (Teupa, Chiloé), **(2)** Mc (Chaihuin), **(3)** Mg (Galicia, España), **(4)** Mc (Rilan, Chiloé).

ANEXO 9



18S. Imagen de una seccion de un cromatograma del resultado de la secuenciación de locus nuclear 18S para un ejemplar *Mytilus* de Chiloe, Chile. (A) muestra un individuo heterocigoto (C/T). (B) muestra el reverso complementario (G/A).

ANEXO 10

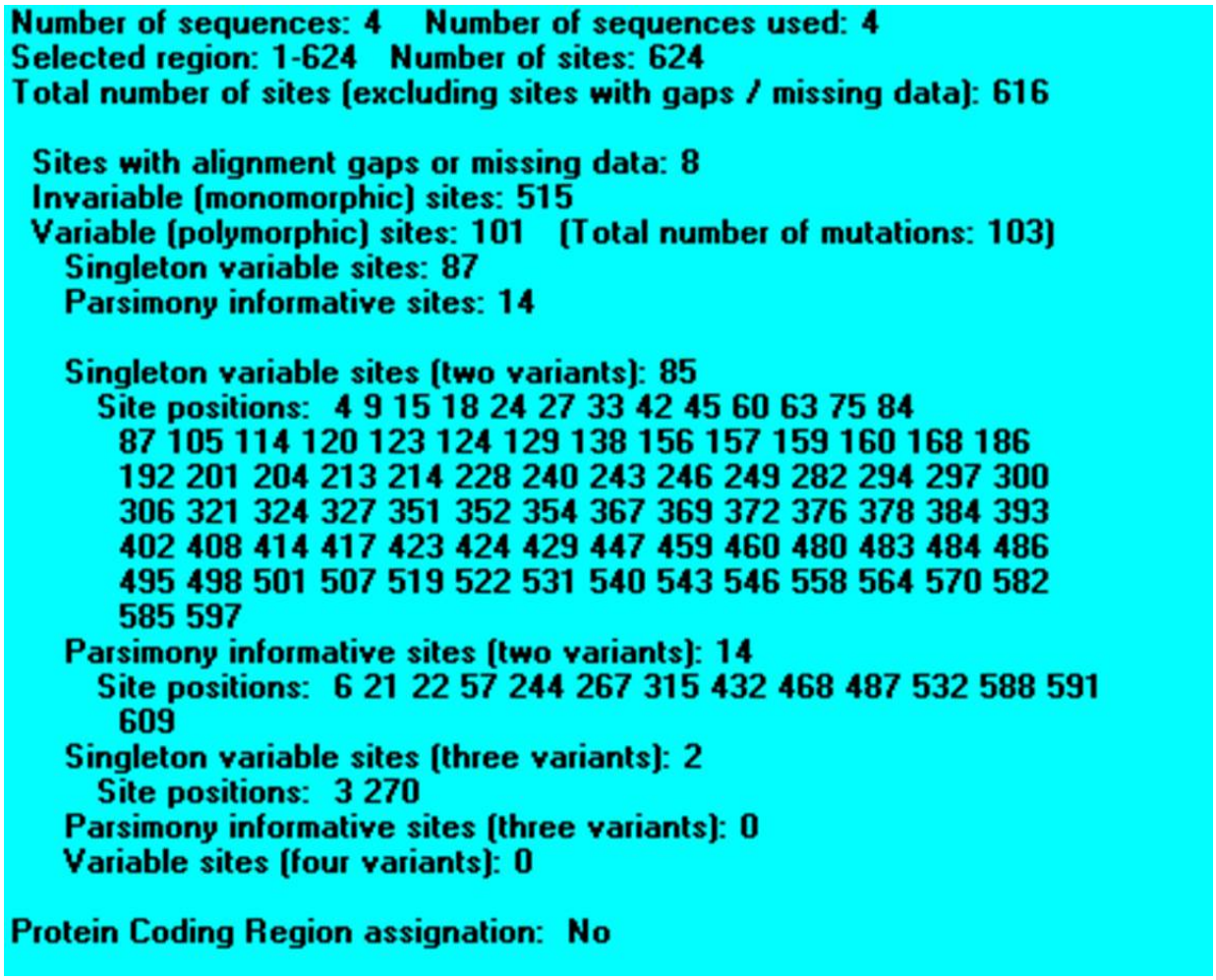
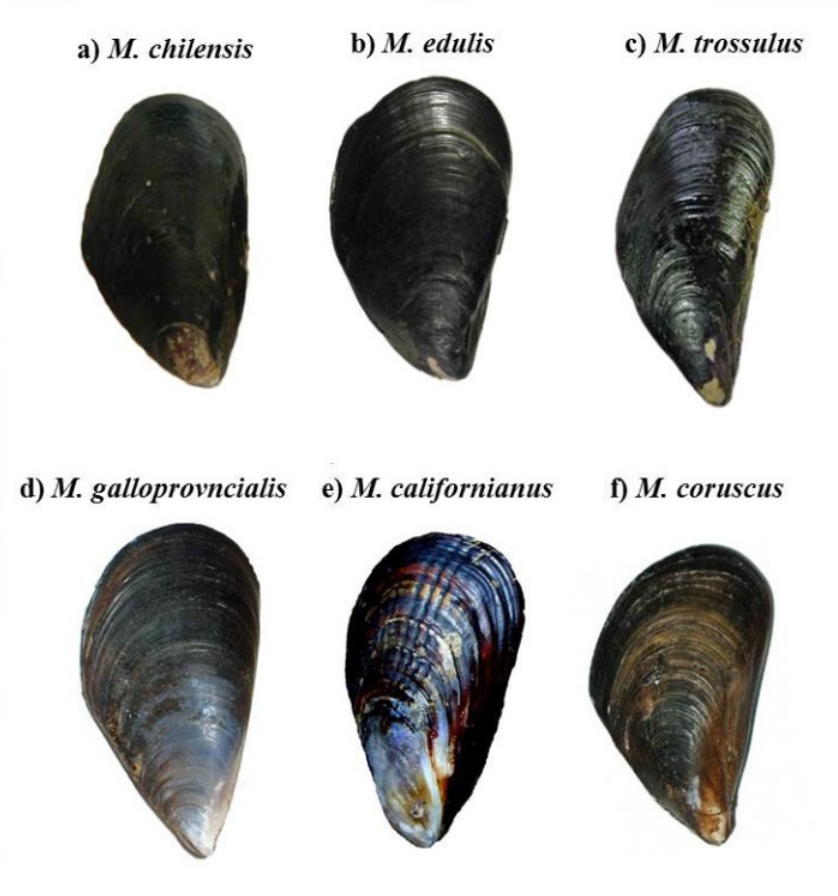


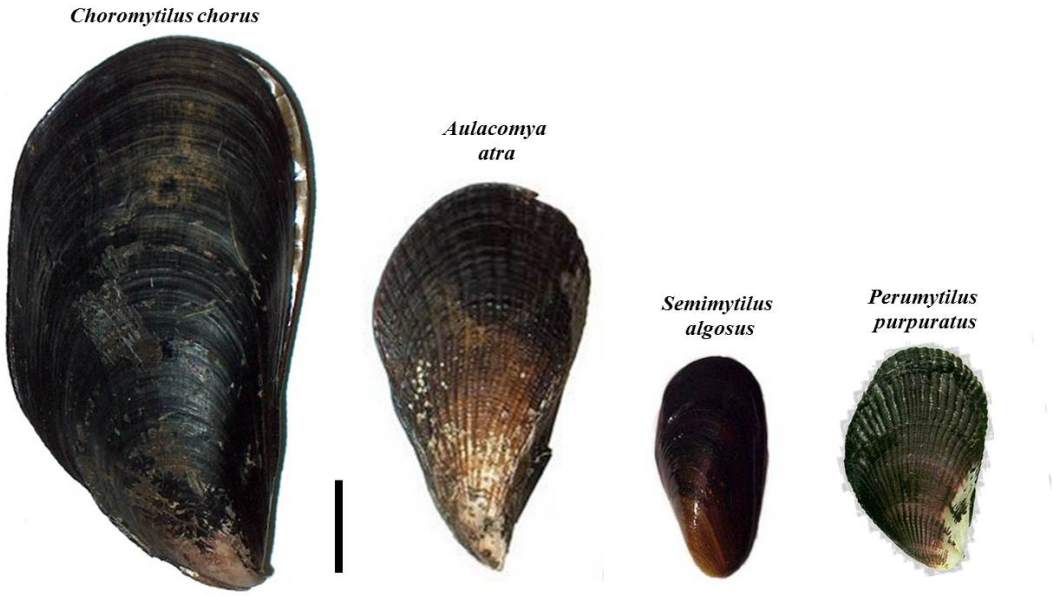
Imagen de los resultados que entrega DnaSP v. 5.10. Entre las secuencias de las especies del complejo *Mytilus* para el loci COI: (1) *M. edulis*; (2) *M. galloprovincialis*; (3) *M. trossulus*; (4) *M. chilensis*.

ANEXO 11



Especies de mejillones que se lograron identificar con las técnicas moleculares utilizadas

ANEXO 12



Otros mitílidos que habitan en la costa chilena. La barra corresponde a 1 cm.

Valdivia, 11 de mayo de 2017