

110



**ANÁLISIS DE MARCADORES
RAPDs EN EL GÉNERO *MYTILUS***

J. Ignacio Rego Pérez



9

ANÁLISIS DE MARCADORES
RAPDs EN EL GÉNERO *MYTILUS*

J. Ignacio Rego Pérez

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR
Área de Genética

ANÁLISIS DE MARCADORES RAPDs EN EL GÉNERO *MYTILUS*

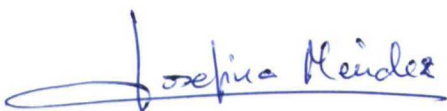
Memoria que para optar al título de Doctor
presenta D. J. Ignacio Rego Pérez

JOSEFINA MÉNDEZ FELPETO, Doctora en Biología y Catedrática de Universidad del Área de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidade da Coruña y ANDRÉS MARTÍNEZ LAGE, Doctor en Biología y Profesor Asociado del Área de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular de la Universidade da Coruña

INFORMAN

Que el trabajo titulado “Análisis de marcadores RAPDs en el género *Mytilus*” presentado por D. J. Ignacio Rego Pérez para optar al Título de Doctor en Biología ha sido realizado bajo nuestra dirección en el laboratorio de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular.

A Coruña, 22 de Octubre de 2003



Fdo. Josefina Méndez Felpeto



Fdo. Andrés Martínez Lage

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto de investigación “Aplicación de técnicas moleculares para la caracterización de moluscos bivalvos de interés comercial”, financiado por el Plan Nacional de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico (I+D, ALI97-0434) y el proyecto “Desarrollo de pruebas moleculares para su aplicación en la industria conservera”, financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (FEDER, IFD97-1295).

AGRADECIMIENTOS

La realización de un trabajo de tantos años no sería posible sin la ayuda de tantas y tantas personas que, de una u otra manera, han colaborado para que finalmente esta memoria vea la luz.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Josefina Méndez Felpeto y al Dr. Andrés Martínez Lage por inculcarme un espíritu de motivación constante, por haberme dado la oportunidad de hacer que una ilusión se haya convertido en realidad, por su ayuda y orientación durante todos estos años, así como por su derroche de paciencia y compromiso durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Ana González Tizón, por encontrar en ella a una persona con la que poder hablar de cualquier tema, científico o no, en cualquier momento.

Al Dr. Juan Ausió de University of Victoria (British Columbia, Canadá), a la Dra. Ellen Kenchington de Dalhousie University (Nova Scotia, Canadá), al Dr. Herman Hummel del Netherlands Institute of Ecology (Yerseke, Holanda), al Dr. Lars Eric Persson de University of Kalmar (Kalmar, Suecia), al Dr. Takaomi Arai del Otsuchi Marine Research Center de University of Tokyo (Tokyo, Japón) y a ANFACO-CECOPECA por su colaboración en la obtención de mejillones de las poblaciones analizadas.

No quisiera olvidarme de absolutamente ninguno de mis compañeros y técnicos de laboratorio, los que han pasado y los que están; todos ellos han contribuido a que el grupo humano del que formamos parte haya sido de lo más excepcional. De manera especial, me gustaría destacar a *Luidgi*, la persona que nos ha enseñado, no sólo a mi sino a todos nosotros, a valorar la vida por encima de todas las cosas materiales. A todos ellos les deseo lo mejor.

Para terminar, quisiera agradecer a mis amigos el haber tenido la paciencia suficiente para aguantarme en los momentos más delicados durante el transcurso de este trabajo.

A todos ellos, de verdad, muchísimas gracias.

A mis padres,
a mis hermanas y
a Bego.

Nunca consideres el estudio como una obligación,
sino como una oportunidad para penetrar en el
bello y maravilloso mundo del saber...

A. Einstein.

INTRODUCCIÓN	1
1. Origen, taxonomía y distribución del género <i>Mytilus</i>	3
2. Aspectos citogenéticos y moleculares del género <i>Mytilus</i>	7
2.1 La citogenética en el género <i>Mytilus</i>	7
2.2 Análisis moleculares en el género <i>Mytilus</i>	9
2.1.1. Marcadores moleculares proteicos	9
2.1.2. Análisis del genoma mitocondrial	10
2.1.3. El ADN ribosómico	12
2.1.4. Familia génica de las histonas	13
2.1.5. Secuencias de copia única o bajo número de copias	14
2.1.6. Secuencias de elevado número de copias o ADN altamente repetido	17
3. Secuencias anónimas de ADN	18
OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	27
1. Material de estudio	29
2. Extracciones de ADN	30
2.1 Extracción de ADN genómico	30
2.2 Extracción de ADN mitocondrial	31
2.3 Extracción de ADN de larva	32
2.4 Extracción de ADN plasmídico a pequeña escala	32
3. Electroforesis y cuantificación de ADN	33
4. Amplificaciones por PCR	33
4.1 Amplificación por PCR utilizando <i>primers</i> de secuencia aleatoria	33
4.2 Marcaje de sondas por PCR	35
4.3 Amplificación de fragmentos específicos	35
5. Hibridación Southern Blot	35
6. Hibridación Dot Blot	38
7. Secuenciación de los fragmentos seleccionados	38
7.1 Aislamiento y purificación de los fragmentos	38
7.2 Clonación de los fragmentos purificados	39
7.3 Detección, selección y mantenimiento de los transformantes	40
7.4 Secuenciación de ADN	40
8. Diseño de <i>primers</i> específicos	40
9. Análisis de datos	41

RESULTADOS	45
1. Selección de <i>primers</i> y <i>loci</i> polimórficos	47
2. Desarrollo y análisis de marcadores RAPDs	50
2.1 Análisis inicial de las frecuencias alélicas	50
2.2 Análisis Southern Blot y Dot Blot	52
2.3 Análisis de las frecuencias alélicas y porcentaje de <i>loci</i> polimórficos	56
2.4 Análisis de la estructura genética poblacional	58
Análisis de la varianza molecular (AMOVA)	65
Análisis de componentes principales (PCA)	70
Análisis de correlación –Test de Mantel-	74
3. Análisis preliminar de la heredabilidad de los RAPDs	75
4. Aplicación de marcadores RAPDs a otras poblaciones de mejillón	77
4.1 <i>M. galloprovincialis</i> y <i>M. coruscus</i> de Japón (Bahía de Otsuchi)	77
4.2 <i>P. canaliculus</i> de Nueva Zelanda (Golden bay)	80
5. Análisis de secuencias de fragmentos RAPDs	81
DISCUSIÓN	101
1. Desarrollo y evaluación de <i>loci</i> RAPDs	103
2. Variabilidad y estructura genética poblacional	105
3. Ensayo preliminar de la herencia mendeliana	119
4. Análisis de secuencias	120
5. Identificación de especies o poblaciones mediante RAPDs	123
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	133
APÉNDICE	159
Ap. 1 Soluciones utilizadas	161
Ap. 2 Abreviaturas	163

INTRODUCCIÓN

El género *Mytilus* (familia Mytilidae, Rafinesque, 1815) constituye el grupo de bivalvos marinos más ampliamente utilizado en estudios de carácter genético debido fundamentalmente a: (i) su amplia distribución, lo que facilita el estudio de poblaciones; (ii) su ocupación en un amplio rango de ambientes dentro de un área geográfica determinada, lo cual hace posible comparar la variabilidad genética de poblaciones entre diferentes hábitats; y (iii) sus dos estadios distintos en su ciclo vital, un estado de dispersión en forma de larva y una fase adulta sedentaria, que facilita el estudio de las contribuciones relativas de la selección natural y el flujo genético en el mantenimiento de los patrones de variación genética en poblaciones naturales. Además, tanto su elevada capacidad para fecundar como la facilidad para su cultivo, hacen de este género un grupo muy adecuado para realizar estudios genéticos.

Los individuos pertenecientes a este género pueden llegar a medir hasta 40 cm de longitud cuando son adultos y se caracterizan por presentar dos valvas, de superficie lisa o con pequeñas nerviaciones radiales, de contorno subcuadrangular y color negro-violáceo, variando en su interior del gris azulado al violeta. Estas valvas son puntiagudas en la parte anterior y redondeadas en la posterior. Entre ambas valvas se localiza el biso, gracias al cual se fijan al sustrato. Presentan, asimismo, dos músculos aductores, uno anterior pequeño y otro posterior, muy grande. Así como dientes bisagra en el margen anterior, a diferencia de otros géneros de la misma familia, como son *Perna* y *Choromytilus*.

1. ORIGEN, TAXONOMÍA Y DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO *Mytilus*

Es difícil indicar qué caracteres dieron lugar a la separación de la familia Modioloidea, del Ordovícico, y la familia Mytilidae, del Devónico reciente. Soot-Ryen (1955) postula que la familia Mytilidae forma parte de una extensión de alguna línea de la extinta familia Modioloidea. Respecto al género, Cox *et al.* (1969) afirman que es posible que se haya originado en el Jurásico reciente, no encontrándose registros fósiles anteriores al Plioceno (Soot-Ryen, 1955). Se considera a *Mytilus edulis* como la especie ancestral (Soot-Ryen, 1955; Bernard, 1983; Seed, 1990) y, a menudo, descrita como una especie cosmopolita, pero, a su vez, con un patrón de distribución definido (Soot-Ryen, 1955). Algunos autores piensan que a partir de stocks de *M. edulis* evolucionó *M. galloprovincialis*, debido a las condiciones más cálidas que se

desarrollan en el Mar Mediterráneo y al reducido contacto entre este mar y el Océano Atlántico durante una de las glaciaciones en el Pleistoceno (Barsotti & Meluzzi, 1968; Seed, 1978).

No obstante, según Vermeij (1991, 1992) las especies de *Mytilus* del Pacífico Norte colonizaron el Atlántico durante una migración transártica, a través del estrecho de Bering, durante el Plioceno, hace aproximadamente unos 3.5 millones de años. Asimismo, en base a datos obtenidos mediante análisis de ADNmt, las especies de *Mytilus* siguen un patrón de distribución antitropical, cuyo origen habría tenido lugar mediante migraciones transecuatoriales desde el hemisferio Norte al hemisferio Sur, a través del océano Atlántico, durante el Pleistoceno (Hilbish *et al.*, 2000). Incluso cabría la posibilidad de una segunda migración relativamente más reciente, a través del Atlántico, como así lo indica la presencia de unos cuantos linajes de ADNmt encontrados en individuos del hemisferio Sur (Hilbish *et al.*, 2000).

Históricamente, gran parte de la taxonomía del género *Mytilus* estaba basada, principalmente, en los caracteres morfométricos de la concha, como la longitud del músculo aductor anterior y de la charnela. Sin embargo, estos rasgos son enormemente plásticos y sujetos a un amplio rango de influencias ambientales (Lewis & Seed, 1969; Seed, 1978; Innes & Bates, 1999). Si a ello se le añaden las complejas interacciones existentes entre varios taxones o especies dentro de este género, hace que se origine una gran confusión y que su taxonomía sea objeto de errores de mayor o menor consideración (Koehn, 1991).

En base a diferentes caracteres morfométricos de la concha, Lamy (1936) reconoció siete especies distintas del género *Mytilus*: *M. edulis*, Linné 1758 (latitudes templadas del hemisferio Norte); *M. galloprovincialis*, Lamarck 1819, (Mar Mediterráneo); *M. trossulus*, Gould 1850, (costa pacífica de América del Norte, y no presente en el hemisferio Sur); *M. chilensis*, Hupé 1864, (Chile); *M. platensis*, d'Orbyigny 1846, (Argentina); *M. planulatus*, Lamarck 1819, (Australia) y *M. desolationis*, Lamy 1936 (= *M. kerguelensis*, Fletcher). Por su parte, Soot-Ryen (1955), además de reconocer la mayor parte de los siete taxones anteriores como subespecies de *M. edulis*, identificó como especies distintas *M. coruscus*, Gould 1861 (= *M. crassitesta*,

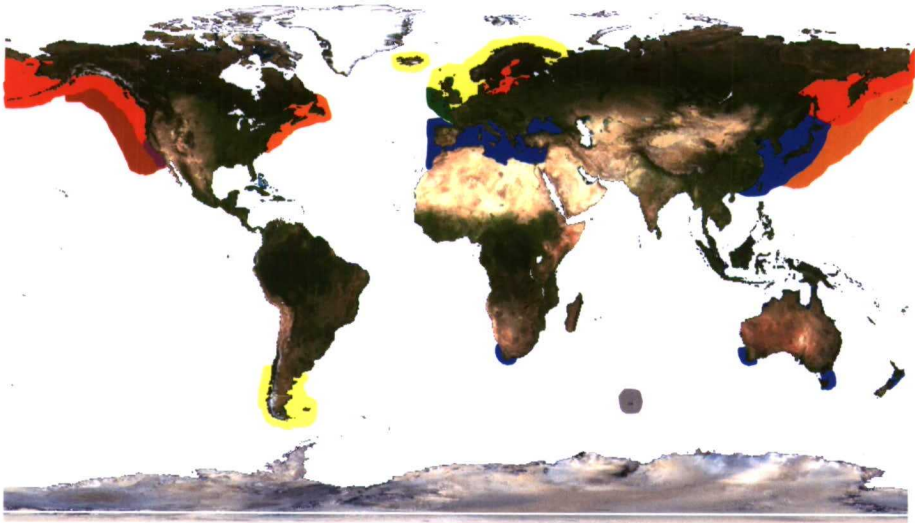
Lischke 1868), de Japón y China, y *M. californianus*, Conrad 1837, de la costa pacífica de América del Norte.

Las especies *M. californianus* y *M. coruscus*, se identifican fácilmente por la presencia de nervios radiales en la concha (Soot-Ryen, 1955). Sin embargo, Vermeij (1989) sugirió que podrían tratarse de la misma especie, pero con variación geográfica, en base a la menor prominencia de dichos nervios en especímenes de *M. californianus* de las Islas Aleutianas. Sin embargo, la gran divergencia en la secuencia de ADN nuclear entre estos dos taxones, podría sugerir que se traten de especies diferentes (Milyutina & Petrov, 1989).

La aplicación de técnicas electroforéticas para caracterizar la composición genética a nivel individual y poblacional, combinada con los análisis multivariantes aplicados a los fenotipos enzimáticos y morfométricos, han ayudado a clarificar parcialmente el estatus taxonómico y sistemático de las especies del género *Mytilus*, sugiriendo la existencia de tres linajes evolutivamente distintos: *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* (Bulnheim & Gosling, 1988; McDonald & Koehn, 1988; Varvio *et al.*, 1988; Koehn, 1991; McDonald *et al.*, 1991; Seed, 1992).

Tanto *M. edulis* como *M. galloprovincialis* se encuentran en ambos hemisferios, mientras que *M. trossulus* aparece confinado tan sólo en el hemisferio Norte. Los mejillones de las Islas Kerguelen fueron clasificados como *M. desolationis* por Lamy (1936) y posteriormente por Blot *et al.* (1987) en base a datos alozimicos, sin embargo McDonald *et al.* (1991) los consideraron *M. edulis*, al igual que las muestras procedentes de Chile, Argentina e Islas Malvinas porque, a pesar de contener alelos característicos de las tres especies anteriores del hemisferio Norte, son más similares a *M. edulis*. Asimismo, los estudios en mejillones del Sur de África, mostraron frecuencias alélicas muy similares a las obtenidas en individuos pertenecientes a *M. galloprovincialis* del Mar Mediterráneo y Suroeste de Inglaterra (Grant & Cherry, 1985; Beaumont *et al.*, 1989). Además, registros históricos indican que *M. galloprovincialis* fue introducido accidentalmente en Sudáfrica desde algún lugar antes de 1972 (McDonald *et al.*, 1991) y en Japón (Wilkins *et al.*, 1983).

En la **Figura 1** se muestra la distribución geográfica de las especies de mejillón pertenecientes al género *Mytilus*. En ella se pueden apreciar las zonas híbridas donde coexisten *M. edulis* con *M. galloprovincialis*, *M. edulis* con *M. trossulus*, y *M. galloprovincialis* con *M. trossulus*.



- | | |
|-------------------------------|--|
| ■ <i>M. galloprovincialis</i> | ■ <i>M. galloprovincialis - M. edulis</i> |
| ■ <i>M. edulis</i> | ■ <i>M. trossulus - M. edulis</i> |
| ■ <i>M. trossulus</i> | ■ <i>M. trossulus - M. galloprovincialis</i> |
| ■ <i>M. californianus</i> | |
| ■ <i>M. coruscus</i> | |
| ■ <i>M. desolationis</i> | |

Figura 1. Distribución global de diferentes formas de *Mytilus* basada en datos aportados por Seed, 1976; Skibinski & Beardmore, 1979; Scarlato, 1981; Skibinski *et al.*, 1983; Wilkins *et al.*, 1983; Gosling, 1984; Koehn *et al.*, 1984; Grant & Cherry, 1985; Lee & Morton, 1985; Suchanek, 1985; Bulnheim & Gosling, 1988; McDonald & Koehn, 1988; Varvio *et al.*, 1988; Beaumont *et al.*, 1989; McDonald *et al.*, 1990, 1991; Sanjuan *et al.*, 1990; Koehn, 1991; Väinölä & Hvilson, 1991; Gosling, 1992a, b; Seed, 1992; Sanjuan *et al.*, 1994.

La controversia existente en cuanto a la posición taxonómica que ocupan *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* se manifiesta en las afirmaciones de diferentes autores. Así, algunos opinan que no se pueden considerar especies distintas al ser genéticamente compatibles entre sí, y no presentar ningún carácter morfológico ni genético claramente diagnóstico (Skibinski *et al.*, 1983; Gosling, 1984; Brock, 1985; Johannesson *et al.*, 1990). Por el contrario, otros autores como McDonald & Koehn (1988), Koehn (1991) y McDonald *et al.*, (1991) consideran estas tres formas como especies distintas ya que, a pesar de la hibridación existente entre ellas en determinadas zonas, cada uno de estos tres taxones mantiene un conjunto de alelos característicos, presentando frecuencias alélicas homogéneas incluso a lo largo de grandes distancias (McDonald *et al.*, 1991). Este hecho conlleva a que estos tres tipos aparezcan mencionados en numerosas ocasiones con el nombre de “complejo *M. edulis*”.

2. ASPECTOS CITOGENÉTICOS Y MOLECULARES DEL GÉNERO *Mytilus*

Durante los últimos años, los diferentes trabajos realizados tanto a nivel citogenético como molecular han contribuido a mejorar la caracterización de las especies de este género y, en algunos casos, han ayudado a dilucidar la controversia en cuanto a su complejo estatus taxonómico.

2.1 La citogenética en el género *Mytilus*

Los primeros estudios de cuantificación de ADN en el género *Mytilus* fueron realizados por Hinegardner (1974), el cual analizó 55 especies de 22 familias, entre las que se encontraban *M. edulis* y *M. californianus*, con unos valores de 1.60 pg y 1.90 pg respectivamente. Posteriormente, Cavalier-Smith (1978) indicó que, en base a todos los estudios realizados, la variación del contenido de ADN haploide de varias especies de moluscos bivalvos estaba comprendida entre 0.43 pg y 5.4 pg. Por su parte, Ieyama *et al.*, (1994) analizaron, mediante un sistema de análisis de imagen, ocho especies de la familia Mytilidae, entre las cuales se encontraban *M. galloprovincialis* y *M. coruscus*, con un Valor-C de 1.35 pg y 1.90 pg respectivamente. Mediante la combinación de técnicas de análisis de imagen y citometría de flujo, Rodríguez-Juiz *et al.*, (1996) analizaron el contenido de ADN, obteniendo unos valores de 1.92 pg y 1.71 pg para *M.*

galloprovincialis y *M. edulis* respectivamente. Posteriormente, González-Tizón *et al.*, (2000) obtuvieron valores de 1.51 pg para *M. trossulus* y 1.61 pg para *M. californianus*.

Los estudios del número y morfología cromosómicos han sido utilizados para la identificación de especies e incluso de poblaciones. Todas las especies de *Mytilus* presentan una dotación cromosómica diploide de $2n = 28$ (Ahmed & Sparks, 1970; Ieyama, 1983; Thiriot-Quévieux, 1984; Dixon & Flavell, 1986; Martínez-Lage *et al.*, 1997), y no existe ninguna evidencia de la presencia de cromosomas sexuales (Dixon & McFadzen, 1987; Gosling, 1992b). En cuanto a su morfología, existen ciertas diferencias con respecto al número de cromosomas submetacéntricos y subtlocéntricos, sobre todo a nivel intraespecífico e intrapoblacional (Dixon & Flavell, 1986; Martínez-Lage *et al.*, 1996).

El estudio de regiones cromosómicas tiene su fundamento en la inducción de bandas. Los patrones de bandas permiten identificar regiones cromosómicas concretas, detectar anomalías, establecer mapas cromosómicos y realizar estudios evolutivos. De este modo, en el género *Mytilus* se han llevado a cabo análisis de heterocromatina mediante bandeo C en *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* (Dixon *et al.*, 1986; Dixon & McFadzen, 1987; Martínez-Lage *et al.*, 1994, 1995). Asimismo, Méndez *et al.* (1990) indujeron patrones de bandas G con 2xSSC y Martínez-Lage *et al.* (1994) describieron un patrón de bandas G con tripsina, obteniendo unos resultados muy diferentes a los de Moore *et al.* (1986). También ha sido posible localizar los *loci* ribosomales (18S, 5.8S y 28S), mediante técnicas de detección indirectas (Ag-NORs) y directas (FISH), en *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus* y *M. californianus*, en posición mayoritariamente telomérica en cromosomas metacéntricos o submetasubtelocéntricos (Dixon *et al.*, 1986; Martínez-Expósito *et al.*, 1994; Insua *et al.*, 1994; Martínez-Lage *et al.*, 1995, 1997; Insua & Méndez, 1998; González-Tizón *et al.*, 2000). Además, mediante el empleo combinado de bandeo C, tinción Ag-NOR, tinción con fluorocromo CA3 y bandas inducidas después de la digestión con diferentes enzimas de restricción, han sido descritos distintos tipos de heterocromatina en *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* (Martínez-Lage *et al.*, 1994, 1995).

2.2 Análisis moleculares en el género *Mytilus*

2.2.1 Marcadores moleculares proteicos

Los estudios basados en los marcadores proteicos permitieron, por una parte, evaluar el grado de variabilidad genética presente en diferentes poblaciones de las diferentes especies del género *Mytilus* y, por otra, adjudicar en algunos casos *loci* diagnósticos que permitieron mejorar el entendimiento del estatus taxonómico de dicho género.

A pesar del elevado número de enzimas potencialmente disponibles para llevar a cabo los estudios de variabilidad alozímica, tan sólo unas pocas muestran unos niveles de variación suficientemente elevados (Ahmad *et al.*, 1977). Así, esterasa-D (*Est-D*), leucina aminopeptidasa (*Lap-1*), glucosa fosfato isomerasa (*Gpi*), aminopeptidasa (*Ap*), peptidasa 2 (*Lap-2*), fosfoglucomutasa (*Pgm*), octopina deshidrogenasa (*Odh*) y manosa fosfato isomerasa (*Mpi*) son las enzimas que más ampliamente han sido utilizadas para diferenciar las distintas especies del género *Mytilus* (Skibinski *et al.*, 1983; Grant & Cherry, 1985; Varvio *et al.*, 1988; McDonald & Koehn, 1988). Si bien, aunque ninguno de estos *loci* es capaz de discriminar inequívocamente entre *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, Varvio *et al.* (1988) y McDonald & Koehn (1988) apuntaron que el *locus Mpi* es virtualmente diagnóstico. Por su parte, Sanjuan *et al.* (1990) encontraron, mediante una combinación de 4 *loci* alozímicos (*Est-D*, *Lap-1*, *Odh* y *Mpi*) en poblaciones de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, que la probabilidad de error en la clasificación era extraordinariamente baja (1.5×10^{-7}) e incluso el 99% de los individuos de sus muestras podrían ser asignados correctamente con el genotipo de la *Est-D*. No obstante, es preciso tener en cuenta que las variaciones en el genotipo, ya sean a escala local o a escala geográfica, podrían reflejar patrones diferenciales debidos a la selección ambiental (Gartner-Kepkay *et al.*, 1983; Johannesson *et al.*, 1990; Tedengren *et al.*, 1990). Por ello, McDonald *et al.* (1991) establecieron variables canónicas útiles para diferenciar entre *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* mediante un análisis discriminante, en el cual utilizaron las 8 enzimas clásicas combinadas con caracteres morfométricos en poblaciones distribuidas por todo el mundo.

Por otra parte, el análisis de las frecuencias alozímicas mostró también la existencia de una discontinuidad genética en la distribución de *M. galloprovincialis* en el Sureste de la Península Ibérica, coincidiendo con la frontera oceanográfica de Almería-Orán, debido a las diferentes condiciones bióticas y abióticas de estas dos áreas. Esto significaría una importante barrera geográfica para la migración de las larvas de mejillón entre esas dos zonas (Sanjuan *et al.*, 1994; Quesada *et al.*, 1995).

El análisis de la variabilidad alozímica ha permitido descubrir un déficit de heterocigotos en todas las especies pertenecientes al género *Mytilus* (Zouros & Foltz, 1984; Volkaert & Zouros, 1989; Beaumont, 1991), la cual es más probable en individuos de talla pequeña y sólo en algunos *loci* determinados (Koehn *et al.*, 1976; Tracey *et al.*, 1975; Diehl & Koehn, 1985), entre cuyas causas Zouros & Foltz (1984) barajan factores como la endogamia, el efecto Wahlund, la existencia de alelos nulos, la aneuploidía y, fundamentalmente, la selección natural. Además, se ha demostrado la existencia de una correlación positiva entre la heterocigosidad para un pequeño número de *loci* polimórficos y algunos caracteres relacionados con la eficacia biológica, tales como la tasa de crecimiento, la viabilidad, fecundidad, actividad locomotora y diversos parámetros metabólicos como el descenso en el consumo de oxígeno y la síntesis más eficiente de proteínas (Singh & Zouros, 1978; Koehn & Shumway, 1982; Volkaert & Zouros, 1989; Gaffney, 1994). Esta correlación se cree que es debida a la mayor eficiencia media del metabolismo basal en los individuos heterocigotos, como se refleja en la reducción de las tasas de respiración (Diehl *et al.*, 1985).

2.2.2. *Análisis del genoma mitocondrial*

El ADN mitocondrial (ADNmt) es especialmente útil en estudios evolutivos debido a que está presente en un elevado número de copias y muestra un polimorfismo intraespecífico muy elevado al evolucionar mucho más rápidamente que el ADN nuclear. Su tasa de mutación es extraordinariamente alta debido a que no han desarrollado suficientes mecanismos de corrección ni reparación, a la ausencia de empaquetamiento con histonas, al elevado número de rondas de replicación, a la mayor proporción de ADN codificante con respecto al no codificante y a la exposición a radicales libres procedentes de la respiración celular (Strachan & Read, 2000).

En el género *Mytilus*, el estudio del ADNmt ha revelado la existencia de un patrón de herencia característico, denominado Herencia Doble Uniparental (DUI) (Fisher & Skibinski, 1990; Skibinski *et al.*, 1994; Zouros *et al.*, 1994a, 1994b). Este fenómeno hace referencia a la existencia de dos linajes de ADNmt (heteroplasmia), el Tipo F, que se encuentra en todos los individuos y es transmitido por las hembras a toda su descendencia, y el Tipo M, que sólo se encuentra en los machos y se transmite a través de los espermatozoides a los individuos masculinos. Hoeh *et al.* (1996) sugieren que la DUI puede ser una de las causas de la elevada tasa de evolución del ADNmt. Este patrón de herencia ha sido observado en *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* (Skibinski *et al.*, 1994; Zouros *et al.*, 1994a, 1994b; Rawson & Hilbish, 1995; Zbawicka *et al.*, 2003), y entre híbridos *M. edulis*-*M. galloprovincialis* (Rawson *et al.*, 1996), pero entre híbridos *M. edulis*-*M. trossulus* y *M. galloprovincialis*-*M. trossulus* este patrón de herencia se interrumpe (Zouros *et al.*, 1994b; Rawson *et al.*, 1996).

Además de estudiar el patrón de herencia en el género *Mytilus*, el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) ha permitido detectar diferenciaciones geográficas y proporcionar, a su vez, información adicional de los agentes que influyen en la estructura genética de las poblaciones (Brown, 1983; Avise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987; Avise, 1994; Mitton, 1994). Así, mediante el empleo de estos marcadores, ha sido posible estudiar los patrones de distribución de poblaciones de *M. galloprovincialis* del Suroeste de Europa (Sanjuan *et al.*, 1996) y de *M. edulis* de las Islas Británicas (Skibinski *et al.*, 1999). Wenne & Skibinski (1995), analizando poblaciones europeas de mejillón, encontraron que las frecuencias haplotípicas son mucho más similares entre *M. edulis* y *M. trossulus* que cualquiera de estas con *M. galloprovincialis*. También se ha detectado la presencia de *M. trossulus* en latitudes más meridionales como el Sur de California, de manera contraria a lo reflejado mediante estudios alozímicos, probablemente debido a un fenómeno de introgresión del genoma mitocondrial de *M. trossulus* en individuos de *M. galloprovincialis* (Geller, 1994).

Otros análisis llevados a cabo incluyen la obtención de la secuencia completa del ADNmt de *M. edulis*, con la excepción de algunos espaciadores (Hoffman *et al.*, 1992). Además, el estudio de diferentes subunidades de la citocromo *c* oxidasa ha permitido diferenciar linajes mitocondriales en distintas especies pertenecientes a este género

(Hoeh *et al.*, 1996; Beagley *et al.*, 1997; Quesada *et al.*, 1998; Sutherlnad *et al.*, 1998) y también establecer relaciones filogenéticas (Stewart *et al.*, 1995). Asimismo, el estudio del ADNr 16S ha sido empleado para analizar las variaciones intraespecíficas e intrapoblacionales entre *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* (Geller *et al.*, 1993), para conocer la distribución de distintos linajes mitocondriales en machos y en hembras de diferentes poblaciones de *M. trossulus* y *M. galloprovincialis* (Rawson & Hilbish, 1995) y para confirmar la distribución antitropical del mejillón (Hilbish *et al.*, 2000).

2.2.3. El ADN ribosómico

El ADN ribosómico (ADNr) ha sido ampliamente utilizado en análisis filogenéticos debido a las diferentes tasas de evolución que presentan las distintas regiones de la unidad de repetición. También se ha empleado como marcador molecular para diferenciar especies, evaluar la variabilidad genética de las poblaciones y conocer la estructura y organización de los genomas.

Kenchington *et al.* (1995) estudiaron la divergencia de la secuencia del gen ribosomal 18S, análogo nuclear del gen parcialmente secuenciado por Geller *et al.* (1993), mediante el diseño de *primers* que amplifican la región evolutivamente más conservada del gen. Sus resultados permitieron desarrollar una perspectiva acerca de la filogenia general de los taxones de mitílidos al ser comparados con los restos fósiles. Así, utilizando la elevada tasa de evolución del DNAr 16S (Ochman & Wilson, 1987; Wilson *et al.*, 1987), estimaron que las especies pertenecientes al complejo *M. edulis* se habrían formado hace unos 10 o 20 millones de años, durante el Mioceno, mientras que el origen del género habría tenido lugar hace 150 millones de años, en el Jurásico, coincidiendo con los datos paleontológicos. No obstante, recalibrando este reloj molecular en base a la tasa de evolución del ADNr 18S, el origen del complejo *M. edulis* habría tenido lugar hace 33 millones de años en el Oligoceno, originándose el género *Mytilus* hace al menos 250 millones de años.

También ha sido posible diseñar marcadores basados en la amplificación por PCR del espaciador transcrito interno (ITS) entre los genes ribosomales 18S y 28S. La posterior digestión de los productos de amplificación permitió discriminar entre *M.*

trossulus y *M. edulis-galloprovincialis* (Heath *et al.*, 1995), y entre *M. californianus* y las especies del complejo *M. edulis* (Heath *et al.*, 1996). De manera similar y utilizando los mismos *primers*, Toro (1998) encontró sendos patrones de bandas específicos para *M. edulis chilensis* (~*M. chilensis*) y para larvas de *M. trossulus*.

El análisis filogenético incluyendo la secuencia completa del ADNr 18S en siete especies representativas de las cuatro subfamilias de Mytilidae (Modiolinae, Lithophaginae, Crenellinae y Mytilinae) llevado a cabo por Distel (2000), constató el origen monofilético para la familia Mytilidae y polifilético para las subfamilias Mitilinae y Modiolinae. No obstante, este aspecto es discutido por Chichvarkhin (2002), que plantea otra clasificación diferente de las especies de mejillón en base a datos de la ultraestructura del esperma; por ello, según este autor, las cuatro subfamilias anteriores tendrían un origen monofilético.

El mapa físico de los genes ribosomales 18S-5.8S-28S de *M. galloprovincialis* fue realizado, mediante FISH, por Insua & Méndez (1998), concluyendo que dichos genes están localizados en la región telomérica del brazo largo de dos pares cromosómicos submetacéntricos-subtelocéntricos, al igual que en *M. edulis* (Insua *et al.*, 2001). González-Tizón *et al.* (2000) localizaron los *loci* ribosomales 18S-5.8S-28S en posición telomérica y subterminal en los brazos cortos de tres pares cromosómicos, dos submetacéntricos y uno metacéntrico, de *M. californianus*; y en *M. trossulus*, en posición telomérica en los brazos cortos de dos pares metacéntricos y en el largo de uno submetacéntrico. Por lo que respecta al ADNr 5S, la caracterización de su unidad de repetición fue llevada a cabo por Insua *et al.* (2001) en *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, encontrando dos clases de unidades 5S con espaciadores altamente divergentes y con una idéntica región codificante en ambas clases y en ambos mejillones. También, mediante FISH, pudieron constatar que no existen diferencias en la distribución de la unidad ADNr 5S entre ambos mejillones.

2.2.4. Familia génica de las histonas

Las histonas son un tipo de proteínas muy básicas involucradas en el empaquetamiento del ADN en los cromosomas eucariotas. Existen dos grupos de proteínas histónicas, las que constituyen el *core* nucleosomal (H2A, H2B, H3 y H4),

altamente conservadas, y las histonas *linker* o H1 (Thoma *et al.*, 1979), que presentan un considerable grado de variación evolutiva y participan en la formación de niveles superiores de organización en la fibra de cromatina (Marzluff, 1986).

La primera caracterización de la histona H1 en el género *Mytilus* la llevaron a cabo Drabent *et al.* (1999) en *M. edulis*, sugiriendo que los genes de este tipo de histona se agrupan de manera repetitiva, entre 100 y 110 copias por genoma haploide, e independiente a las histonas del *core* nucleosomal. Por su parte, Eirín-López *et al.* (2002) realizaron una caracterización molecular y evolutiva de la histona H1 en distintas especies de mejillón distribuidos por todo el mundo, poniendo de manifiesto la hipótesis de un origen “huérfano” para los genes de H1 de *Mytilus*. Asimismo, el análisis filogenético que llevaron a cabo reveló la agrupación, en un *cluster*, de *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* y, en otro *cluster*, *M. chilensis* y *M. californianus*. Además localizaron, mediante FISH, la posición telomérica de algunas copias de la histona H1 en *M. galloprovincialis* y corroboraron el número de copias por genoma haploide descrito por Drabent *et al.* (1999) en cada una de las especies analizadas.

2.2.5. Secuencias de copia única o bajo número de copias

El ADN de copia única o bajo número de copias (hasta 10 por genoma haploide) está constituido por la fracción de ADN que renaturaliza lentamente. Una parte de ese ADN está constituido por genes que se expresan para dar lugar a la síntesis de proteínas, y otra parte está formada por secuencias reguladoras y/o desconocidas.

Entre los estudios de secuencias de copia única llevados a cabo en mejillón destacan los de los genes que codifican para la proteína esperma-específica *protamine-like*, las proteínas del biso, la actina y la calmodulina.

Las proteínas esperma-específicas *protamine-like* (PL), a diferencia de las histonas, presentan una variación muy acentuada entre especies (Zalensky & Zalenskaya, 1980; Ausió & Subirana, 1982; Ausió, 1988; Mogensen *et al.*, 1991; Ausió, 1992; Galindo *et al.*, 1992). Así, en el esperma de *Mytilus* se han identificado tres proteínas PL: PL-II, PL-III y PL-IV, las cuales constituyen el 80% aproximadamente

del complemento proteico de los cromosomas, con un pequeño componente de proteínas históricas (Ausió, 1992; Carlos *et al.*, 1993).

Heath *et al.* (1995) desarrollaron un marcador especie-específico basado en la amplificación por PCR de la región codificante de la PL-II (Mogensen *et al.*, 1991; Carlos *et al.*, 1993) y posterior digestión con endonucleasas de restricción, diferenciando *M. trossulus* de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* de distintas localizaciones de Norteamérica. Sin embargo, ampliando este estudio con poblaciones europeas y americanas, Rodríguez *et al.* (2001) encontraron ligeras diferencias en la digestión del fragmento diagnóstico de *M. trossulus* al analizar una población sueca de *M. trossulus* y las poblaciones de *M. edulis* de Isle of Man y Prince Edward Island.

La amplificación por PCR de la proteína PL-III (o PHI-1), llevada a cabo por Heath *et al.* (1996) a partir de un ADNc obtenido por Ruíz-Lara *et al.* (1993), originó dos fragmentos de amplificación, de 280 pb y de 380 pb, en poblaciones americanas de *M. californianus*, a diferencia de otras poblaciones de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus*, en las cuales el único fragmento producido era de 280pb. La posterior caracterización de la secuencia y la estructura del gen de la PL-III por Heath & Hilbish (1998) en *Mytilus*, permitió observar su elevada variabilidad no sólo entre especies de mejillón, sino también dentro de especies y poblaciones, lo cual les hizo suponer que estas secuencias se encontraban dispersas y presentes en un elevado número de copias. Por otro lado, también observaron como la secuencia de *M. californianus* es la más divergente. Por su parte, Rodríguez *et al.* (2001) encontraron, en algunos individuos de distintas poblaciones de *M. galloprovincialis* y *M. edulis*, un nuevo producto de amplificación de unas 300pb, y otro de 475pb en algunos individuos de *M. edulis* de Isle of Man. Los datos extraídos de estos trabajos muestran que este *locus* se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg en todas las poblaciones de *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, pero no en las poblaciones de *M. californianus*.

El biso de los mejillones está constituido por una compleja disposición de proteínas, denominadas proteínas polifenólicas adhesivas, producidas por la glándula endocrina del pie, y componentes clave en la sujeción del mejillón al sustrato (Waite, 1992).

Así, la proteína 1 ha sido aislada y caracterizada en *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. coruscus* (Filpula *et al.*, 1990; Laursen, 1992; Waite, 1992; Inoue & Odo, 1994; Inoue *et al.*, 1995a, 1995b, 1996). Mediante la amplificación por PCR de la región no repetitiva, Inoue *et al.* (1995a, 1995b, 1995c) consiguieron un marcador diagnóstico para la identificación de *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*. Analizando más poblaciones de mejillón, Rodríguez *et al.* (2001) encontraron que la población de Isle of Man, contenía los patrones de amplificación típicos de *M. trossulus* y *M. galloprovincialis*, y la población de Puerto Aguirre seguía el patrón de *M. galloprovincialis*. Asimismo, mediante la amplificación de secuencias de la región variable de esta proteína, fue posible identificar la mayor parte de los mejillones japoneses como *M. galloprovincialis* (Inoue *et al.*, 1997), coincidiendo con los resultados obtenidos por Wilkins *et al.* (1983) en base a datos morfológicos y alozímicos.

Los últimos 875 residuos aminoácidos de la proteína 1 son codificados por un único exón largo de aproximadamente 2.5 kb; Rawson *et al.* (1996) diseñaron unos marcadores genéticos para los extremos 5' y 3' de este gen, y lo denominaron gen *Glu*, el cual ha sido clonado y secuenciado tanto en *M. edulis* (Filpula *et al.*, 1990) como en *M. galloprovincialis* (Inoue & Odo, 1994). En base a esto, ha sido posible diseñar dos marcadores moleculares, el *Glu-5'* y el *Glu-3'*, que identifican respectivamente, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* entre sí y, por otro lado y tras la digestión de los fragmentos de amplificación con la endonucleasa *Dde-I*, *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (Rawson *et al.*, 1996). Mediante el estudio del polimorfismo de *Glu-5'*, ha sido posible demostrar la presencia de genes de *M. edulis* en individuos de *M. trossulus* del atlántico nororiental (Borsa *et al.*, 1999). Del mismo modo, Rodríguez *et al.* (2001) detectaron en la población de *M. trossulus* de Öland Island un patrón similar al descrito por Borsa *et al.* (1999).

Las actinas son proteínas contráctiles altamente conservadas, características de la casi totalidad de las células eucariotas. En las células musculares desempeñan un papel importante en la contracción miofibrilar, y en las no musculares están involucradas en distintas funciones tales como la movilidad, la fagocitosis, los movimientos cromosómicos y el transporte de macromoléculas dentro de las células (Korn, 1978). Así, Ohresser *et al.* (1997) diseñaron un marcador genético basado en la

amplificación por PCR del polimorfismo de longitud de un intrón del *locus mac-1* del gen de la actina. Mediante este marcador lograron diferenciar poblaciones europeas de *M. galloprovincialis* y *M. edulis*, así como demostrar la reciente introgresión entre estas dos especies. El trabajo de Daguin & Borsa (1999), utilizando este mismo marcador, consistió en la caracterización de los mejillones de la costa Noroeste de África como *M. galloprovincialis*.

La calmodulina (*CaM*) es una proteína reguladora que interviene en una gran cantidad de procesos mediados por Ca^{+2} . El gen de la calmodulina es uno de los genes minoritarios que está filogenéticamente extendido, con posiciones intrónicas altamente conservadas y que codifica proteínas altamente conservadas (Nojima & Sokabe, 1989). Así, Côté-Real *et al.* (1994a) demostraron la existencia de un polimorfismo en el intrón *CaM-1* de este gen. Los análisis que llevaron a cabo en distintas poblaciones europeas pertenecientes al complejo *M. edulis* sugirieron la posibilidad de utilizar este intrón como un marcador genético neutro, puesto que las frecuencias genotípicas se encontraban en equilibrio Hardy-Weinberg. Además, sus resultados proporcionan una serie de pruebas que evidencian la existencia de un flujo genético restringido entre poblaciones de mejillones de las costas Oeste y Noreste de las Islas Británicas. Estos autores demostraron también la heredabilidad de este polimorfismo, mediante ensayos en larvas de mejillón (Côté-Real *et al.*, 1994b). Por su parte, Rodríguez *et al.* (2001), analizando más poblaciones de mejillón, encontraron que tan sólo los individuos de las poblaciones de Yerseke e Isle of Man, a priori *M. edulis*, presentaban el polimorfismo.

2.2.6. Secuencias de elevado número de copias o ADN altamente repetido

El ADN altamente repetido está constituido por la fracción de ADN que renaturaliza más rápidamente, y suele constar de secuencias cortas que se repiten muchos miles de veces. Estas secuencias pueden estar organizadas en tándem, denominándose ADN satélite (Singer, 1982; Beridze, 1986). Las características de estas secuencias, así como su rápida evolución, hacen que sean de extraordinaria utilidad en el análisis de relaciones filogenéticas entre especies relacionadas (Lima de Faria *et al.*, 1984; Arnason, 1990; Vidal-Rioja *et al.*, 1994).

Los análisis de ADN satélite en mejillón han sido llevados a cabo en la especie *M. edulis* por Ruíz-Lara *et al.* (1992, 1993), quienes caracterizaron tres tipos diferentes tras la digestión con la endonucleasa *Apa I*. El Tipo I, con un tamaño de unidad de repetición de 173 pb; el Tipo II, con un monómero de 161 pb y el Tipo III, cuyo monómero presenta una longitud de 166 pb. Posteriormente, Martínez-Lage *et al.* (2002) confirmaron la existencia de estos tres tipos de ADN satélite en varias poblaciones de mejillón, y obtuvieron el mapa físico de estas secuencias en poblaciones de *M. trossulus*, *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. Asimismo, estos autores han diferenciado *stocks* de poblaciones de *M. galloprovincialis* del resto de especies mediante RFLPs obtenidos tras la digestión de las secuencias Tipo I con la endonucleasa *Msp I* (Rodríguez *et al.*, 2001).

3. SECUENCIAS ANÓNIMAS DE ADN

Para el estudio genético de poblaciones son particularmente útiles aquellos marcadores moleculares que, entre otros aspectos, generen una cantidad razonable de polimorfismo, se transmitan siguiendo un patrón de herencia mendeliano y, desde el punto de vista práctico, sean efectivos tanto en coste como en tiempo (Orehsser *et al.*, 1997). En este sentido la amplificación por PCR de secuencias anónimas de ADN utilizando *primers* de secuencia aleatoria, ha dado lugar a un tipo de marcador que cumple perfectamente estos requisitos. Se denominan RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) (Welsh & McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990) y esencialmente amplifican secuencias de ADN, cuyo contenido mínimo en G-C sea del 40%, de longitud variable localizadas entre repeticiones invertidas cortas utilizando un único *primer* de ~10 nucleótidos (**Figura 2**). Esta amplificación produce un conjunto de fragmentos de distinto peso molecular cuyo número teórico está directamente relacionado, entre otros factores, con el tamaño del genoma ya que, asumiendo que los sitios de unión para un *primer* de 10 nucleótidos están aleatoriamente distribuidos por el genoma, el número de productos de PCR sería aproximadamente de $2.5 \times 10^9 \times G$, donde G es el tamaño del genoma haploide en pares de bases.



Figura 2. Amplificación aleatoria, mediante PCR, de ADN polimórfico (RAPD)

El nivel de polimorfismo que generan es extraordinariamente elevado, haciéndolos muy útiles para el análisis de poblaciones y especies congénicas (Demeke *et al.*, 1992; Landry & Lapointe, 1996). Existen diferentes aspectos que han contribuido a que esta técnica haya sido ampliamente utilizada por numerosos autores: (i) tan sólo son necesarios unos cuantos nanogramos de ADN molde para llevar a cabo la reacción de PCR, (ii) no se requiere un conocimiento previo del genoma, pudiendo aplicarse a cualquier ADN no degradado, y (iii) los productos de amplificación originados se distribuyen aleatoriamente por el genoma representando una combinación de *loci* tanto codificantes como no codificantes mostrando, por tanto, una imagen representativa de la distribución de la variación (Hadrys *et al.*, 1992; Tinker *et al.*, 1993). Entre los estudios llevados a cabo destacan: la determinación de la variabilidad y estructura genética de poblaciones (Rodríguez *et al.*, 1999; Gauer & Cavalli-Molina, 2000; Hellsten & Sundberg, 2000), la caracterización de especies y/o poblaciones (Burow *et al.*, 1996; Callejas & Ochando, 1998; Pascual & Serra, 1999; Aubert & Lightner, 2000; Warnke *et al.*, 2000), la realización de mapas genéticos (Peltier *et al.*, 1994; Krutovskii *et al.*, 1998; Yin *et al.*, 2001), el análisis de relaciones filogenéticas entre especies (Stammers *et al.*, 1995; Badaracco *et al.*, 1995; Marillia & Scoles, 1996) y la identificación de marcadores ligados, bien a algún gen determinado (Bai *et al.*, 1995; Bai, 1998), o bien sexo-específicos (Lessells & Mateman, 1998; Urasaki *et al.*, 2002).

Al igual que para la mayoría de los marcadores genéticos, la información contenida en un marcador RAPD individual es muy baja. Tan sólo cuando un elevado número de estos *loci* anónimos se emplean para definir un genoma, es cuando empiezan a tener utilidad (Williams *et al.*, 1990). El número de *loci* que, a priori, se pueden analizar es muy elevado y depende, además del tamaño del genoma, de factores tales como la composición de dicho genoma, la calidad del ADN molde, la secuencia del *primer* y las condiciones de reacción (Williams *et al.*, 1990). Estas características son de

extrema importancia para asegurar la reproducibilidad de los marcadores generados. No obstante, muchos autores (Williams *et al.*, 1990; Arnold *et al.*, 1991; Hu & Quiros, 1991) afirman que si la reacción se repite dos o tres veces, la mayoría de los *loci* obtenidos serán claramente reproducibles y muestreables. Por contra, es posible que se produzca un fenómeno de comigración de los fragmentos de amplificación.

Una particularidad de esta técnica es que está diseñada para detectar cambios dentro de los sitios de unión entre el *primer* y el ADN molde, así como diferencias en longitud entre dichos sitios, a través de inserciones y deleciones. Las mutaciones en estos sitios de unión afectarán a la hibridación *primer*-ADN molde y, consecuentemente, a la amplificación de un fragmento en particular (Caetano-Anolles & Bassam, 1993), mientras que inserciones y deleciones entre los sitios de unión alterarán la longitud del fragmento amplificado. Ambos casos originarán cambios en el patrón de amplificación originado por un *primer*, y el significado de estas diferencias puede ser utilizado para determinar la estructura genética de una población. Además, controlando la cantidad y calidad del ADN molde, estandarizando las condiciones de reacción y realizando el análisis al nivel taxonómico apropiado, los RAPDs constituyen una poderosa herramienta para el estudio de la genética, sistemática y ecología de las poblaciones (Dowling *et al.*, 1996).

El carácter dominante que manifiestan estos marcadores implica que el genotipo heterocigoto normalmente no se podrá diferenciar del homocigoto. En este sentido, Lynch & Milligan (1994) diseñaron una serie de estimadores para distintos parámetros relacionados con la genética poblacional con el objeto de minimizar el sesgo inherente a los resultados obtenidos mediante RAPDs. Con el objetivo de convertir determinados *loci* RAPDs en marcadores codominantes, Paran & Michelmore (1993) diseñaron otro tipo de marcador denominado SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), que consiste en la obtención de *primers* específicos, sintetizados a partir de secuencias obtenidas de fragmentos RAPDs clonados, bien mediante un software específico o bien extendiendo el extremo 3' terminal del *primer* RAPD hasta las siguientes 7 a 14 bases internas del fragmento clonado. Entre las ventajas que presentan destacan la pequeña cantidad de ADN requerido, la sencillez para llevar a cabo la amplificación y la elevadísima reproducibilidad que generan. Desde entonces, numerosos autores han empleado los SCARs fundamentalmente en análisis de

identificación de especies (Jones *et al.*, 1997; Agustí *et al.*, 2000) y en la construcción de mapas de ligamiento (Paran & Michelmore, 1993; Hernández *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001).

En el género *Mytilus* existen escasas referencias en relación con el empleo de los marcadores RAPDs. Hasta el momento, sólo Li Ma *et al.* (2000) han analizado los efectos de la contaminación sobre la variabilidad genética en diferentes poblaciones de *M. galloprovincialis* del Sur de California, concluyendo que la polución de las zonas contaminadas reducía la variabilidad genética en las poblaciones afectadas. En el mejillón verde *Perna canaliculus* se ha analizado la estructura genética de diferentes poblaciones, concluyendo que existe una clara diferenciación genética entre las poblaciones del Norte y el Sur de Nueva Zelanda, a diferencia de lo que había sido detectado previamente mediante alozimas (Star *et al.*, 2003). También se han llevado a cabo diferentes estudios en otros moluscos bivalvos; así se ha profundizado en la sistemática y caracterización de distintas especies y poblaciones del género *Donax* (Adamkewicz & Harasewych, 1994, 1996), distinguiendo claramente entre taxones de Norteamérica y del Caribe. Se ha analizado la estructura genética de poblaciones de *Placopecten magellanicus* (Patwary *et al.*, 1994), comprobando la herencia mendeliana de los *loci* RAPDs. También se han realizado estudios de diferenciación genética entre distintas poblaciones de *Pecten maximus* del Oeste de Gran Bretaña (Heipel *et al.*, 1998), poniendo de manifiesto la existencia de una estructura genética en estas poblaciones, en contra de la que había sido determinado previamente mediante alozimas. Por otra parte, André *et al.* (1999) han diferenciado larvas y adultos de *Cerastoderma edule* de larvas y adultos de *C. lamarcki*, y de adultos de *Mya arenaria*, *Macoma balthica*, *Scrobicularia plana*, *Venerupis pullastra* y *Mytilus edulis*. Asimismo, Hirschfeld *et al.* (1999) analizaron la diversidad genética de diferentes poblaciones americanas de *Crassostrea virginica*, proporcionando información básica sobre la variación genética en ostras cultivadas y salvajes de la localidad de Massachussets.

En cuanto a los SCARs, actualmente no existe ningún análisis llevado a cabo en el género *Mytilus*. No obstante, en moluscos bivalvos, Klinbunga *et al.* (2001) desarrollaron marcadores SCARs especie-específicos para intentar identificar cinco

especies de ostras en Tailandia: *Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, *Saccostrea cucullata*, *Saccostrea forskali* y *Striostrea mytiloides*.

A pesar de los numerosos trabajos realizados en el género *Mytilus*, la controversia en cuanto a su taxonomía sigue existiendo. Así, en el presente trabajo se lleva a cabo otro tipo de estudio, novedoso en este género, consistente en el desarrollo y puesta a punto de marcadores RAPDs con el fin de analizar la estructura genética de diferentes poblaciones de mejillón, así como tratar de contribuir en la evaluación de la variabilidad poblacional, en la identificación de algunas de las especies de importancia comercial que lo constituyen y en el esclarecimiento del estatus taxonómico de dicho género.

OBJETIVOS

Los diferentes trabajos llevados a cabo en el género *Mytilus* han ayudado a profundizar en su caracterización genética y han contribuido a mejorar el conocimiento de su compleja taxonomía. Sin embargo, es preciso incrementar los estudios en las diferentes especies que lo constituyen, algunas de ellas de excepcional importancia comercial. Por ello, en el presente trabajo se han fijado los siguientes objetivos:

- 1- Identificar y evaluar marcadores moleculares polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPDs) en el género *Mytilus*.
- 2- Estimar la variabilidad y estructura genética poblacional en diferentes especies de mejillón distribuidas por todo el mundo.
- 3- Caracterizar las secuencias de distintos fragmentos RAPDs y evaluar su posible aplicación como marcadores moleculares de especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL DE ESTUDIO

En este trabajo se han analizado seis especies pertenecientes al género *Mytilus*, y una especie perteneciente al género *Perna*, todas ellas englobadas en la familia Mytilidae, y procedentes de catorce localidades geográficas (**Figura 3**).

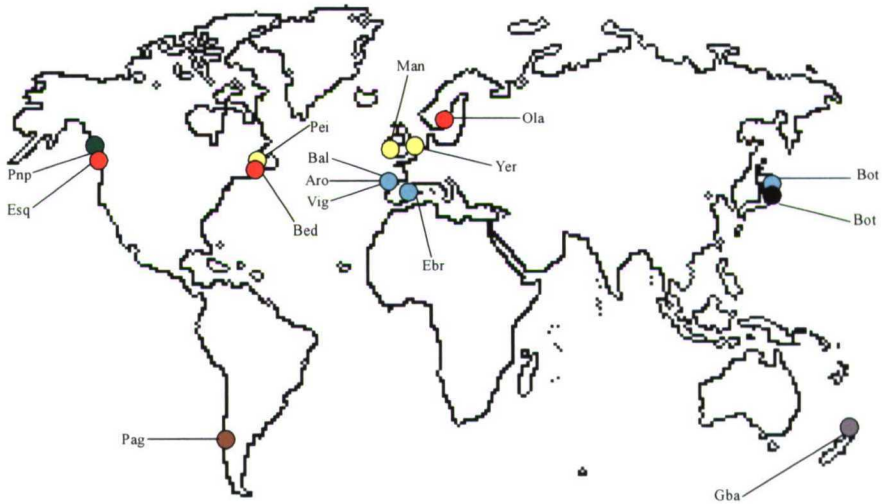


Figura 3. Localización geográfica de los individuos analizados. **Bal:** Balcobo, costa Noroeste de España; **Aro:** Ría de Arousa, costa Noroeste de España; **Vig:** Ría de Vigo, costa Noroeste de España; **Ebr:** Delta del Ebro, costa Este de España; **Yer:** Yerseke, Holanda; **Man:** Isle of Man, Mar de Irlanda, Reino Unido; **Pei:** Prince Edward Island, Este de Canadá; **Pag:** Puerto Aguirre, Chile; **Esq:** Esquimalt Lagoon, Isla de Vancouver, Oeste de Canadá; **Bed:** Bedford Basin, Nueva Escocia, Este de Canadá; **Ola:** Öland Island, Mar Báltico, Suecia; **Pnp:** Point No Point, Isla de Vancouver, Oeste de Canadá; **Gba:** Golden Bay, Nueva Zelanda; **Bot:** Bahía de Otsuchi, Japón. En amarillo aparecen las poblaciones de *M. edulis*, en azul las de *M. galloprovincialis*, en rojo las de *M. trossulus*, en verde la población de Point No Point de *M. californianus*, en marrón la población de *M. chilensis* de Puerto Aguirre, en negro la población japonesa de *M. coruscus* y en gris la población de *Perna canaliculus* de Golden Bay.

La denominación de las especies de los diferentes lugares geográficos se llevó a cabo basándose en la distribución geográfica, los caracteres morfológicos de la concha, los datos alozímicos y/o marcadores moleculares, dependiendo de cada caso. De este modo, en base a los datos alozímicos publicados por Sanjuan *et al.* (1994) y Quesada *et al.* (1995) los individuos de Balcobo, Ría de Arousa, Ría de Vigo y Delta del Ebro fueron identificados como *Mytilus galloprovincialis*, y los de Yerseke como *M. edulis*. Los individuos de Isle of Man se consideraron *M. edulis* en base a la distribución geográfica de Gosling (1992a). Los individuos de Esquimalt Lagoon fueron determinados como *M. trossulus* atendiendo a la morfología de la concha, ya que se trata de la población tipo donde Gould describió esta especie y se diferencia fácilmente de *M. californianus*, con la que cohabita en dicha localidad. Los individuos pertenecientes a Öland Island se identificaron como *M. trossulus* en base a los datos alozímicos publicados por Bulnheim & Gosling (1988) y Varvio *et al.* (1988). Los de Point No Point se determinaron como *M. californianus* por la presencia de nervios radiales en la concha, característicos de esta especie. Los individuos procedentes de la costa Atlántica canadiense, Prince Edward Island y Bedford Basin, fueron identificados como *M. edulis* y *M. trossulus* respectivamente, mediante la amplificación de la región ITS descrita por Heath *et al.* (1995). Los individuos de Puerto Aguirre y Golden Bay fueron suministrados por ANFACO-CECOPESCA, quienes los clasificaron como *M. chilensis* y *P. canaliculus* respectivamente. Sin embargo, la población de *M. chilensis* fue clasificada como subespecie de *M. edulis* (*M. edulis chilensis*) por McDonald *et al.* (1991). Finalmente, los ejemplares de la Bahía de Otsuchi fueron caracterizados morfológicamente como *M. galloprovincialis* y *M. coruscus*.

2. EXTRACCIONES DE ADN

2.1 Extracción de ADN genómico

Los individuos muestreados proceden de localidades costeras naturales, excepto Ría de Arousa, Ría de Vigo, Delta del Ebro, Yerseke, Prince Edward Island, Puerto Aguirre y Golden Bay que son cultivadas. Según la procedencia de las muestras, el análisis se realizó a partir de viandas conservadas en etanol 95%, como en el caso de Isle of Man, Esquimalt Lagoon, Öland Island y Point No Point; a partir de viandas congeladas, como es el caso de Puerto Aguirre y Golden Bay; y de tejido fresco, como en

las de Balcobo, Ría de Arousa y Vigo, Delta del Ebro, Prince Edward Island, Bedford Basin y bahía de Otsuchi, en cuyos casos, tras extraer el ADN, el resto del individuo se conservó en etanol 95%.

La obtención de ADN de los diferentes individuos analizados se llevó a cabo según el procedimiento de Rice & Bird (1990), a partir de tejido muscular y gonadal. Los tejidos conservados en etanol se lavaron previamente con 1XPBS y agua destilada. Posteriormente, se homogeneizaron en 600 μ L de tampón de lisis con proteinasa K 25-30 mg de tejido, y se incubaron en un baño a 55-60°C durante toda la noche. Tras la incubación, se extrajo el ADN añadiendo 280 μ L de una solución de NaCl saturada y 500 μ L de cloroformo. El ADN extraído se precipitó añadiendo etanol absoluto y acetato sódico 0.3 M. Finalmente, se lavó en etanol 70% y, tras secar el precipitado, se resuspendió en 1XTE.

2.2 Extracción de ADN mitocondrial

Para la obtención de ADN mitocondrial se partió de los mismos tejidos anteriores, en una cantidad aproximada de 2 g para, posteriormente, homogeneizarlos con nitrógeno líquido y un mortero. Una vez añadidos 5 volúmenes de tampón TEK, se transfirió el sobrenadante a dos tubos de polipropileno y se añadió, en el fondo del tubo, un volumen de solución TEK-Sacarosa 15%. Tras centrifugar 10 minutos a 10000 g a 4°C, se recuperó con cuidado el sobrenadante para centrifugarlo de nuevo a 8000 g durante otros 10 minutos. En este precipitado recién formado se encuentran las mitocondrias.

El precipitado se lavó con 6 mL de tampón EST frío, se centrifugó y se resuspendió en 0.5 mL a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezcló el contenido de ambos tubos. A continuación se añadió 0.1 volúmenes de SDS al 18% para lisar las membranas mitocondriales y 0.2 volúmenes de NaCl 5 M para extraer el ADN nuclear, SDS y las proteínas precipitadas; se mezcló bien y se centrifugó a 8000 g durante 15 minutos a 4°C. Para eliminar las proteínas solubles en agua, se añadió un volumen de fenol y se centrifugó durante 10 minutos a 12000 g, se transfirió la fase superior a un tubo limpio y se repitió el procedimiento con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico

(25:24:1). El sobrenadante se pasó a otro tubo y se precipitó en 2 volúmenes de etanol 100% durante toda la noche a -20°C . Finalmente, se centrifugó durante 10 minutos a 12000 g a 4°C , se lavó el precipitado con alcohol 70° y se resuspendió en TE con 6 μL de ARNasa libre de ADNasa.

2.3 Extracción de ADN de larva

Para inducir el desove, se utilizaron individuos adultos pertenecientes a la población de *M. galloprovincialis* de Balcobo. Se introdujeron en recipientes individuales y se indujo el desove mediante un choque térmico de 27°C . A continuación, se mezclaron óvulos y espermatozoides en una cápsula Petri a una concentración de 1000 espermatozoides/mL y de 15-30 óvulos/mL (Pechenik *et al.*, 1990) y se añadió penicilina y estreptomycin a una concentración de 500 U/mL. Finalmente, se colocaron los espermatozoides y óvulos libremente en oscuridad a una temperatura de 18°C para que tuviese lugar la fecundación. Las larvas obtenidas se guardaron en etanol frío (4°C) hasta su individualización y posterior extracción de ADN.

Tras su individualización, se añadió un volumen de 200 μL de agua destilada por tubo. Se centrifugó 5 minutos a 10000 g y se eliminó el sobrenadante hasta que quedó en el tubo un volumen de ~ 100 μL . A continuación, se realizó un choque térmico manteniendo los tubos 30 minutos a -80°C , calentándolos a 95°C durante 3 minutos y volviéndolos a introducir a -80°C hasta que se realizase la PCR, para la cual se emplearía un volumen de 15 μL de la solución.

2.4 Extracción de ADN plasmídico a pequeña escala (Miniprep)

El protocolo utilizado es una modificación de los métodos de lisis alcalina de Birnboim & Doly (1979) e Ish-Horowicz y Burke (1981), tomado de Sambrook *et al.* (1989). Tras inocular con el clon de interés 5 mL de medio LB estéril conteniendo 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ampicilina, se dejaron crecer las bacterias a 37°C toda la noche con agitación vigorosa. El botón celular se resuspendió en 100 μL de tampón glucosa frío y la lisis se llevó a cabo durante 5 minutos en hielo con 200 μL de tampón de lisis. El ADN

bacteriano se precipitó por neutralización con 150 μL de una solución fría de acetato potásico a pH 4.8; la incubación en hielo durante 5 minutos y la posterior centrifugación a 4°C durante 10 minutos hicieron posible la separación del ADN bacteriano. La fase acuosa fue sometida posteriormente a extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La precipitación con etanol absoluto se realizó a -20°C durante toda la noche. El precipitado final, conteniendo ADN plasmídico y ARN, se resuspendió en 50 μL de 1XTE con 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ARNasa libre de ADNasa.

3. ELECTROFORESIS Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

La calidad y cantidad del ADN se valoró mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa en tampón 1XTAE, a una intensidad de 3 V/cm. El progreso de la electroforesis se siguió a través de la migración de los colorantes, azul de bromofenol y azul de xianol, incluidos en el tampón de carga, el cual contiene glicerol al 30% como agente para aumentar la densidad. Se utilizaron varios marcadores de peso molecular (Roche) de los cuales el ADN marcador III se empleó para estimar las concentraciones, el ADN marcador XIV (100pb) para estimar los pesos moleculares de los fragmentos amplificados por PCR y el ADN marcador VI, marcado con digoxigenina, fue utilizado para las transferencias a membrana del Southern. Los geles se tiñeron por inmersión en una solución de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromuro de etidio durante 30 minutos y, posteriormente, se visualizaron en un transiluminador y se captaron en una cámara de video UVP (*Ultra-Violet Products, Gel documentation System Imagestore 5000, version 7.12*). Finalmente, la concentración del ADN y los pesos moleculares de los productos de PCR de los RAPDs se estimaron con el programa *Gelworks* (Gelwld 2.51).

4. AMPLIFICACIONES POR PCR

4.1 Amplificación por PCR utilizando *primers* de secuencia aleatoria

Todas las reacciones de amplificación fueron realizadas utilizando 1.25 U de Taq polimerasa, Tampón 1X, 0.2 mM dNTPs y 1.75 mM MgCl_2 de Bioline, y 0.2 μM de *primer*, en un volumen final de 25 μL , que también incluye el ADN a una concentración de 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

El protocolo de PCR fue realizado empleando un termociclador ventilado modelo *Gene CyclerTM* de Bio-Rad. Para llevar a cabo la amplificación al azar de secuencias anónimas de ADN, se utilizaron 40 *primers* de diez nucleótidos (*Advanced Biotechnologies*) de secuencia aleatoria (**Tabla 1**). El programa fue el siguiente: una desnaturalización inicial de 94°C 3 minutos, seguida de una primera fase de diez ciclos de baja astringencia, que constan de: 94°C 45 segundos, 40°C 1 minuto y una extensión final a 72°C durante 1 minuto 15 segundos; y una segunda fase de 30 ciclos de astringencia alta: 94°C 45 segundos, 50°C 1 minuto y 72°C 1 minuto; finalizando con un ciclo de extensión a 72°C durante 5 minutos.

Tabla 1 *Primers* utilizados en el análisis

<i>Primer</i>	Secuencia	<i>Primer</i>	Secuencia
ABA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'	AB9-01	5'-ACTCCACGTC-3'
ABA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	AB9-02	5'-CACCCGAGTT-3'
ABA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	AB9-03	5'-AGCCAGGCTG-3'
ABA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	AB9-04	5'-GGCGTAAGTC-3'
ABA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'	AB9-05	5'-GGGTGCAGTT-3'
ABA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'	AB9-06	5'-GGGAACCCGT-3'
ABA-07	5'-GAAACGGGTG-3'	AB9-07	5'-TCGCTGCGGA-3'
ABA-08	5'-GTGACGTAGG-3'	AB9-08	5'-AAGGCTGCTG-3'
ABA-09	5'-GGGTAACGCC-3'	AB9-09	5'-GGGGGAGATG-3'
ABA-10	5'-GTGATCGCAG-3'	AB9-10	5'-CTGTGTGCTC-3'
ABA-11	5'-CAATCGCCGT-3'	AB9-11	5'-GTCCATGCAG-3'
ABA-12	5'-TCGGCGATAG-3'	AB9-12	5'-AACGGCGGTC-3'
ABA-13	5'-CAGCACCCAC-3'	AB9-13	5'-CTTCCAGGAC-3'
ABA-14	5'-TCTGTGCTGG-3'	AB9-14	5'-AGCCGGGTAA-3'
ABA-15	5'-TTCCGAACCC-3'	AB9-15	5'-TGATGCCGCT-3'
ABA-16	5'-AGCCAGCGAA-3'	AB9-16	5'-GTGTCGAGTC-3'
ABA-17	5'-GACCGCTTGT-3'	AB9-17	5'-TCAGCACAGG-3'
ABA-18	5'-AGGTGACCGT-3'	AB9-18	5'-TGTCTGCGT-3'
ABA-19	5'-CAAACGTCGG-3'	AB9-19	5'-ACCACGCCCT-3'
ABA-20	5'-GTTGCGATCC-3'	AB9-20	5'-GAGTCTCAC-3'

4.2 Marcaje de sondas por PCR

Las sondas utilizadas en este trabajo se corresponden con fragmentos RAPDs obtenidos a partir de la amplificación con los *primers* seleccionados para el análisis.

El marcaje de las sondas se realizó introduciendo, en el fragmento de ADN, nucleótidos unidos a digoxigenina (digoxigenina 11-dUTP, Roche), con la ayuda de la enzima Taq ADN polimerasa, mediante la técnica de PCR. El volumen final de la reacción fue de 50 μ L y las concentraciones finales de los componentes de esta fueron: 1.75 mM MgCl₂, 1.25 U Taq ADN polimerasa, Tampón 1X (todos los componentes de Bioline), 0.2 mM de dATP, dGTP y dCTP, 0.19 mM de dTTP, 0.01 mM de digoxigenina 11-dUTP (dNTPs y digoxigenina de Roche), 1 ng/ μ L del ADN a marcar y 0.2 μ M de cada *primer*. La reacción se sometió a los ciclos de temperatura que se indican en el apartado anterior.

4.3 Amplificación de fragmentos específicos

La amplificación de los fragmentos específicos fue llevada a cabo bajo condiciones estándar de PCR utilizando elevadas temperaturas de hibridación: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos que comprenden una desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, una fase de hibridación entre 48°C y 56°C (según el caso) durante 40 segundos, y una extensión a 72°C durante 40 segundos, seguido de una extensión final a 72°C durante 3 minutos.

5. HIBRIDACIÓN SOUTHERN BLOT

Los fragmentos resultantes de la amplificación correspondientes a diferentes individuos de las distintas especies, fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa y transferidos a membranas de *nylon*. El ADN fijado a la membrana se hibridó posteriormente con varias sondas de ADN.

- Electroforesis y transferencia a membrana

Los fragmentos de amplificación correspondientes a los individuos seleccionados para la hibridación se separaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa de 15 cm de longitud, a una intensidad de 3 V/cm y al 1.5% en 1XTAE, en los que se incluyen: ADN marcador VI con digoxigenina (Roche).

Tras la electroforesis, se procedió a la desnaturalización y neutralización del gel, mediante dos lavados de 15 minutos con agitación suave en las soluciones correspondientes. Posteriormente, los fragmentos se transfirieron a membranas de *nylon* cargadas positivamente (Roche) en un *Vacuum Blotter* modelo 785 de Bio Rad.

La transferencia cuantitativa depende principalmente de tres factores: tiempo de transferencia, presión de vacío y concentración de agarosa. La realización de diferentes ensayos, variando estos tres factores, permitió establecer las condiciones óptimas de transferencia para nuestros fragmentos. Dicha transferencia se realizó en 10XSSC durante 1 h a 128 mm de Hg. Posteriormente, para fijar el ADN a la membrana, se expuso durante 5 minutos a U.V. en un *CL-1000 Ultraviolet Crosslinker* (UVP), estando aún húmeda.

- Prehibridación e hibridación de la membrana

Una vez introducidas las membranas en botellas de cristal, se prehibridaron durante 30 minutos a 50°C en un horno *Hybaid*TM con el volumen apropiado de solución de prehibridación precalentada. Transcurrido este tiempo, se añadió la sonda previamente desnaturalizada y marcada con digoxigenina a una concentración de 25 ng/mL en solución de hibridación, incubándose a 50°C durante 16 h aproximadamente, en rotación constante.

- Lavados posthibridación y detección de la hibridación

La detección de la hibridación se llevó a cabo utilizando el sistema no radiactivo de ácidos nucleicos *DIG Luminescent Detection* (Roche). Las sondas hibridadas, marcadas con digoxigenina, son inmunodetectadas con anti-digoxigenina, fragmentos

Fab conjugados con fosfatasa alcalina y, posteriormente, visualizadas con el sustrato quimiluminiscente CSPD[®]. La defosforilación enzimática del CSPD[®] por la fosfatasa alcalina produce una emisión de luz, con una onda máxima de 477 nm, la cual es recogida en películas (*Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech*). La señal quimioluminiscente del CSPD[®] persiste durante días en las membranas de *nylon*. Además, este sistema permite la rehibridación de las mismas membranas con diferentes sondas.

Después de la hibridación se lavaron las membranas durante 5 minutos en tampón de lavado 1 a temperatura ambiente, seguido de dos lavados de 5 minutos a 50°C en los tampones de lavado 2 y 3, respectivamente y, a continuación, un lavado de 5 minutos a temperatura ambiente en tampón de lavado 4. Posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo, incubando la membrana durante 30 minutos en 100 mL de tampón bloqueante.

El conjugado anti-Dig-AP (Roche) se diluyó a 75 mU/mL en tampón bloqueante y la membrana se incubó durante 30 minutos en 20 mL de dicha solución. El anticuerpo no unido al ADN se elimina mediante dos lavados de 15 minutos en 100 mL de tampón de lavado 4. Para detectar los sitios de hibridación, se diluyó el sustrato CSPD[®] en tampón de detección 1:100 y se incubó la membrana durante 5 minutos en 10 mL de dicha solución. Para incrementar la reacción de quimioluminiscencia, se incubó la membrana durante 15 minutos a 37°C y, a continuación, se expuso durante 15 minutos aproximadamente a temperatura ambiente con la película fotográfica.

Previamente a la reutilización de las membranas en nuevas hibridaciones, se eliminó la sonda mediante dos lavados de 15 minutos a 37°C en tampón de lavado 5, seguidos de un lavado de 5 minutos en 2XSSC. Posteriormente, se procedió a la prehibridación e hibridación de la membrana con una sonda diferente como se ha descrito anteriormente.

6. HIBRIDACIÓN DOT BLOT

Para verificar el fenómeno de comigración de determinados fragmentos RAPDs, se escindieron dichos fragmentos, además de un fragmento control, a partir de un gel de agarosa. A continuación, se depositaron dos cantidades distintas de ADN en puntos discretos de membranas de *nylon* para, posteriormente, llevar a cabo la hibridación con una sonda marcada. Para ello, previamente se desnaturalizaron las muestras, durante 5 minutos a 95°C seguido de 5 minutos en hielo, y a continuación se lavó la membrana en 2XSSC y se colocaron dichas muestras sobre la misma. Tras fijar el ADN a la membrana durante 5 minutos bajo luz ultravioleta en un *CL-1000 Ultraviolet Crosslinker* (UVP), se procedió a la prehibridación e hibridación siguiendo los pasos descritos en el apartado 5.

Al día siguiente, se incubó la membrana en un volumen determinado de TNB, durante 20 minutos con agitación. A continuación se añadió la solución de anticuerpos, constituida por TNB y Anti-Dig-AP, y se incubó durante 45 minutos con agitación. Finalmente, antes de llevar a cabo la detección colorimétrica, se realizaron 3 lavados de 5 minutos en 1XPBS.

Para la detección, se prepararon 10 mL de solución de tinción NBT/BCIP añadiendo 200 µL de la solución *stock* a 10 mL de 0.1 M Tris-HCl, pH 9.5 (20°C), 0.1 M NaCl. Se incubó en oscuridad y agitación durante toda la noche.

7. SECUENCIACIÓN DE LOS FRAGMENTOS SELECCIONADOS

7.1 Aislamiento y purificación de los fragmentos

Diferentes productos de amplificación fueron escindidos del gel de agarosa utilizando un bisturí estéril para, posteriormente, purificarlos utilizando el *ConcertTM Gel Extraction System* (Life Technologies). Los fragmentos escindidos fueron introducidos en tubos eppendorf de 1.5 mL con 30 µL de tampón de solubilización (L1) por cada 10 mg de gel, para posteriormente incubarlos a 50°C durante 15 minutos y 5 minutos más, agitando cada 3 minutos para asegurar la completa disolución del gel.

A continuación, se colocó un *spin cartridge* dentro de un tubo de lavado de 2 mL, en el cual se pipeteó la mezcla anterior. Posteriormente, se centrifugó dicha mezcla a 12000 g durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante. Se volvió a colocar el *spin cartridge* dentro del mismo tubo de lavado y se añadieron 700 µL de tampón de lavado (L2), que contiene etanol y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 12000 g durante 1 minuto, se desechó el sobrenadante y se centrifugó otra vez durante 1 minuto eliminando los residuos del tampón de lavado.

Por último, se situó el *spin cartridge* dentro de un tubo de recuperación de 1.5 mL y se le añadió 50 µL de tampón TE atemperado en el centro de dicho *spin cartridge*. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g durante 2 minutos. Finalmente se precipitó el ADN en 2.5XVol de etanol absoluto frío y 1/10XVol de acetato sódico 3M.

7.2 Clonación de los fragmentos purificados

Los fragmentos purificados se clonaron en el vector *pGEM[®]-T Easy*, mediante el kit *pGEM[®]-T Easy Vector System* (Promega), utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. El vector *pGEM[®]-T Easy* tiene un tamaño de 3015 pb con una región *polylinker* que es amplificada mediante los *primers* específicos de los fagos T7 y SP6. Para calcular la cantidad apropiada de ADN (inserto) en la reacción de ligación, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng del vector} \times \text{tamaño en kb del inserto}}{\text{tamaño en kb del vector}} \times \text{relación molar vector : inserto} = \text{ng inserto}$$

Las reacciones de ligación se realizaron considerando la relación molar vector:inserto de 3:1 y empleando como enzima la ADN ligasa del fago T4. El volumen final de reacción fue de 10 µL y la incubación se llevó a cabo durante 10 h a 4°C.

Los productos de las reacciones de ligación se transformaron en bacterias competentes de la cepa JM109 de *Escherichia coli* (Promega). Para verificar las condiciones óptimas de la transformación, se realizaron reacciones de control positivo y

“de fondo”. Posteriormente, las células se sometieron a un choque térmico y se introdujeron en medio LB líquido, creciendo durante 1.5 h a 37°C con agitación. Tras la incubación, se procedió al cultivo en medio LB sólido conteniendo 100 µg/µL de ampicilina y suplementado con 100 mM IPTG y 50 mg/mL X-Gal.

7.3 Detección, selección y mantenimiento de los transformantes

Los transformantes se seleccionaron mediante la búsqueda de colonias blancas/azules, en función de la interrupción a la que el inserto da lugar al gen de la β-galactosidasa, presente en el vector plasmídico. Una vez seleccionados los transformantes (colonias blancas) se sembraron en medio LB sólido, conteniendo 100 µg/µL de ampicilina, y se incubaron durante 24 h a 37°C, conservándose una alícuota en glicerol 40% a -80°C. Posteriormente, se realizaron extracciones de ADN plasmídico, detectándose la presencia de los insertos mediante la digestión con la endonucleasa *EcoRI*. Los resultados de la digestión se observaron en geles de agarosa al 1%.

7.4 Secuenciación de ADN

Las reacciones de secuenciación se realizaron según el método enzimático de Sanger *et al.* (1977). Las dos cadenas de los plásmidos se secuenciaron independientemente utilizando el secuenciador automático *ALF expressTM* (*Amersham Pharmacia Biotech*) y los *primers* fluorescentes de los promotores de los fagos SP6 (universal) y T7 (reverso), según las instrucciones del fabricante.

8. DISEÑO DE PRIMERS ESPECÍFICOS

Se diseñaron *primers* específicos para amplificar los fragmentos clonados, a partir de secuencias consenso obtenidas mediante la secuenciación de varios clones de los distintos fragmentos.

Para diferentes fragmentos RAPDs clonados se diseñaron, de dos formas distintas pero complementarias, una pareja de *primers* específicos, denominados *primers* SCARs: el primer método consistió en utilizar el *software on-line* de diseño de

primers, *GeneFisher* (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>) y el segundo procedimiento se basó en la aplicación del programa informático OLIGO ver. 3.4 (Rychlik & Rhoads, 1989), para comprobar el diseño obtenido mediante el primer método. Este programa identifica secuencias internas susceptibles de ser utilizadas para un análisis mediante PCR.

Los *primers* fueron suministrados liofilizados con una pureza estándar y, para su utilización, se resuspendieron en IXTE con una concentración final de 100 μM .

9. ANÁLISIS DE DATOS

Debido al carácter dominante de los marcadores RAPDs, los genotipos heterocigotos son indistinguibles de los homocigotos, y la información alélica no está, por lo tanto, directamente disponible a partir de los productos originados en la amplificación. Por lo tanto, los polimorfismos fueron analizados como alelos cuya frecuencia fue estimada en base a las siguientes presunciones: (i) los productos de amplificación segregan como alelos dominantes siguiendo una herencia mendeliana; (ii) las frecuencias genotípicas para los *loci* RAPDs se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg; (iii) existe una identidad en estado entre alelos dominantes (ej: proceden de idénticas mutaciones) y (iv) entre alelos nulos (Apostol *et al.*, 1996).

A partir del análisis de todos los geles realizados, y tras seleccionar las bandas polimórficas a tener en cuenta, se construyó una matriz binaria de presencia (1) ausencia (0) de bandas, en la cual se muestra, por un lado, todos los individuos analizados y, por otro, todas las bandas polimórficas seleccionadas, que serán denominadas *loci* RAPDs.

A continuación, se realizó una tabla de frecuencias alélicas mediante el *software* BIOSYS-2 (Swofford & Selander, 1997), calculadas a partir de las frecuencias del homocigoto nulo (o recesivo) y corregidas para dominancia de acuerdo con Lynch & Milligan (1994). También se calculó el porcentaje de *loci* polimórficos por población, dividiendo el número de bandas polimórficas presentes en cada población por el total de las bandas seleccionadas para el análisis. El *software* POPGENE ver 1.32 (*Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta*) permitió calcular el índice de diversidad de Shannon, para evaluar la variabilidad genética intrapoblacional.

Posteriormente, mediante el programa informático RAPDdist 1.0 (Apostol *et al.*, 1996), fue posible calcular la matriz de distancias genéticas de Nei (1978) con la corrección de Lynch & Milligan (1994), así como los índices de fijación F_{ST} de Weir & Cockerham (1984). Por otra parte, se utilizó la relación de $F_{ST} = 1/(4Nm + 1)$ para estimar el número de migrantes por generación entre poblaciones (Nm) (Wright, 1951) con el programa RAPDfst (Apostol *et al.*, 1996). Los análisis de las topologías UPGMA y Neighbour Joining, así como el cálculo de sus valores de *bootstrap* (Felsenstein, 1985), para evaluar la fiabilidad de dichos análisis, fueron realizados mediante la aplicación de diversos programas del paquete informático PHYLIP (*PHYLogeny Inference Package*) v3.5c (Felsenstein, 1993).

Asimismo, se llevaron a cabo tres tipos de análisis estadísticos más, muy adecuados para inferir la estructura genética poblacional: el análisis de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), con el cálculo de la matriz de Φ_{ST} , para asignar la distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones y entre grupos, a partir de estructuras genéticas predefinidas, utilizando el *software* WINAMOVA 1.55 (Excoffier *et al.*, 1992); el análisis de los componentes principales (PCA) (Esbesen *et al.*, 1994), llevado a cabo mediante el paquete estadístico SPSS, el cual no requiere, a diferencia del AMOVA, una estructura genética *a priori*, sino que muestra en una nube de puntos aquellos individuos cuyos haplotipos están más relacionados. Y finalmente, se llevó a cabo el Test de Mantel (Sokal & Rohlf, 1995), para analizar la posible correlación entre las matrices de distancia genética y distancia geográfica, entre las matrices de los índices de fijación F_{ST} y Φ_{ST} , y entre la matriz de distancia de Nei (1978) y la estimada en base al modelo de Kimura dos parámetros. Estas correlaciones fueron realizadas mediante el programa *Simple Mantel Test, version 1.2* (Eric Bonnet).

El análisis de secuencias fue realizado utilizando distintos programas informáticos. Así, para obtener la secuencia consenso a partir de los distintos clones de un individuo, se emplearon el CLUSTAL X v1.81 (Thompson *et al.*, 1997) para su alineamiento y, posteriormente, el GENEDOC v2.6 (Nicholas, 1997). A continuación, a través de la página web del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), se introdujeron las distintas secuencias para buscar posibles homologías con registros nucleotídicos y aminoácidos. Para el análisis

comparativo de distintas secuencias que hubiesen manifestado algún tipo de homología, se realizó de nuevo un alineamiento múltiple de todas ellas mediante el programa CLUSTAL X v1.81 (Thompson *et al.*, 1997). La relación entre el número de cambios transicionales y transversionales y el cálculo de las distancias genéticas según el modelo de Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980), así como las filogenias mediante los métodos Neighbor-Joining y máxima parsimonia se realizaron utilizando el programa MEGA v2.0 (Kumar *et al.*, 2000). La fiabilidad de los clados filogenéticos reconstruidos se analizó mediante *bootstrap* (Felsenstein, 1985) con 1000 réplicas.

Por último, el contenido de A+T y la búsqueda de repeticiones directas e inversas (7 pb de tamaño mínimo de la repetición) en las secuencias se llevó a cabo utilizando el programa DNAtools v5.1 (Rasmussen, 1999). Asimismo, la búsqueda de *ORFs* fue realizada mediante el *software* SEQAID II v3.81 (Rhoads & Roufa, 1989).

RESULTADOS

1. SELECCIÓN DE *PRIMERS* Y *LOCI* POLIMÓRFICOS

Para llevar a cabo la elección de los *primers*, se partió de dos *kits* (ABA y AB9) de 20 unidades cada uno y se realizó una primera selección consistente en dos amplificaciones independientes en dos individuos de cada una de las 12 poblaciones. De esta manera, fue posible evaluar la presencia de amplificación y la reproducibilidad de los fragmentos originados. Seguidamente, se realizó una segunda selección, con un mayor número de individuos, teniendo en cuenta aquellos *primers* cuyos patrones de amplificación generados fueran reproducibles, polimórficos y de calidad. Los resultados permitieron seleccionar un total de siete *primers* (**Tablas 2a y 2b**).

A continuación, se llevaron a cabo las amplificaciones, por duplicado, en un total de 342 individuos: 29 de Balcobo, 30 de la Ría de Vigo, 31 de la Ría de Arousa, 32 de Delta del Ebro, 29 de Yerseke, 25 de Isle of Man, 30 de Prince Edward Island, 21 de Puerto Aguirre, 29 de Bedford Basin, 36 de Esquimalt Lagoon, 26 de Öland Island y 24 de Point No Point. Se seleccionaron las bandas en función de su calidad en la amplificación, de la no coincidencia con el blanco originado por el *primer*, del nivel de polimorfismo y de su reproducibilidad, resultando un total de 33 *loci* polimórficos, entre 4 y 6 *loci* por *primer* (**Tablas 2a y 2b**), cuya nomenclatura fue establecida en función del nombre del *primer* seguido del peso molecular de cada banda.

Tabla 2a Secuencias de los *primers* RAPDs seleccionados pertenecientes al *kit* ABA, longitud de los fragmentos generados y nivel de polimorfismo

<i>Primer</i>	Secuencia	Longitud (pb)	Nivel de polimorfismo
ABA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	1500	0.05
		1050	0.53
		850	0.31
		675	0.40
		580	0.74
ABA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'	975	0.61
		780	0.29
		525	0.46
		465	0.60
		390	0.07
ABA-07	5'-GAAACGGGTG-3'	700	0.25
		615	0.55
		475	0.46
		400	0.64
ABA-10	5'-GTGATCGCAG-3'	1400	0.15
		700	0.28
		580	0.44
		500	0.42
		400	0.47

Tabla 2b Secuencias de los *primers* RAPDs seleccionados pertenecientes al *kit* AB9, longitud de los fragmentos generados y nivel de polimorfismo

<i>Primer</i>	Secuencia	Longitud (pb)	Nivel de polimorfismo
AB9-06	5'-GGGAACCCGT-3'	850	0.84
		700	0.95
		500	0.33
		300	0.07
AB9-07	5'-TCGCTGCGGA-3'	1300	0.67
		1000	0.49
		550	0.17
		500	0.22
		400	0.33
AB9-12	5'-AACGGCGGTC-3'	325	0.36
		900	0.55
		750	0.39
		520	0.43
		350	0.65

Tras calcular el nivel de polimorfismo de cada uno de los fragmentos, sólo se seleccionaron aquellos cuya frecuencia observada fuese inferior a la siguiente relación, establecida por Lynch & Milligan (1994), según la cual:

$$p \leq 1 - \left(\frac{3}{N} \right)$$

donde p es la frecuencia observada y N el número de individuos por población. En este caso, el número de individuos por población (~29) se calculó dividiendo el total de individuos analizados, 342, entre el número de poblaciones objeto de estudio, 12. De modo que, siguiendo la ecuación anterior, sólo se seleccionaron las bandas cuya frecuencia observada en el total de las poblaciones fuese inferior a 0.90. De manera excepcional se ha considerado, entre todos los *loci* que no cumplieron este criterio, el *locus* AB9-06-700, porque se iba a proceder posteriormente a su secuenciación y análisis.

Como se observa en la **Figura 4**, la variabilidad generada por los RAPDs es especialmente elevada, de ahí su capacidad para analizar tanto la estructura como la diversidad genética de las poblaciones. Así, cabe destacar la presencia del *locus* ABA-02-580 en todos los individuos de *M. galloprovincialis*, no sólo de la Ría de Arousa, sino también de todas las poblaciones de esta especie; la amplificación del *locus* ABA-10-1400 específico para las poblaciones de *M. trossulus*; así como la existencia de los

fragmentos ABA-05-390 y AB9-06-300, diagnósticos en individuos de *M. californianus* de Point No Point.

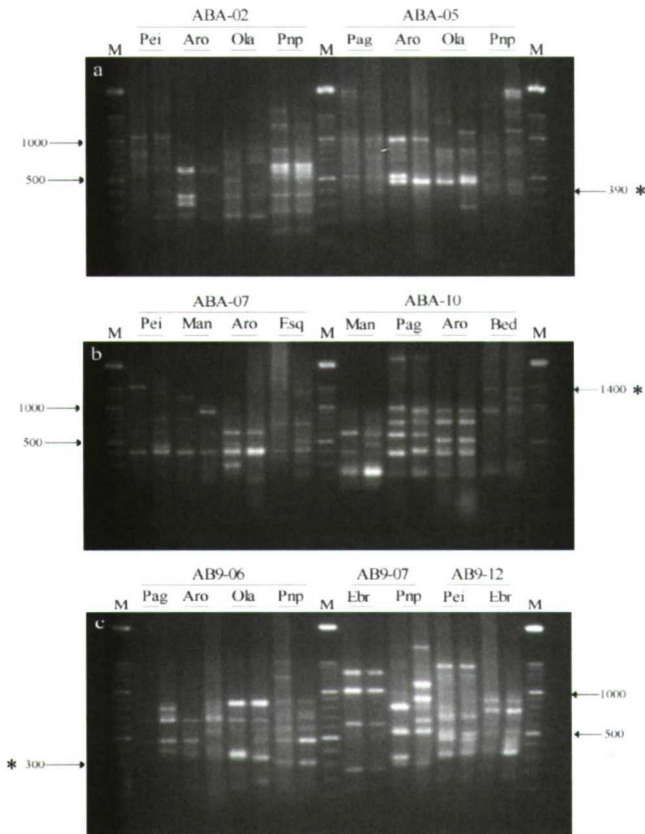


Figura 4. Marcadores RAPDs en geles de agarosa al 1.5% en diferentes poblaciones de mejillón. Amplificaciones usando a) *Primer* ABA-02 y *Primer* ABA-05; b) *Primer* ABA-07 y *Primer* ABA-10; y c) *Primer* AB9-06, AB9-07 y AB9-12. Las flechas con un asterisco (*) indican los *loci* diagnóstico para las poblaciones de *M. californianus* (ABA-05-390 y AB9-06-300) y el *locus* específico para las poblaciones de *M. trossulus* (ABA-10-1400). **Man:** Isle of Man; **Pei:** Prince Edward Island; **Pag:** Puerto Aguirre; **Aro:** Ria de Arousa; **Ebr:** Delta del Ebro; **Bed:** Bedford Basin; **Esq:** Esquimalt Lagoon; **Ola:** Òland Island; **Pnp:** Point No Point. **M:** Marcador de 100 pb, con las flechas indicando los pesos moleculares de 1000 y 500 pb.

Con respecto al origen de los fragmentos amplificados, se ha comprobado que todos pertenecen a ADN genómico y no a ADN mitocondrial (**Figura 5**). Dicha prueba se llevó a cabo amplificando ADN mitocondrial de cuatro individuos macho y cuatro individuos hembra de la población de *M. galloprovincialis* de Balcobo mediante todos los *primers* seleccionados. Como resultado, y tras dos amplificaciones independientes,

no se obtuvo ningún producto de amplificación. En las mismas reacciones se utilizaron controles con ADN genómico de los mismos individuos de Balcobo que sí mostraron los productos de amplificación seleccionados.

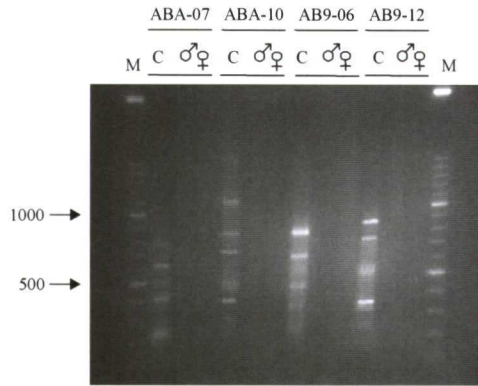


Figura 5. Amplificación de ADN mitocondrial en algunas de las parejas de individuos. Cada tres carriles representan la siguiente secuencia: individuo Control, un individuo macho y un individuo hembra de *M. galloprovincialis* de Balcobo amplificados con los primers ABA-07, ABA-10, AB9-06 y AB9-12. **M:** Marcador de 100 pb, con las flechas indicando los pesos moleculares de 1000 y 500 pb.

2. DESARROLLO Y ANÁLISIS DE MARCADORES RAPDs

Una vez seleccionadas las bandas para el análisis según los criterios anteriormente mencionados, se procedió a la construcción de una matriz binaria de presencia (1)-ausencia (0), en la cual se reflejan, por un lado, cada uno de los individuos analizados y, por otro, los *loci* RAPDs, teniendo en cuenta las premisas de Welsh & McClelland, 1990 y Williams *et al.*, 1990, según las cuales todos los *loci* RAPDs mostrarían dominancia completa presentando sólo dos alelos, con frecuencias p (dominante, banda presente) y q (recesivo, banda ausente). A partir de esta matriz de datos se desarrollaron todos los análisis posteriores.

2.1 Análisis inicial de las frecuencias alélicas

En la **Tabla 3** se muestra la distribución de frecuencias, en función de las cuales se puede observar qué *loci* están fijados, cuáles son específicos de una o varias poblaciones o especies (presentes en algún individuo de éstas y no en las demás), o bien

aquellos que son diagnóstico (presentes en todos los individuos de una población o especie y no detectados en ninguna otra).

Tabla 3 Frecuencias de los *loci* RAPDs para las distintas poblaciones analizadas

Locus	<i>M. edu</i>			<i>M. chi</i>	<i>M. gal</i>				<i>M. tro</i>			<i>M. cal</i>
	Yer	Man	Pei	Pag	Bal	Vig	Aro	Ebr	Bed	Esq	Ola	Pnp
ABA-02-1500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.492
ABA-02-1050	0.576	0.332	1.000	0.552	0.576	0.162	0.119	0.290	0.438	0.086	0.100	0.233
ABA-02-850	0.000	0.544	0.105	0.181	0.168	0.000	0.000	0.000	0.380	0.523	0.213	0.210
ABA-02-675	0.210	0.000	0.267	0.181	0.168	0.086	0.000	0.151	0.438	0.523	1.000	0.181
ABA-02-580	0.380	0.395	0.105	0.457	1.000	1.000	1.000	1.000	0.537	0.523	0.317	0.261
ABA-05-975	1.000	0.395	1.000	1.000	1.000	0.583	1.000	0.409	0.327	0.330	0.122	0.000
ABA-05-780	0.089	0.276	0.000	0.181	0.189	0.123	0.156	0.312	0.000	0.133	0.100	0.492
ABA-05-525	0.189	0.464	0.105	1.000	0.210	0.105	0.236	0.436	0.168	0.182	0.375	0.350
ABA-05-465	0.232	1.000	0.182	0.340	0.438	0.478	0.456	0.208	0.353	0.523	1.000	0.000
ABA-05-390	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
ABA-07-700	0.000	0.000	0.000	0.416	0.000	0.000	0.000	0.000	0.438	0.523	0.238	0.350
ABA-07-615	0.089	0.150	1.000	0.000	1.000	1.000	0.456	0.526	0.210	0.290	0.238	0.000
ABA-07-475	0.128	0.303	0.590	1.000	0.168	0.267	0.427	0.312	0.168	0.133	0.122	0.109
ABA-07-400	0.502	1.000	0.364	0.000	1.000	0.267	0.486	0.335	0.408	0.133	1.000	0.132
ABA-10-1400	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.408	0.495	0.122	0.000
ABA-10-700	0.000	0.000	0.000	0.416	0.502	0.267	0.257	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ABA-10-580	0.408	0.223	0.418	1.000	0.108	0.202	0.427	0.269	0.089	0.072	0.059	0.417
ABA-10-500	0.327	0.363	0.105	0.000	0.576	0.390	0.374	0.526	0.232	0.000	0.144	0.000
ABA-10-400	0.353	0.127	0.000	1.000	0.576	0.478	0.301	0.526	0.000	0.072	0.213	0.417
AB9-06-850	1.000	0.464	0.671	0.416	0.537	0.478	0.374	0.596	1.000	1.000	1.000	0.453
AB9-06-700	0.789	0.464	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.576	1.000	1.000	0.534
AB9-06-500	0.000	0.000	0.245	1.000	0.255	0.223	0.119	0.169	0.000	0.117	0.122	1.000
AB9-06-300	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
AB9-07-1300	0.380	0.428	0.290	0.377	0.502	1.000	0.374	1.000	0.380	0.234	0.439	0.261
AB9-07-1000	0.148	0.104	0.105	0.210	0.537	0.583	0.301	1.000	0.089	0.149	0.289	0.382
AB9-07-550	0.148	0.173	0.105	0.126	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.166	1.000
AB9-07-500	0.108	0.150	0.068	0.272	0.278	0.123	0.156	0.098	0.108	0.000	0.144	0.000
AB9-07-400	0.071	0.428	0.000	0.126	0.438	0.390	0.456	0.133	0.168	0.000	0.166	0.000
AB9-07-325	0.148	0.303	0.364	0.377	0.000	0.123	0.101	0.188	0.302	0.234	0.375	0.319
AB9-12-900	0.168	0.104	0.418	0.099	1.000	0.545	0.590	1.000	0.108	0.057	0.189	0.633
AB9-12-750	0.000	0.000	0.000	0.457	0.302	0.447	0.257	0.436	0.380	0.199	0.166	0.181
AB9-12-520	0.327	0.544	0.105	0.272	0.148	0.223	0.215	0.208	0.210	0.165	0.317	0.417
AB9-12-350	0.302	1.000	1.000	0.000	0.408	0.478	0.400	0.359	0.438	0.165	0.406	0.289
N	29	25	30	21	29	30	31	32	29	36	26	24

M. edu: *M. edulis*; *M. chi*: *M. chilensis*; *M. gal*: *M. galloprovincialis*; *M. tro*: *M. trossulus*; *M. cal*: *M. californianus*. **Yer**: Yerseke; **Man**: Isle of Man; **Pei**: Prince Edward Island; **Pag**: Puerto Aguirre; **Bal**: Balcobo; **Vig**: Ría de Vigo; **Aro**: Ría de Arousa; **Ebr**: Delta del Ebro; **Bed**: Bedford Basin; **Esq**: Esquimalt Lagoon; **Ola**: Öland Island; **Pnp**: Point No Point. N: número de individuos analizados.

De este modo, se consideraron fijados para una población o especie aquellos *loci* cuya frecuencia fue de 1.000, como es el caso del ABA-02-1050 en *M. edulis* de Prince Edward Island, el ABA-02-675 en *M. trossulus* de Öland Island o el ABA-02-580 en todas las poblaciones de *M. galloprovincialis*. Asimismo, el *locus* ABA-5-975 apareció fijado en poblaciones de *M. edulis*, como Yerseke y Prince Edward Island, en la población de *M. chilensis* de Puerto Aguirre, y en las poblaciones de *M. galloprovincialis* de Balcobo y Ría de Arousa; por el contrario nunca resultó amplificado en *M. californianus*. Además, los *loci* AB9-06-700 y AB9-06-850

aparecieron con una elevada frecuencia en todas las poblaciones analizadas. Así, el de 700 pb se mostró fijado para las cuatro poblaciones de *M. galloprovincialis*, además de la de Prince Edward Island (*M. edulis*), Puerto Aguirre y las poblaciones de *M. trossulus* de Esquimalt Lagoon y Öland Island; mientras que el de 850 pb se manifestó de la misma manera en las tres poblaciones de *M. trossulus* y en la de *M. edulis* de Yerseke. Por el contrario, existen determinados *loci* que no amplificaron nunca en ninguna población, como es el caso, entre otros, del ABA-07-700 en las poblaciones de *M. edulis* y las de *M. galloprovincialis*; el ABA-10-700 en las tres poblaciones de *M. edulis*, las tres de *M. trossulus* y la de *M. californianus*; el AB9-12-750 en las poblaciones de *M. edulis* y los *loci* ABA-07-400 y AB9-12-350, que no mostraron ningún tipo de amplificación en los individuos de la población de Puerto Aguirre (*M. chilensis*). En cuanto a los *loci* específicos, tan sólo han sido detectados dos, el ABA-02-1500 en la población de *M. californianus* de Point No Point y el ABA-10-1400 en las tres poblaciones de *M. trossulus*. Finalmente, se localizaron dos *loci* diagnósticos en la población de Point No Point de *M. californianus*, el ABA-05-390 y el AB9-06-300.

2.2 Análisis Southern Blot y Dot Blot

Para prevenir y corregir los posibles fenómenos de comigración de los fragmentos de amplificación, se llevaron a cabo distintas hibridaciones Southern Blot y Dot Blot. Para las hibridaciones Southern se tomaron como individuos control los pertenecientes a las poblaciones de *M. galloprovincialis* de Balcobo y Ría de Arousa para los *primers* ABA-02 y ABA-05 respectivamente, e individuos de *M. trossulus* de Öland Island para el *primer* ABA-07, y de Prince Edward Island (*M. edulis*) y Balcobo (*M. galloprovincialis*) para los *primers* AB9-07 y AB9-12 respectivamente. En el Dot, se utilizó un individuo control de *M. galloprovincialis* de la Ría de Arousa para el *locus* ABA-05-975 y uno de *M. edulis* de Prince Edward Island para el *locus* AB9-07-1000.

De este modo, tras hibridar con las siete sondas marcadas con digoxigenina, varios *loci* presentaron un probable fenómeno de comigración. Así, en la **Figura 6** se observa como el *locus* ABA-02-850 no hibrida en *M. californianus*, a pesar de presentar este fragmento al realizar la amplificación. Por el contrario, se pudo observar como el resto de los fragmentos de amplificación seleccionados mostraron la hibridación esperada.

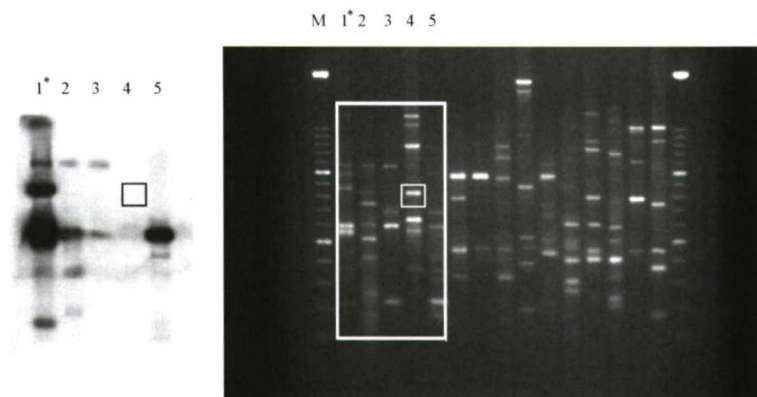


Figura 6. Hibridación Southern Blot con la sonda correspondiente al *primer* ABA-02. En el recuadro se muestra el fragmento de 850 pb de Point No Point que presentó el fenómeno de comigración. Con asterisco (*) se indica el control. **M:** Marcador de 100 pb; **1:** Balcobo; **2:** Yerseke; **3:** Esquimalt Lagoon; **4:** Point No Point; **5:** Puerto Aguirre.

Lo mismo sucedió con el *locus* ABA-05-975 en la población de Esquimalt Lagoon de *M. trossulus*, como se observa en la **Figura 7**.

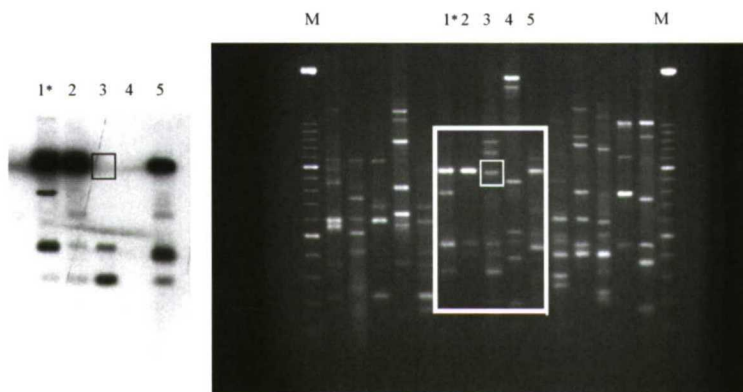


Figura 7. Hibridación Southern Blot con la sonda correspondiente al *primer* ABA-05. En el recuadro se muestra el fragmento de 975 pb de Esquimalt Lagoon que presentó el fenómeno de comigración. Con asterisco (*) se indica el control. **M:** Marcador de 100 pb; **1:** Ría de Arousa; **2:** Prince Edward Island; **3:** Esquimalt Lagoon; **4:** Point No Point; **5:** Puerto Aguirre.

Dado que el *locus* ABA-05-975 presentó el fenómeno de comigración en la población de Esquimalt Lagoon, se realizó *a posteriori* una hibridación Dot Blot, con la sonda del *primer* ABA-05, en las otras dos poblaciones de *M. trossulus* (Bedford Basin y Öland Island) a partir de sendos fragmentos de 975 pb escindidos del gel y posteriormente purificados. Así, como se observa en la **Figura 8**, y tomando como control un individuo de *M. galloprovincialis* de la Ría de Arousa, que sí presenta dicho

fragmento, la única población de *M. trossulus* que mostró señal de hibridación para ese locus fue la de Öland Island.

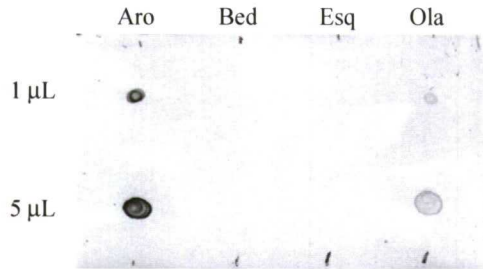


Figura 8. Hibridación Dot Blot con la sonda correspondiente al primer ABA-05 para verificar la presencia del locus ABA-05-975 en poblaciones de *M. trossulus*. **Aro:** Ría de Arousa y control; **Bed:** Bedford Basin; **Esq:** Esquimalt Lagoon; **Ola:** Öland Island.

Por otra parte, el locus ABA-07-615, como se observa en la **Figura 9** y como posteriormente se comprobó mediante secuenciación, también presentó el fenómeno de comigración. Asimismo, el locus ABA-07-400, *a priori* ausente en Puerto Aguirre (*M. chilensis*), mostró una intensa señal de hibridación con un tamaño ligeramente inferior.

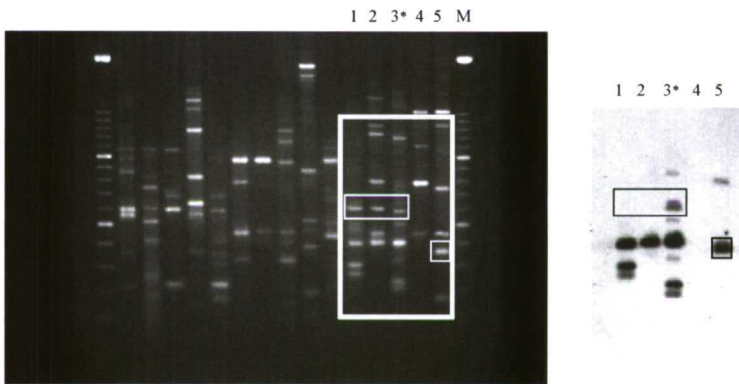


Figura 9. Hibridación Southern Blot con la sonda correspondiente al primer ABA-07. En el recuadro se muestran los fragmentos de 615 pb y 400 pb que presentaron el fenómeno de comigración. Con asterisco (*) se indica el control. **M:** Marcador de 100 pb; **1:** Ría de Arousa, **2:** Prince Edward Island; **3:** Öland Island; **4:** Point No Point; **5:** Puerto Aguirre.

De la misma manera, las amplificaciones con los primers AB9-07 y AB9-12 también mostraron posibles fenómenos de comigración. Así, como se observa en la **Figura 10**, dos loci, el AB9-07-325 en la población de *M. californianus* de Point No

Point y el AB9-07-1000 en la población de *M. trossulus* de Esquimalt Lagoon, no presentaron señal de hibridación en la membrana.

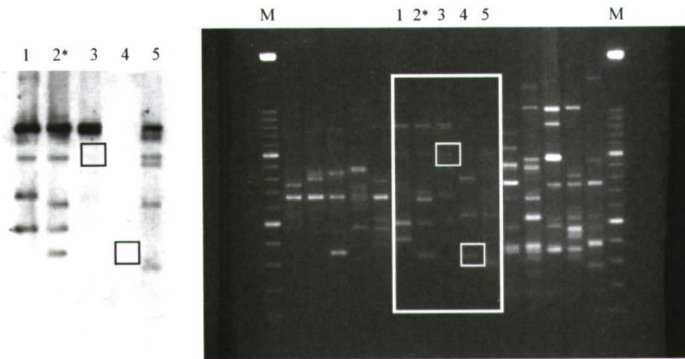


Figura 10. Hibridación Southern Blot con la sonda correspondiente al *primer* AB9-07. En los recuadros se muestran los fragmentos que presentaron el fenómeno de comigración. Con asterisco (*) se indica el control. **M:** Marcador de 100 pb; **1:** Balcobo; **2:** Prince Edward Island; **3:** Esquimalt Lagoon; **4:** Point no Point; **5:** Puerto Aguirre.

Para verificar la presencia o no del *locus* AB9-07-1000 en todas las poblaciones de *M. trossulus*, se realizó otra hibridación Dot Blot con la sonda del *primer* AB9-07 sobre sendos fragmentos de 1000 pb escindidos del gel a partir de un individuo de Öland Island y un individuo de Bedford Basin. Asimismo, también se diseñaron *primers* específicos, como posteriormente se describirá en el apartado 5, a partir del mismo fragmento del individuo control de la población de *M. edulis* de Prince Edward Island. Los resultados obtenidos de la hibridación, según se observa en la **Figura 11**, indicaron que este fragmento no está presente en ninguna de las poblaciones de *M. trossulus*.

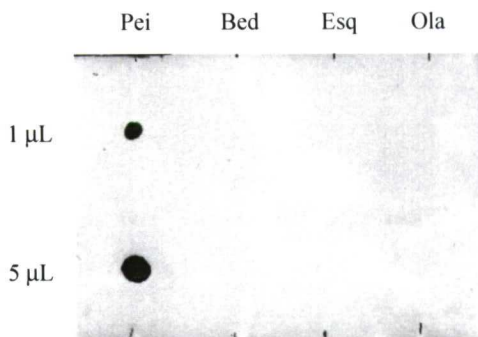


Figura 11. Hibridación Dot Blot con la sonda correspondiente al *primer* AB9-07 para verificar la presencia del *locus* AB9-07-1000 en poblaciones de *M. trossulus*. **Pei:** Prince Edward Island y control; **Bed:** Bedford Basin; **Esq:** Esquimalt Lagoon; **Ola:** Öland Island.

Con respecto al *locus* AB9-12-350, que *a priori* no había sido tenido en cuenta porque aparecía con un tamaño ligeramente superior en la población de Puerto Aguirre, mostró una intensa señal de hibridación en el Southern (**Figura 12**).

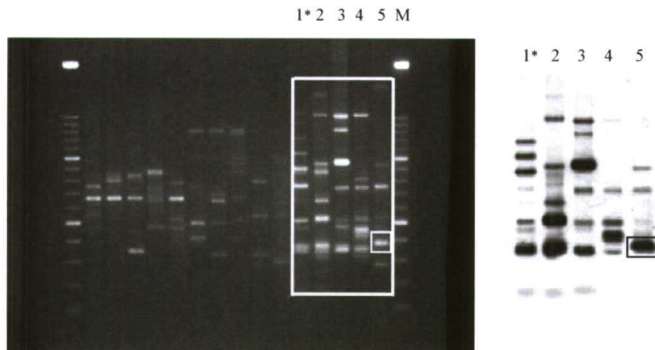


Figura 12. Hibridación Southern Blot con la sonda correspondiente al *primer* AB9-12. En el recuadro se muestra el fragmento de 350 pb de Puerto Aguirre. Con asterisco (*) se indica el control. **M:** Marcador de 100 pb; **1:** Balcobo; **2:** Yerseke; **3:** Esquimalt Lagoon; **4:** Point No Point; **5:** Puerto Aguirre.

Por otro lado, las hibridaciones correspondientes a los *primers* ABA-10 y AB9-06 no aparecen reflejados en las figuras, puesto que no presentaron ninguna variación con respecto al análisis inicial de los fragmentos de amplificación.

2.3 Análisis de las frecuencias alélicas y porcentaje de *loci* polimórficos

Como resultado de las distintas hibridaciones llevadas a cabo en el apartado anterior, los *loci* descritos a continuación han sido modificados de la siguiente manera. El **ABA-02-850** no aparece en *M. californianus*; el **ABA-05-975** no amplifica en las poblaciones de Bedford Basin y Esquimalt Lagoon de *M. trossulus*, pero sí lo hace en la población Sueca (Öland Island) de esta especie; el **ABA-07-615** se retira del análisis puesto que, como se verá más adelante, presentaba una secuencia diferente para cada individuo analizado; el **ABA-07-400** está presente, con un tamaño ligeramente inferior, en algunos individuos de la población de Puerto Aguirre (*M. chilensis*); el **AB9-07-1000** no estaría presente en ninguna de las poblaciones de *M. trossulus*; el *locus* **AB9-07-325**, aunque produce amplificación en individuos de la población de Point No Point de *M. californianus*, presentó el fenómeno de comigración, con lo que se consideraría como ausente en esta población; y el **AB9-12-350** sí está presente, aunque con un peso molecular un poco más elevado, en la población de Puerto Aguirre (*M. chilensis*).

Teniendo en cuenta el análisis anterior, los valores de frecuencias alélicas quedaron como se muestra en la **Tabla 4**, en la que se reflejan las diferencias detectadas a nivel de la población de Puerto Aguirre (*M. chilensis*), las poblaciones de *M. trossulus* y la población de *M. californianus* de Point No Point, con respecto a la descripción inicial de dicha tabla realizada en el apartado 2.1.

En la misma tabla se muestran los porcentajes de loci polimórficos, los cuales oscilaron entre el 56% para la población de Prince Edward Island (*M. edulis*) y el 69% para las poblaciones de la Ría de Vigo (*M. galloprovincialis*) y Öland Island (*M. trossulus*).

Tabla 4 Frecuencias de los distintos loci RAPDs considerando los fenómenos de comigración de fragmentos en las diferentes poblaciones analizadas

Locus	<i>M. edu</i>			<i>M. chi</i>	<i>M. gal</i>				<i>M. tro</i>			<i>M. cal</i>
	Yer	Man	Pei	Pag	Bal	Vig	Aro	Ebr	Bed	Esq	Ola	Pnp
ABA-02-1500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.492
ABA-02-1050	0.576	0.332	1.000	0.552	0.576	0.162	0.119	0.290	0.438	0.086	0.100	0.233
ABA-02-850	0.000	0.544	0.105	0.181	0.168	0.000	0.000	0.000	0.380	0.523	0.213	0.000
ABA-02-675	0.210	0.000	0.267	0.181	0.168	0.086	0.000	0.151	0.438	0.523	1.000	0.181
ABA-02-580	0.380	0.395	0.105	0.457	1.000	1.000	1.000	1.000	0.537	0.523	0.317	0.261
ABA-05-975	1.000	0.395	1.000	1.000	1.000	0.583	1.000	0.409	0.000	0.000	0.122	0.000
ABA-05-780	0.089	0.276	0.000	0.181	0.189	0.123	0.156	0.312	0.000	0.133	0.100	0.492
ABA-05-525	0.189	0.464	0.105	1.000	0.210	0.105	0.236	0.436	0.168	0.182	0.375	0.350
ABA-05-465	0.232	1.000	0.182	0.340	0.438	0.478	0.456	0.208	0.353	0.523	1.000	0.000
ABA-05-390	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
ABA-07-700	0.000	0.000	0.000	0.416	0.000	0.000	0.000	0.000	0.438	0.523	0.238	0.350
ABA-07-475	0.128	0.303	0.590	1.000	0.168	0.267	0.427	0.312	0.168	0.133	0.122	0.109
ABA-07-400	0.502	1.000	0.364	0.272	1.000	0.267	0.486	0.335	0.408	0.133	1.000	0.132
ABA-10-1400	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.408	0.495	0.122	0.000
ABA-10-700	0.000	0.000	0.000	0.416	0.502	0.267	0.257	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ABA-10-580	0.408	0.223	0.418	1.000	0.108	0.202	0.427	0.269	0.089	0.072	0.059	0.417
ABA-10-500	0.327	0.363	0.105	0.000	0.576	0.390	0.374	0.526	0.232	0.000	0.144	0.000
ABA-10-400	0.353	0.127	0.000	1.000	0.576	0.478	0.301	0.526	0.000	0.072	0.213	0.417
AB9-06-850	1.000	0.464	0.671	0.416	0.537	0.478	0.374	0.596	1.000	1.000	1.000	0.453
AB9-06-700	0.789	0.464	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.576	1.000	1.000	0.534
AB9-06-500	0.000	0.000	0.245	1.000	0.255	0.223	0.119	0.169	0.000	0.117	0.122	1.000
AB9-06-300	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000
AB9-07-1300	0.380	0.428	0.290	0.377	0.502	1.000	0.374	1.000	0.380	0.234	0.439	0.261
AB9-07-1000	0.148	0.104	0.105	0.210	0.537	0.583	0.301	1.000	0.000	0.000	0.000	0.382
AB9-07-550	0.148	0.173	0.105	0.126	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.166	1.000
AB9-07-500	0.108	0.150	0.068	0.272	0.278	0.123	0.156	0.098	0.108	0.000	0.144	0.000
AB9-07-400	0.071	0.428	0.000	0.126	0.438	0.390	0.456	0.133	0.168	0.000	0.166	0.000
AB9-07-325	0.148	0.303	0.364	0.377	0.000	0.123	0.101	0.188	0.302	0.234	0.375	0.000
AB9-12-900	0.168	0.104	0.418	0.099	1.000	0.545	0.590	1.000	0.108	0.057	0.189	0.633
AB9-12-750	0.000	0.000	0.000	0.457	0.302	0.447	0.257	0.436	0.380	0.199	0.166	0.181
AB9-12-520	0.327	0.544	0.105	0.272	0.148	0.223	0.215	0.208	0.210	0.165	0.317	0.417
AB9-12-350	0.302	1.000	1.000	0.423	0.408	0.478	0.400	0.359	0.438	0.165	0.406	0.289
N	29	25	30	21	29	30	31	32	29	36	26	24
% L.P	66%	63%	56%	63%	63%	69%	66%	59%	66%	63%	69%	59%

M. edu: *M. edulis*; *M. chi*: *M. chilensis*; *M. gal*: *M. galloprovincialis*; *M. tro*: *M. trossulus*; *M. cal*: *M. californianus*. **Yer**: Yerseke; **Man**: Isle of Man; **Pei**: Prince Edward Island; **Pag**: Puerto Aguirre; **Bal**: Balcobo; **Vig**: Ría de Vigo; **Aro**: Ría de Arousa; **Ebr**: Delta del Ebro; **Bed**: Bedford Basin; **Esq**: Esquimalt Lagoon; **Ola**: Öland Island; **Pnp**: Point No Point. N: número de individuos analizados. %L.P: Porcentaje de loci polimórficos. En **negrita** y sombreado aparecen los valores de frecuencia que han sido corregidos, tal y como ha sido descrito.

2.4 Análisis de la estructura genética poblacional

En primer lugar, para proporcionar una estimación relativa del grado de variación genética dentro de cada población, se calculó el **índice de diversidad de Shannon (Tabla 5)**.

Tabla 5 Estimadores de diversidad intrapoblacional para el mejillón *Mytilus*, empleando el índice de Shannon.

Locus	<i>M. edu</i>			<i>M. chi</i>	<i>M. gal</i>				<i>M. tro</i>			<i>M. cal</i>		
	Yer	Man	Pei	Pag	Bal	Vig	Aro	Ebr	Bed	Esq	Ola	Pnp	Media	Std
ABA-02-1500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.693	0.058	0.200
ABA-02-1050	0.679	0.639	0.000	0.685	0.679	0.445	0.367	0.605	0.687	0.296	0.328	0.547	0.496	0.215
ABA-02-850	0.000	0.688	0.337	0.477	0.455	0.000	0.000	0.000	0.666	0.692	0.521	0.000	0.320	0.300
ABA-02-675	0.517	0.000	0.583	0.477	0.455	0.296	0.000	0.427	0.687	0.692	0.000	0.477	0.384	0.255
ABA-02-580	0.666	0.673	0.337	0.691	0.000	0.000	0.000	0.000	0.689	0.692	0.627	0.577	0.413	0.320
ABA-05-975	0.000	0.673	0.000	0.000	0.000	0.676	0.000	0.678	0.000	0.000	0.373	0.000	0.200	0.306
ABA-05-780	0.303	0.592	0.000	0.477	0.487	0.376	0.436	0.623	0.000	0.394	0.328	0.693	0.392	0.218
ABA-05-525	0.487	0.691	0.337	0.000	0.517	0.337	0.549	0.686	0.455	0.477	0.664	0.650	0.488	0.197
ABA-05-465	0.545	0.000	0.477	0.645	0.687	0.693	0.690	0.513	0.652	0.692	0.000	0.000	0.466	0.290
ABA-05-390	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ABA-07-700	0.000	0.000	0.000	0.681	0.000	0.000	0.000	0.000	0.687	0.692	0.552	0.650	0.272	0.338
ABA-07-475	0.385	0.617	0.676	0.000	0.455	0.583	0.684	0.623	0.455	0.394	0.373	0.347	0.447	0.189
ABA-07-400	0.693	0.000	0.658	0.589	0.000	0.583	0.693	0.640	0.678	0.394	0.000	0.394	0.443	0.286
ABA-10-1400	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.678	0.693	0.373	0.000	0.145	0.274
ABA-10-700	0.000	0.000	0.000	0.681	0.693	0.583	0.573	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.211	0.313
ABA-10-580	0.678	0.534	0.681	0.000	0.345	0.506	0.684	0.584	0.303	0.259	0.226	0.681	0.457	0.226
ABA-10-500	0.635	0.658	0.337	0.000	0.679	0.671	0.663	0.691	0.545	0.000	0.414	0.000	0.441	0.288
ABA-10-400	0.652	0.383	0.000	0.000	0.679	0.693	0.615	0.691	0.000	0.259	0.521	0.681	0.431	0.292
AB9-06-850	0.000	0.691	0.624	0.681	0.689	0.693	0.663	0.671	0.000	0.000	0.000	0.690	0.450	0.333
AB9-06-700	0.480	0.691	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.679	0.000	0.000	0.689	0.212	0.317
AB9-06-500	0.000	0.000	0.559	0.000	0.570	0.534	0.367	0.457	0.000	0.363	0.373	0.000	0.269	0.247
AB9-06-300	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
AB9-07-1300	0.666	0.685	0.605	0.665	0.693	0.000	0.663	0.000	0.666	0.547	0.687	0.577	0.538	0.255
AB9-07-1000	0.421	0.337	0.337	0.518	0.689	0.676	0.615	0.000	0.000	0.000	0.000	0.668	0.355	0.289
AB9-07-550	0.421	0.464	0.337	0.381	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.453	0.000	0.171	0.214
AB9-07-500	0.345	0.425	0.251	0.589	0.594	0.376	0.436	0.322	0.345	0.000	0.414	0.000	0.341	0.188
AB9-07-400	0.258	0.685	0.000	0.381	0.687	0.671	0.690	0.394	0.455	0.000	0.453	0.000	0.389	0.274
AB9-07-325	0.421	0.617	0.658	0.665	0.000	0.376	0.329	0.486	0.615	0.547	0.664	0.000	0.448	0.239
AB9-12-900	0.455	0.337	0.681	0.326	0.000	0.688	0.674	0.000	0.345	0.219	0.488	0.650	0.405	0.248
AB9-12-750	0.000	0.000	0.000	0.691	0.615	0.689	0.573	0.686	0.666	0.501	0.453	0.477	0.446	0.281
AB9-12-520	0.635	0.688	0.337	0.589	0.421	0.534	0.523	0.513	0.517	0.451	0.627	0.681	0.543	0.107
AB9-12-350	0.615	0.000	0.000	0.681	0.678	0.693	0.675	0.655	0.687	0.451	0.678	0.605	0.521	0.267
Media	0.342	0.368	0.262	0.351	0.368	0.386	0.380	0.342	0.380	0.303	0.331	0.357	0.349	
Std	0.275	0.306	0.268	0.299	0.303	0.288	0.296	0.300	0.299	0.271	0.252	0.311		
N	29	25	30	21	29	30	31	32	29	36	26	24		

M. edu: *M. edulis*; *M. chi*: *M. chilensis*; *M. gal*: *M. galloprovincialis*; *M. tro*: *M. trossulus*; *M. cal*: *M. californianus*. **Yer**: Yerseke; **Man**: Isle of Man; **Pei**: Prince Edward Island; **Pag**: Puerto Aguirre; **Bal**: Balcobo; **Vig**: Ria de Vigo; **Aro**: Ria de Arousa; **Ebr**: Delta del Ebro; **Bed**: Bedford Basin; **Esq**: Esquimalt Lagoon; **Ola**: Öland Island; **Pnp**: Point No Point. **Media**: Valores medios de la diversidad genética. **Std**: Error estándar. **N**: número de individuos analizados.

Los estimadores de diversidad de Shannon confirmaron la existencia de un elevado grado de variación intrapoblacional. Así, dichos valores oscilaron entre 0.262 para la población de *M. edulis* de Prince Edward Island y 0.386 para la población de *M.*

galloprovincialis de la Ría de Vigo, que fue la más variable. En cuanto a los distintos *loci*, el más variable fue el AB9-12-520, con un valor de 0.543, y los menos variables, como era de esperar, fueron los *loci* diagnóstico para la población de *M. californianus* de Point No Point, el ABA-05-390 y el AB9-06-300, con un índice de 0. El valor promedio de variabilidad intrapoblacional fue de 0.349.

El cálculo de las **distancias genéticas** entre todas las poblaciones objeto de estudio se llevó a cabo mediante el estimador de Nei (1978), realizándose también una representación gráfica de su distribución. Como se observa en la **Tabla 6**, los valores obtenidos oscilaron entre 0.024 y 0.410, de modo que las poblaciones canadienses de *M. trossulus*, Esquimalt Lagoon y Bedford Basin, fueron las que mostraron el valor de distancia más bajo, mientras que las poblaciones más distantes genéticamente serían Point No Point (*M. californianus*) y Balcobo (*M. galloprovincialis*). En general, los valores de distancia más elevados tuvieron lugar entre *M. californianus* y el resto de poblaciones y, en segundo lugar entre la población de Puerto Aguirre (*M. chilensis*) y las demás. Por otra parte, los mejillones de las poblaciones gallegas de *M. galloprovincialis* mostraron entre sí una distancia genética ligeramente mayor que las poblaciones canadienses de *M. trossulus*, siendo dichos valores de 0.047 y 0.024 respectivamente, mientras que los índices promedio entre poblaciones de una misma especie fueron: 0.062 para *M. galloprovincialis*, 0.058 para *M. trossulus* y 0.109 para *M. edulis*.

Tabla 6 Distancia genética de Nei (1978) para *loci* generados mediante RAPDs en varias poblaciones de mejillón

	<i>M. edulis</i>			<i>M. chi</i>	<i>M. galloprovincialis</i>				<i>M. trossulus</i>		
	Yer	Man	Pei	Pag	Bal	Vig	Aro	Ebr	Bed	Esq	Ola
Man	0.122	-									
Pei	0.058	0.146	-								
Pag	0.195	0.292	0.188	-							
Bal	0.112	0.175	0.168	0.249	-						
Vig	0.102	0.159	0.162	0.217	0.063	-					
Aro	0.070	0.131	0.120	0.174	0.046	0.033	-				
Ebr	0.189	0.281	0.252	0.263	0.080	0.051	0.102	-			
Bed	0.087	0.116	0.134	0.304	0.203	0.133	0.150	0.227	-		
Esq	0.118	0.173	0.180	0.298	0.251	0.155	0.169	0.252	0.024	-	
Ola	0.122	0.107	0.188	0.318	0.194	0.165	0.177	0.255	0.074	0.075	-
Pnp	0.300	0.392	0.337	0.357	0.410	0.325	0.343	0.376	0.310	0.298	0.362

M. chi: *M. chilensis*; **Yer**: Yerseke; **Man**: Isle of Man; **Pei**: Prince Edward Island; **Pag**: Puerto Aguirre; **Bal**: Balcobo; **Vig**: Ría de Vigo; **Aro**: Ría de Arousa; **Ebr**: Delta del Ebro; **Bed**: Bedford Basin; **Esq**: Esquimalt Lagoon; **Ola**: Oland Island; **Pnp**: Point No Point.

Asimismo, al comparar las distancias genéticas entre especies, los valores obtenidos fueron del orden de 0.128 entre *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, 0.082 entre *M. galloprovincialis* y *M. edulis*, 0.067 entre *M. edulis* y *M. trossulus*, 0.194 entre *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*, 0.187 entre *M. chilensis* y *M. edulis*, y 0.284 entre *M. chilensis* y *M. trossulus*. Por otra parte, *M. californianus* presentó los índices de distancia más elevados: 0.315 con *M. galloprovincialis*, 0.271 con *M. edulis*, 0.357 con *M. chilensis* y 0.287 con *M. trossulus*. Como se muestra en el histograma (**Figura 13**), el valor promedio de distancia fue 0.192.

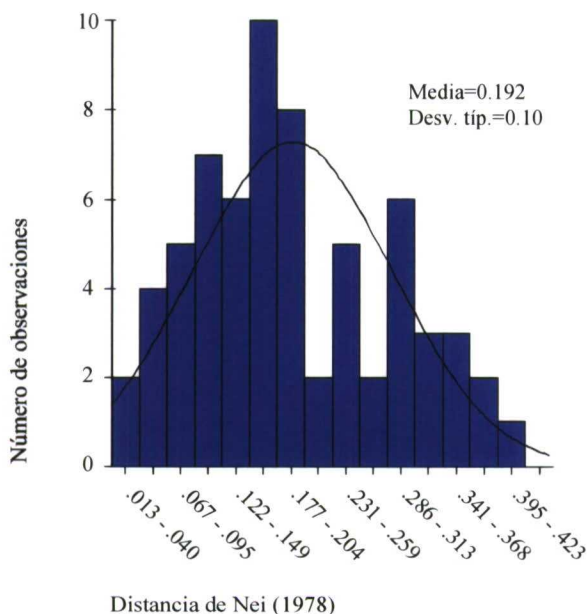


Figura 13. Distribución de los valores de distancia genética de Nei (1978) entre las 12 poblaciones de *Mytilus* utilizando 32 marcadores RAPDs. **Desv. Típ:** Desviación típica.

A continuación se llevó a cabo el cálculo de los **índices de fijación**, el F_{ST} , obtenido a partir de la heterozigosidad basada en estimadores de frecuencias alélicas (Weir & Cockerham, 1984), y el Φ_{ST} , calculado a partir de los componentes de la varianza de los datos haplotípicos (Cockerham, 1973), así como sus respectivos histogramas de frecuencia (**Figura 14**).

Así, en la **Tabla 7** se muestran los valores F_{ST} de Weir & Cockerham (1984). En este caso, las poblaciones más aisladas reproductivamente serían los mejillones de *M. edulis* de Prince Edward Island y los de *M. californianus* de Point No Point, con un

valor de 0.514, mientras que el índice más bajo, de 0.075, se obtuvo entre las poblaciones canadienses de *M. trossulus*.

Tabla 7 Valores F_{ST} de Weir & Cockerham (1984) obtenidos a partir de RAPDs en varias poblaciones de mejillón

	<i>M. edulis</i>			<i>M. chi</i>	<i>M. galloprovincialis</i>				<i>M. trossulus</i>		
	Yer	Man	Pei	Pag	Bal	Vig	Aro	Ebr	Bed	Esq	Ola
Man	0.263	-									
Pei	0.181	0.330	-								
Pag	0.360	0.426	0.391	-							
Bal	0.248	0.318	0.357	0.393	-						
Vig	0.227	0.293	0.343	0.357	0.148	-					
Aro	0.172	0.258	0.285	0.315	0.113	0.083	-				
Ebr	0.362	0.430	0.457	0.420	0.191	0.130	0.227	-			
Bed	0.201	0.235	0.304	0.426	0.340	0.255	0.278	0.377	-		
Esq	0.285	0.349	0.403	0.470	0.427	0.320	0.338	0.439	0.075	-	
Ola	0.279	0.240	0.401	0.464	0.355	0.315	0.331	0.426	0.176	0.206	-
Pnp	0.451	0.488	0.514	0.473	0.497	0.443	0.456	0.495	0.431	0.469	0.491

M. chi: *M. chilensis*; **Yer**: Yerseke; **Man**: Isle of Man; **Pei**: Prince Edward Island; **Pag**: Puerto Aguirre; **Bal**: Balcobo; **Vig**: Ria de Vigo; **Aro**: Ria de Arousa; **Ebr**: Delta del Ebro; **Bed**: Bedford Basin; **Esq**: Esquimalt Lagoon; **Ola**: Öland Island; **Pnp**: Point No Point.

En la **Tabla 8** aparecen reflejados los índices Φ_{ST} de Cockerham (1973). En este caso, las poblaciones más aisladas reproductivamente serían la de *M. edulis* de Isle of Man y la de *M. californianus* de Point No Point ($\Phi_{ST}=0.536$), mientras que las menos serían las poblaciones de las Rías gallegas de Vigo y Arousa ($\Phi_{ST}=0.026$).

Tabla 8 Valores Φ_{ST} de Cockerham (1973) obtenidos a partir de RAPDs en varias poblaciones de mejillón

	<i>M. edulis</i>			<i>M. chi</i>	<i>M. galloprovincialis</i>				<i>M. trossulus</i>		
	Yer	Man	Pei	Pag	Bal	Vig	Aro	Ebr	Bed	Esq	Ola
Man	0.203	-									
Pei	0.200	0.338	-								
Pag	0.316	0.363	0.352	-							
Bal	0.246	0.300	0.390	0.337	-						
Vig	0.213	0.286	0.327	0.293	0.077	-					
Aro	0.199	0.229	0.324	0.286	0.104	0.026	-				
Ebr	0.280	0.389	0.425	0.321	0.119	0.103	0.147	-			
Bed	0.281	0.306	0.341	0.400	0.381	0.337	0.352	0.418	-		
Esq	0.369	0.383	0.424	0.418	0.450	0.388	0.414	0.460	0.076	-	
Ola	0.209	0.224	0.332	0.345	0.296	0.267	0.279	0.335	0.126	0.142	-
Pnp	0.442	0.536	0.513	0.463	0.514	0.461	0.486	0.474	0.497	0.501	0.449

M. chi: *M. chilensis*; **Yer**: Yerseke; **Man**: Isle of Man; **Pei**: Prince Edward Island; **Pag**: Puerto Aguirre; **Bal**: Balcobo; **Vig**: Ria de Vigo; **Aro**: Ria de Arousa; **Ebr**: Delta del Ebro; **Bed**: Bedford Basin; **Esq**: Esquimalt Lagoon; **Ola**: Öland Island; **Pnp**: Point No Point.

La principal diferencia observada entre los dos índices es que las poblaciones menos aisladas reproductivamente entre sí serían las pertenecientes a *M. edulis* y *M. trossulus* según el estimador de Weir & Cockerham (1984), con un valor de 0.149, mientras que, mediante el índice Φ_{ST} de Cockerham (1973), serían las correspondientes

a *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, con un valor de 0.200, por 0.217 entre las de *M. edulis* y *M. trossulus*. Sin embargo, en ambos casos apareció Point No Point (*M. californianus*) como la población más aislada reproductivamente. Como se observa en la **Figura 14** las distribuciones son similares y los valores promedio resultaron ser de 0.333 y 0.322 para F_{ST} y Φ_{ST} respectivamente.

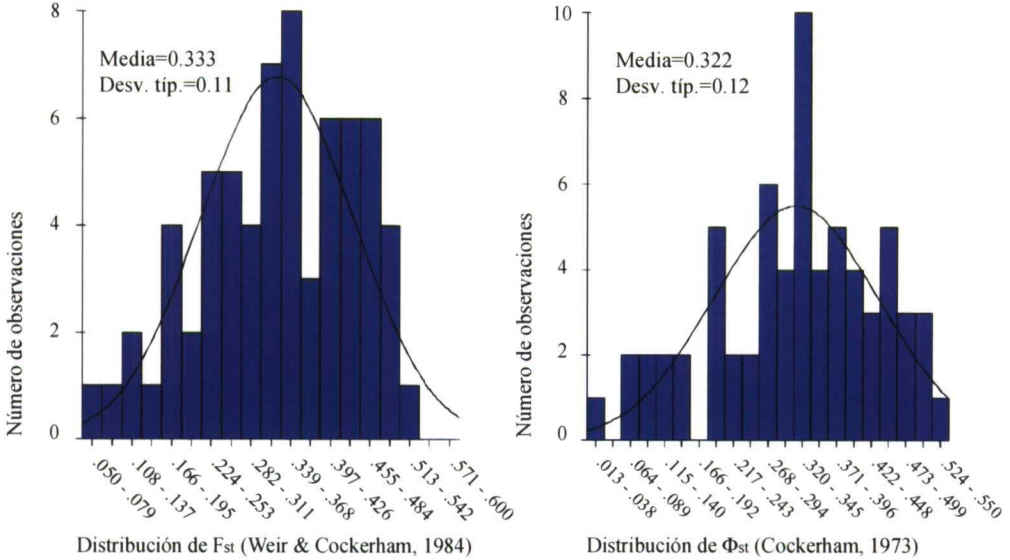


Figura 14. Distribución de los valores de F_{ST} y Φ_{ST} para las 12 poblaciones de *Mytilus* utilizando 32 marcadores RAPDs. **Desv. Típ:** Desviación típica.

La estimación del **número efectivo de migrantes por generación, N_m** (Wright, 1951), entre poblaciones de mejillón del Atlántico Norte, como medida del flujo genético, fue realizada siguiendo el modelo de migración de Isla (Wright, 1931), a partir de los valores de F_{ST} . Dicho modelo se basa en una gran población dividida en muchas subpoblaciones dispersas geográficamente como islas en un archipiélago. Asimismo, se asume que cada subpoblación es lo suficientemente grande como para que los cambios aleatorios en las frecuencias alélicas sean imperceptibles, y se considera que ha ocurrido migración cuando las frecuencias alélicas de los migrantes son iguales a los valores medios de toda la población. Así, se han calculado los estimadores de flujo según las siguientes agrupaciones: entre poblaciones atlánticas orientales (Yerseke e Isle of Man - *M. edulis*-; Balcobo, Ría de Arousa, Ría de Vigo y Delta del Ebro -*M. galloprovincialis*- y Öland Island -*M. trossulus*-) y occidentales (Prince Edward Island -*M. edulis*- y Bedford Basin -*M. trossulus*-), el valor de N_m fue de 7.0 ($F_{ST}=0.035$); entre *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus* del Atlántico Norte, fue de 1.8

($F_{ST}=0.120$), entre las poblaciones gallegas (Balcobo, Ría de Vigo y Ría de Arousa) y la población del Delta del Ebro, el resultado de Nm fue de 4.2 ($F_{ST}=0.056$), entre las poblaciones europeas de *M. edulis* (Yerseke e Isle of Man) y las poblaciones gallegas de *M. galloprovincialis*, el estimador de flujo genético Nm resultó ser de 3.0 ($F_{ST}=0.077$) y entre las poblaciones europeas de *M. edulis* y la población de *M. trossulus* de Öland Island el resultado de Nm fue de 2.5 ($F_{ST}=0.091$).

La construcción de los árboles **filogenéticos UPGMA y Neighbor-Joining** se llevó a cabo a partir de las tres matrices anteriores (Nei, 1978; F_{ST} de Weir & Cockerham, 1984 y Φ_{ST} de Cockerham, 1973) mediante el programa informático de análisis filogenético PHYLIP. En los dos primeros casos, las topologías UPGMA y Neighbor-Joining de ambos estimadores resultaron idénticas. En el tercer caso, la topología resultante mostró algunas diferencias. Para comprobar la fiabilidad de cada árbol se realizó un remuestreo por el método *bootstrap*, consistente en 1000 réplicas en los dos primeros casos y 100 en el tercero.

En la **Figura 15** se muestra el árbol filogenético generado por el método UPGMA, en el cual se observa que las poblaciones pertenecientes a la especie *M. galloprovincialis* se agruparon en un *cluster*, apareciendo como más próximas las poblaciones de las dos rías gallegas; en otro *cluster* se agruparon, por un lado las poblaciones de Yerseke y Prince Edward Island, pertenecientes a la especie *M. edulis* y, por otro, todas las poblaciones de *M. trossulus* y la de Isle of Man. Las poblaciones de Puerto Aguirre y Point No Point aparecieron más lejanas en otro *cluster*.

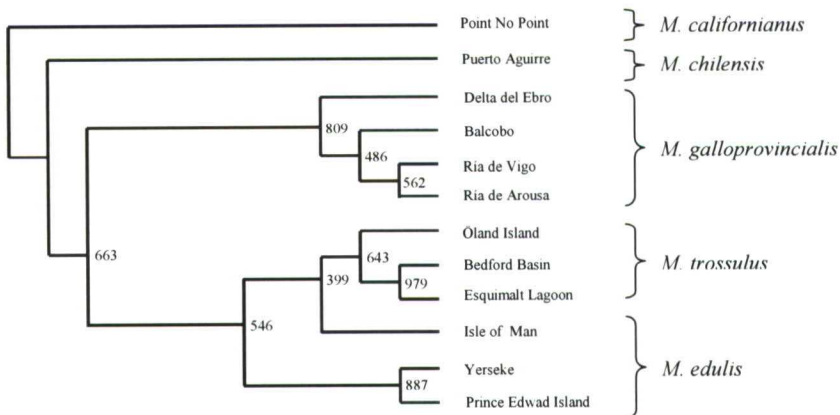


Figura 15. Árbol UPGMA (idéntico al de Neighbor-Joining) realizado a partir de una matriz de distancias de Nei (1978), obtenida mediante los *loci* RAPDs seleccionados. Este árbol presenta idéntica topología que los generados (UPGMA y Neighbor Joining) a partir de los valores de F_{ST} . Los valores de *bootstrap*, sobre 1000 réplicas, se reflejan en los nodos.

Por otra parte, en la **Figura 16** se observa el árbol UPGMA generado a partir de los valores de Φ_{ST} de Cockerham (1973). En él se pudo observar como las poblaciones de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* se agruparon en un mismo *cluster*, mientras que la población de Puerto Aguirre apareció más próxima a las poblaciones de *M. galloprovincialis* y *M. edulis*. Las tres poblaciones de *M. trossulus* aparecieron conjuntamente en un *cluster* distinto, mientras que la población de *M. californianus* de Point No Point resultó la más divergente.

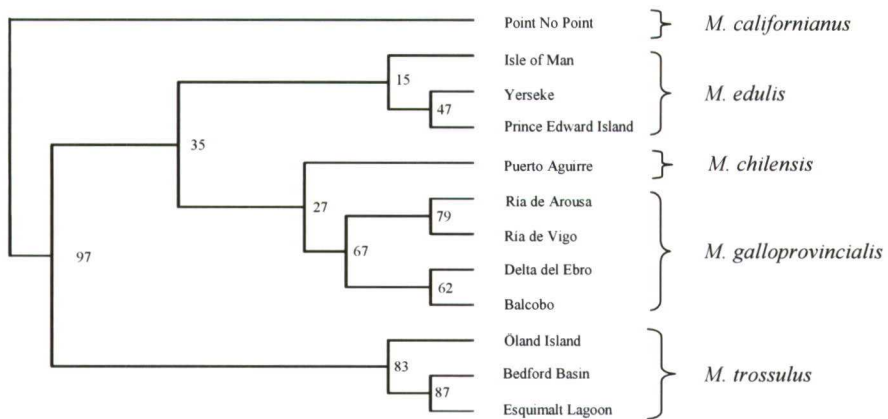


Figura 16. Árbol UPGMA realizado a partir de los valores de Φ_{ST} de Cockerham (1973), obtenida mediante los *loci* RAPDs seleccionados. Los valores de *bootstrap*, sobre 100 réplicas, se reflejan en los nodos.

En la **Figura 17** se puede observar el árbol Neighbor-Joining generado a partir de los valores de Φ_{ST} de Cockerham (1973). A diferencia de la topología anterior, los mejillones de la población de Isle of Man vuelve a agruparse en el mismo *cluster* que las poblaciones de *M. trossulus*, mientras que vuelven a agruparse, en un mismo *cluster*, las poblaciones de *M. galloprovincialis* y *M. edulis*. Por su parte, la población de Puerto Aguirre, aparece más lejana en un *cluster* aparte y la población de *M. californianus* de Point No Point se manifiesta de nuevo como la más divergente.

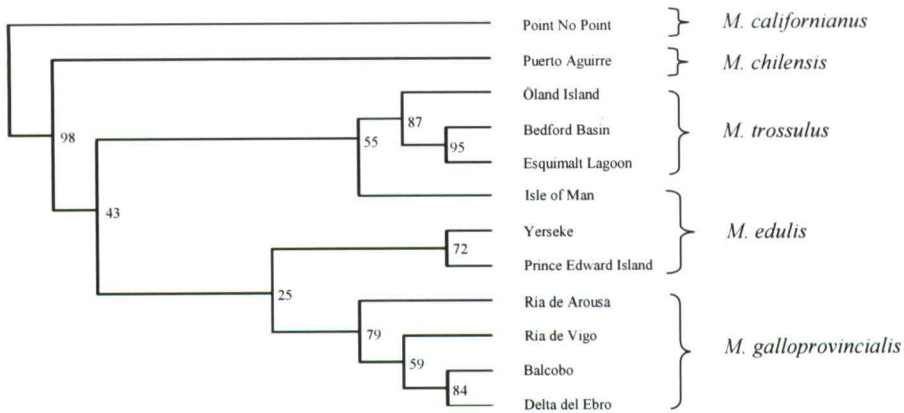


Figura 17. Árbol Neighbor-Joining realizado a partir de los valores de Φ_{ST} de Cockerham (1973), obtenida mediante los *loci* RAPDs seleccionados. Los valores de *bootstrap*, sobre 100 réplicas, se reflejan en los nodos.

Como queda de manifiesto en el presente trabajo, una de las mayores ventajas que presenta la técnica de RAPDs es la aplicación de programas para el tratamiento estadístico de los datos (Huff *et al.*, 1993; Stewart & Excoffier, 1996), capaces de inferir la estructura genética poblacional a partir de dichos marcadores RAPDs. Así, en el presente estudio también se abordaron: (i) el análisis de la varianza molecular o AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992), (ii) el análisis de componentes principales (PCA) (Esbesen *et al.*, 1994) y (iii) el Test de Mantel (Sokal & Rohlf, 1995).

Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

Se realiza para analizar una estructura genética definida *a priori*. En sí, produce estimadores de los componentes de la varianza y análogos de los estadísticos F (Φ), reflejando la correlación de la diversidad haplotípica a diferentes niveles de subdivisión jerárquica (Excoffier *et al.*, 1992). Por ello, en este trabajo se han realizado diferentes agrupaciones, tanto taxonómicas como geográficas, para analizar la variación genética.

La primera agrupación consistió en considerar cinco grupos, correspondientes a las 5 especies, constituídos por cada una de sus poblaciones. Así, el primer grupo sería *M. galloprovincialis*, con las poblaciones de Balcobo, Ría de Arousa, Ría de Vigo y Delta del Ebro; un segundo grupo sería *M. edulis*, incluyendo a las poblaciones de Yerseke, Isle of Man y Prince Edward Island; el tercer grupo fue *M. trossulus*, con

Öland Island, Esquimalt Lagoon y Bedford Basin, el cuarto sería *M. chilensis*, con la población de Puerto Aguirre; y el quinto grupo fue *M. californianus*, con la población de Point No Point. Como se observa en la **Tabla 9**, la mayor fuente de variación se dio entre individuos, con un 62.74%; por el contrario, la variación entre grupos (especies) fue de un 26.32%, con un valor de $P < 0.001$ en ambos casos. La variación total entre todas las poblaciones fue de 34.11% ($\Phi_{ST} = 0.341$, $P < 0.001$), disminuyendo hasta 30.82% ($\Phi_{ST} = 0.308$, $P < 0.001$) al excluir a *M. californianus* (no reflejados en la tabla).

Tabla 9 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para individuos pertenecientes a las diferentes poblaciones de mejillón, agrupadas en cinco especies

Fuente de variación	g.l.	Componente de variación	% total de variación	Estadístico Φ	<i>P</i>
Entre grupos	4	1.823	26.32	Φ_{CT} 0.263	<0.001
Entre poblaciones dentro de los grupos	7	0.758	10.95	Φ_{SC} 0.149	<0.001
Dentro de las poblaciones	330	4.344	62.74	Φ_{ST} 0.373	<0.001

g.l.: grados de libertad; *P*: probabilidad de encontrar, al azar, un componente más extremo de variación. Los valores de significación están basados en una distribución nula de 1000 permutaciones.

La siguiente agrupación consistió en considerar cuatro grupos en lugar de cinco como en el caso anterior. La única diferencia consistió en considerar la población de Puerto Aguirre como *M. edulis* o *M. galloprovincialis*. En la **Tabla 10** se observan unos resultados muy similares para ambas agrupaciones: la variación entre grupos disminuyó hasta un 23.19% y 23.06%, mientras que la variación interindividual se mantuvo en un 62.42% y 62.21%. Aumentando, por lo tanto, la variación entre poblaciones dentro de las especies hasta un 14.39% y 14.73% respectivamente. En todos los casos, $P < 0.001$.

Tabla 10 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para individuos pertenecientes a las diferentes poblaciones de mejillón, considerando la población chilena como *M. edulis* o *M. galloprovincialis*

Fuente de variación	g.l.	Componente de variación	% total de variación	Estadístico Φ	<i>P</i>
<i>M. chilensis</i> como <i>M. edulis</i>					
Entre grupos	3	1.614	23.19	Φ_{CT} 0.232	<0.001
Entre poblaciones dentro de los grupos	8	1.002	14.39	Φ_{SC} 0.187	<0.001
Dentro de las poblaciones	330	4.344	62.42	Φ_{ST} 0.376	<0.001
<i>M. chilensis</i> como <i>M. galloprovincialis</i>					
Entre grupos	3	1.610	23.06	Φ_{CT} 0.231	<0.001
Entre poblaciones dentro de los grupos	8	1.029	14.73	Φ_{SC} 0.191	<0.001
Dentro de las poblaciones	330	4.344	62.21	Φ_{ST} 0.378	<0.001

g.l.: grados de libertad; *P*: probabilidad de encontrar, al azar, un componente más extremo de variación. Los valores de significación están basados en una distribución nula de 1000 permutaciones.

Debido a lo obtenido en los dos análisis anteriores, se llevó a cabo un tercero consistente en realizar dos grupos, por un lado *M. edulis* o *M. galloprovincialis*, incluyendo a todas sus poblaciones, y por otro *M. chilensis*. Los resultados (**Tabla 11**) indican que la variación debida a la diferencia entre estos dos grupos (*M. edulis* y *M. chilensis*) fue de 15.93%, entre poblaciones dentro de los grupos fue de 19.84% y la variación entre individuos fue la más elevada, con un 64.22%. En este caso, la variación total entre las cuatro poblaciones analizadas fue de 29.35% ($\Phi_{ST}=0.294$, $P<0.001$), mientras que para las tres poblaciones de *M. edulis* fue de 24.11% ($\Phi_{ST}=0.241$, $P<0.001$) (no reflejados en la tabla). En la misma tabla se puede observar como al comparar la población de Puerto Aguirre con las cuatro de *M. galloprovincialis*, aumentó la variación entre los grupos hasta un 29.24%. Para ambas agrupaciones, el valor de significación fue de $P<0.001$.

Tabla 11 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para individuos pertenecientes a poblaciones de *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. chilensis*

Fuente de variación	g.l.	Componente de variación	% total de variación	Estadístico Φ	P
Entre <i>M. edulis</i> y <i>M. chilensis</i>					
Entre grupos	1	1.026	15.93	Φ_{CT} 0.159	<0.001
Entre poblaciones dentro de los grupos	2	1.279	19.84	Φ_{SC} 0.236	<0.001
Dentro de las poblaciones	101	4.139	64.22	Φ_{ST} 0.358	<0.001
Entre <i>M. galloprovincialis</i> y <i>M. chilensis</i>					
Entre grupos	1	2.065	29.24	Φ_{CT} 0.292	<0.001
Entre poblaciones dentro de los grupos	3	0.536	7.59	Φ_{SC} 0.107	<0.001
Dentro de las poblaciones	138	4.462	63.17	Φ_{ST} 0.368	<0.001

g.l.: grados de libertad; P: probabilidad de encontrar, al azar, un componente más extremo de variación. Los valores de significación están basados en una distribución nula de 1000 permutaciones.

Debido a la ambigua posición de la población de Isle of Man, se llevaron a cabo dos análisis. En el primero se formaron cuatro grupos: *M. galloprovincialis* con sus cuatro poblaciones, *M. edulis* incluyendo a las poblaciones de Yerseke y Prince Edward Island, un tercer grupo fue la población de Isle of Man y por último, *M. trossulus* con sus tres poblaciones. En la segunda agrupación, la única diferencia con la anterior fue considerar a la población de Isle of Man como parte del grupo de *M. edulis*. Los resultados obtenidos (**Tabla 12**) mostraron como, en el primer caso, la variación entre grupos fue de un 23.60% y entre poblaciones dentro de los grupos fue de tan sólo un 9.28%. En la segunda estructura analizada, la diferencia observada fue una disminución

de la varianza entre grupos hasta un 21.56% y un aumento de la varianza entre poblaciones dentro de los grupos hasta un 11.68%. En ambas agrupaciones $P < 0.001$.

Tabla 12 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para individuos pertenecientes a las diferentes poblaciones de mejillón, considerando la posición ambigua de la población de Isle of Man

Fuente de variación	g.l.	Componente de variación	% total de variación	Estadístico Φ	<i>P</i>
Isle of Man aparte					
Entre grupos	3	1.525	23.60	Φ_{CT} 0.236	<0.001
Entre poblaciones dentro de los grupos	6	0.599	9.28	Φ_{SC} 0.121	<0.001
Dentro de las poblaciones	200	4.334	67.12	Φ_{ST} 0.329	<0.001
Isle of Man como <i>M. edulis</i>					
Entre grupos	2	1.399	21.56	Φ_{CT} 0.216	<0.001
Entre poblaciones dentro de los grupos	7	0.758	11.68	Φ_{SC} 0.149	<0.001
Dentro de las poblaciones	200	4.334	66.76	Φ_{ST} 0.332	<0.001

g.l.: grados de libertad; *P*: probabilidad de encontrar, al azar, un componente más extremo de variación. Los valores de significación están basados en una distribución nula de 1000 permutaciones.

A continuación se analizó la estructura genética a nivel de las poblaciones de *M. galloprovincialis* comparando, por un lado, la varianza entre las cuatro poblaciones y, por otro, entre las poblaciones gallegas y la del Delta del Ebro. En la **Tabla 13** se muestran los resultados, en los cuales se observa como la variación entre las cuatro poblaciones de *M. galloprovincialis* fue de 10.54%, y entre las poblaciones gallegas esta variación disminuyó hasta un 8.68%. En ambos casos, la mayor parte de la variación fue atribuida a los individuos, con un 89.46% y un 88.05% respectivamente. El índice para las tres poblaciones gallegas fue de $\Phi_{ST} = 0.050$ ($P < 0.001$) (no reflejado en la tabla).

Tabla 13 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para individuos pertenecientes a las diferentes poblaciones de *M. galloprovincialis*

Fuente de variación	g.l.	Componente de variación	% total de variación	Estadístico Φ	<i>P</i>
Entre poblaciones de <i>M. galloprovincialis</i>					
Entre poblaciones	3	0.517	10.54	Φ_{ST} 0.105	<0.001
Dentro de las poblaciones	118	4.386	89.46		
Gallegas vs Delta del Ebro					
Entre grupos	1	0.163	3.27	Φ_{CT} 0.033	<0.001
Entre poblaciones dentro de los grupos	2	0.433	8.68	Φ_{SC} 0.090	<0.001
Dentro de las poblaciones	118	4.386	88.05	Φ_{ST} 0.119	<0.001

g.l.: grados de libertad; *P*: probabilidad de encontrar, al azar, un componente más extremo de variación. Los valores de significación están basados en una distribución nula de 1000 permutaciones.

El análisis de la estructura de las poblaciones de *M. trossulus*, reveló un componente de variación entre las tres poblaciones de 13.95% ($\Phi_{ST}=0.140$), superior al de las poblaciones de *M. galloprovincialis* (10.54%, $\Phi_{ST}=0.105$), pero inferior al de las poblaciones de *M. edulis* (24.11%, $\Phi_{ST}=0.241$). Asimismo, la variación entre individuos fue de 86.05%, con un valor de significación en todos los casos de $P<0.001$.

Finalmente, se analizó la variabilidad de otras tres estructuras genéticas diferentes: entre las poblaciones europeas de *M. edulis* (Yerseke e Isle of Man) y la población europea de *M. trossulus* (Öland Island), entre las poblaciones gallegas de *M. galloprovincialis* (Balcobo, Ría de Arousa y Ría de Vigo) y las poblaciones europeas de *M. edulis*, y entre las poblaciones atlánticas orientales (Yerseke e Isle of Man -*M. edulis*-; Balcobo, Ría de Arousa, Ría de Vigo y Delta del Ebro -*M. galloprovincialis*- y Öland Island -*M. trossulus*-) y occidentales (Prince Edward Island -*M. edulis*- y Bedford Basin -*M. trossulus*-). El mayor componente de variación (**Tabla 14**) ocurrió entre individuos dentro de las poblaciones, con unos valores de 77.39%, 72.98% y 69.74% ($P<0.001$ en todos los casos) respectivamente. El componente de variación entre grupos fue de 3.18% ($P<0.321$) para el primer caso, 16.15% ($P<0.001$) para el segundo y 7.73% ($P<0.050$) para el tercero. Por otra parte, la varianza entre todas las poblaciones atlánticas fue de 26.87% ($\Phi_{ST}=0.271$, $P<0.001$) (no reflejado en la tabla).

Tabla 14 Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para individuos pertenecientes a las diferentes poblaciones atlánticas de mejillón

Fuente de variación	g.l.	Componente de variación	% total de variación	Estadístico Φ	P
<i>M. edulis</i> europeas vs <i>M. trossulus</i> sueca					
Entre grupos	1	0.191	3.18	Φ_{CT} 0.032	<0.321
Entre poblaciones dentro de los grupos	1	1.170	19.44	Φ_{SC} 0.201	<0.001
Dentro de las poblaciones	77	4.657	77.39	Φ_{ST} 0.226	<0.001
Poblaciones gallegas vs <i>M. edulis</i> europeas					
Entre grupos	1	0.998	16.15	Φ_{CT} 0.162	<0.001
Entre poblaciones dentro de los grupos	3	0.671	10.87	Φ_{SC} 0.130	<0.001
Dentro de las poblaciones	139	4.509	72.98	Φ_{ST} 0.270	<0.001
Atlánticas orientales vs occidentales					
Entre grupos	1	0.485	7.73	Φ_{CT} 0.077	<0.050
Entre poblaciones dentro de los grupos	7	1.412	22.52	Φ_{SC} 0.244	<0.001
Dentro de las poblaciones	260	4.373	69.74	Φ_{ST} 0.303	<0.001

g.l.: grados de libertad; P : probabilidad de encontrar, al azar, un componente más extremo de variación. Los valores de significación están basados en una distribución nula de 1000 permutaciones.

Análisis de componentes principales (PCA)

Es un método de obtención del factor principal, el más influyente, que explique la mayor parte de la varianza de las variables. Una vez obtenido este factor principal, se le resta a las distintas variables y, sobre la variabilidad restante, se elige la segunda componente principal con el mismo criterio, y así sucesivamente. A diferencia del AMOVA, no se parte de una estructura genética definida *a priori*.

En el presente estudio se realizó un análisis inicial con los 342 individuos de las 12 poblaciones de mejillón. Los cinco primeros factores principales explicaron un 50.6% de las variaciones entre las muestras. Así, en la **Figura 18** se pueden observar dos grupos claramente separados por los componentes 1 y 2: la población de Point No Point de *M. californianus* y, por otro lado, el resto de poblaciones de *Mytilus*. Ambos componentes principales explicaron un 23.8% y un 10.2% de la variación total respectivamente.

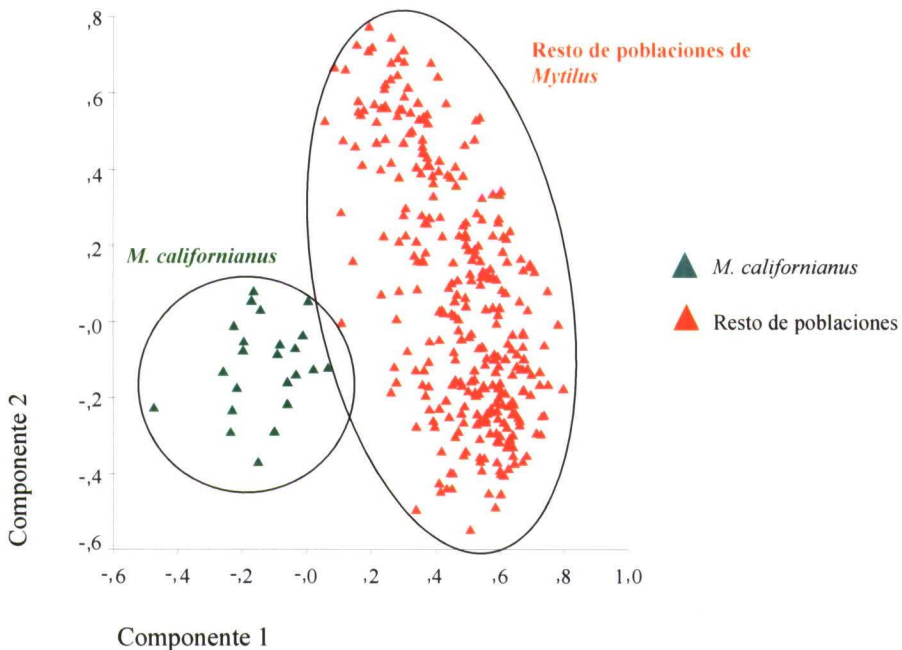


Figura 18. Análisis de componentes principales de los 342 individuos pertenecientes a las 12 poblaciones de *Mytilus* utilizando 32 marcadores RAPDs.

A partir de la gráfica anterior, se intentó caracterizar la información contenida en la nube de puntos correspondiente al resto de poblaciones de *Mytilus*. Así en la **Figura 19**, en la cual se muestra el análisis de los 318 individuos restantes, se pudo observar cómo los componentes 1 y 2, los cuales explicaron el 25.4% y el 10.8% de la variabilidad total respectivamente, dividieron la muestra en tres grupos (*M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*). Además, en la misma gráfica se puede comprobar como la población de Isle of Man apareció parcialmente dispersa entre el grupo de *M. edulis* y el de *M. trossulus*, y la población de Puerto Aguirre (*M. chilensis*) no se diferenció con claridad de los grupos de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. En este caso, los cinco primeros componentes principales explicaron el 52.2% de la variabilidad total.

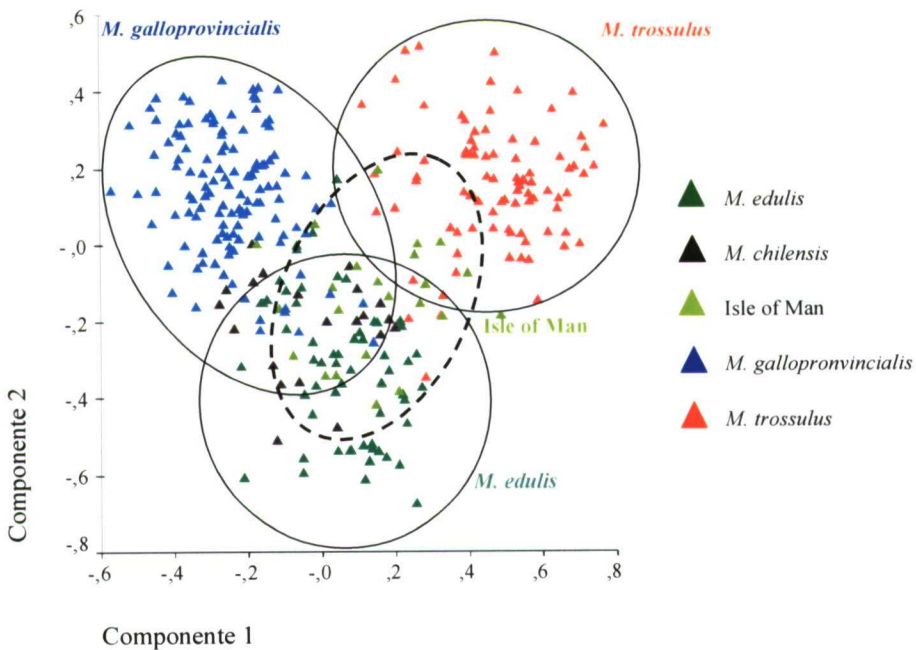


Figura 19. Análisis de componentes principales de 318 individuos pertenecientes a 11 poblaciones de *Mytilus*, excluyendo a la población de Point No Point (*M. californianus*), utilizando 32 marcadores RAPDs. La elipse discontinua engloba a los individuos de Isle of Man.

A continuación, se trató de aclarar la situación de la población de Puerto Aguirre y de Isle of Man. Como se observa en la **Figura 20a**, los componentes 1 y 2, que explicaron un 34% y un 9.6% de la variabilidad total respectivamente, separaron claramente la población de Puerto Aguirre del resto de poblaciones de *M. edulis*. En este caso, los cinco primeros componentes explicaron un 61.7% de la variación total.

Por su parte, en la **Figura 20b** se pudo apreciar como la población de Isle of Man apareció parcialmente dispersa entre los grupos de *M. trossulus* y *M. edulis*, gracias a la separación mediante el componente 1, que explicó un 27.6% de la variabilidad, y el componente 2, que explicó un 12.8%. En esta clasificación, los cinco primeros componentes explicaron un 55.8% de la variación total.

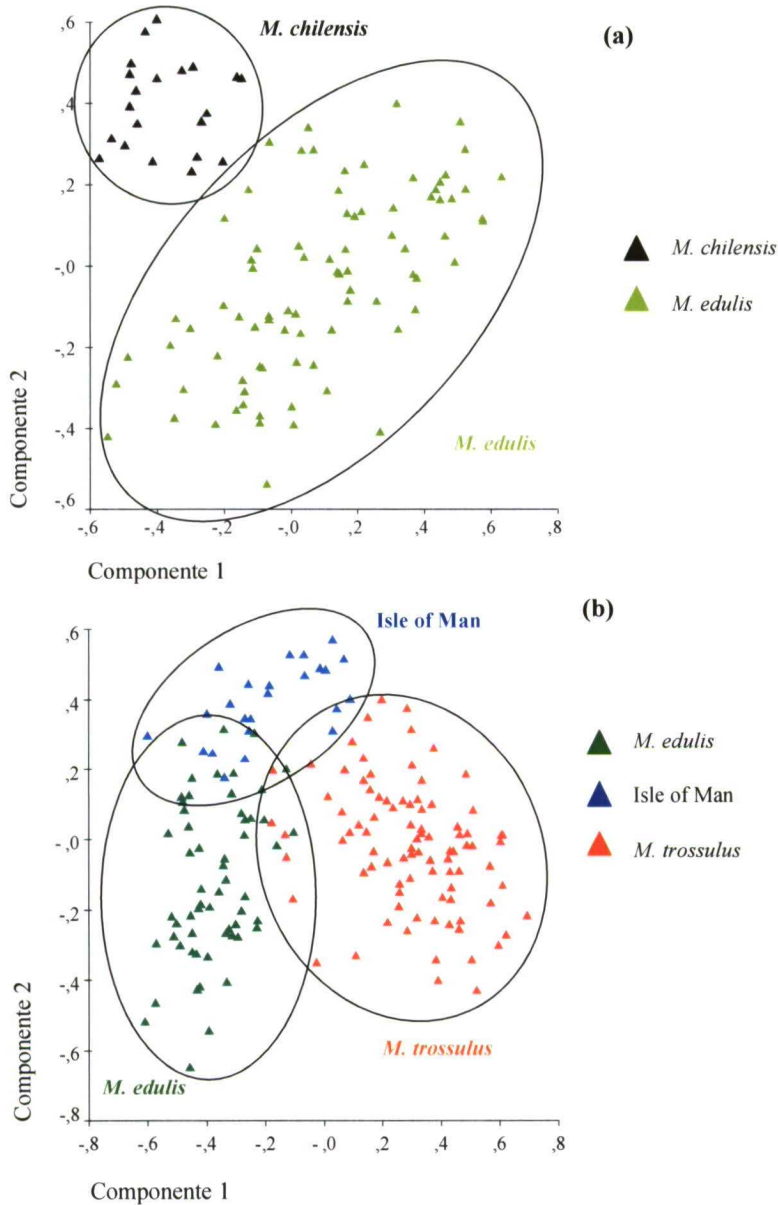


Figura 20. Análisis de componentes principales de a) 105 individuos pertenecientes a las poblaciones de *M. edulis* y la población de *M. chilensis* de Puerto Aguirre y de b) 175 individuos pertenecientes a las poblaciones de *M. edulis* y *M. trossulus*, utilizando 32 marcadores RAPDs.

Los análisis de componentes principales para las cuatro poblaciones de *M. galloprovincialis* y las tres de *M. trossulus* no revelaron ninguna agrupación clara, apareciendo todas las poblaciones de manera más bien dispersa. En el caso de las poblaciones de *M. galloprovincialis* el primer factor explicó un 42.3% de la variación total, por un 6.1% el segundo, mientras que para las poblaciones de *M. trossulus*, el primer factor explicó un 37.1% y el segundo un 7.4% de la variación total.

Además, se realizó el análisis de componentes principales a partir de los valores de frecuencias alélicas. En este caso, los cinco primeros componentes explicaron el 87% de la varianza total. La representación espacial de las frecuencias (**Figura 21**), en la que los componentes 1 y 2 explicaron un 47.8% y un 16.1% del total de la variabilidad respectivamente, reveló la existencia de dos grupos: por un lado el correspondiente a las formas del complejo “*M. edulis*” y, por otro, la especie *M. californianus* de Point No Point. A su vez, las formas del “complejo *M. edulis*” aparecieron agrupadas por poblaciones correspondientes a cada una de las tres formas, salvo en el caso de la población de *M. chilensis*, ligeramente desplazada hacia la izquierda en el eje X, e intermedia entre las poblaciones de *M. galloprovincialis* y *M. edulis*, y la población de *M. edulis* de Isle of Man, en posición intermedia entre las de *M. edulis* y *M. trossulus*.

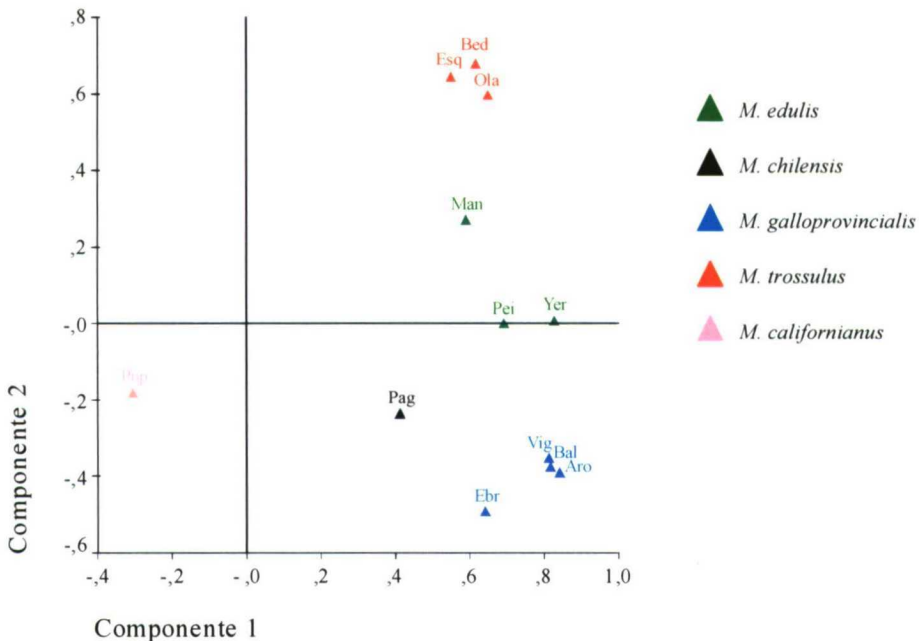


Figura 21. Análisis de componentes principales basado en los valores de frecuencias alélicas, a partir de 32 marcadores RAPDs.

Análisis de correlación –Test de Mantel-

El Test de Mantel (Sokal & Rohlf, 1985) es un análisis estadístico de correlación. En el presente trabajo se han analizado dos posibles correlaciones: una a nivel de las matrices de distancia genética y geográfica entre poblaciones de mejillón del océano Atlántico, y otra entre las matrices correspondientes a los dos índices de fijación utilizados en este estudio, el F_{ST} de Weir & Cockerham (1984) y el Φ_{ST} de Cockerham (1973).

La matriz de distancias genéticas utilizada fue la de Nei (1978), según se refleja en el apartado 2.4, y las distancias geográficas (**Tabla 15**) fueron calculadas, de manera aproximada, mediante una herramienta de medición incluida en un paquete informático.

Tabla 15 Valores aproximados de distancia geográfica (Km) entre varias poblaciones de mejillón del Atlántico Norte.

	Yer	Man	Pei	Bal	Vig	Aro	Ebr	Bed
Man	1346	-						
Pei	5000	4300	-					
Bal	1365	1200	4300	-				
Vig	1565	1400	4380	200	-			
Aro	1544	1379	4360	179	55	-		
Ebr	3445	3280	5810	2080	1880	1935	-	
Bed	5820	4336	480	4200	4250	4240	5800	-
Ola	1570	2675	6500	2800	3000	2979	4880	6600

Yer: Yerseke; **Man:** Isle of Man; **Pei:** Prince Edward Island; **Bal:** Balcobo; **Vig:** Ria de Vigo; **Aro:** Ria de Arousa; **Ebr:** Delta del Ebro; **Bed:** Bedford Basin; **Ola:** Óland Island.

Para evaluar la correlación entre las distancias genéticas y geográficas se establecieron dos grupos, por un lado, todas las poblaciones atlánticas y, por otro, solamente las poblaciones atlánticas europeas. Para el primer caso, se obtuvo un valor de correlación $r = 0.43$ ($p < 0.021$), mientras que para las poblaciones europeas, el valor de correlación fue de $r = 0.78$ ($p < 0.004$). En ambos casos, se utilizaron 1000 permutaciones para apreciar la significación del test.

En cuanto al análisis de correlación correspondiente a las matrices de los dos índices de fijación, se obtuvo un valor de $r = 0.91$ ($p < 0.001$), utilizando, al igual que en los casos anteriores, 1000 permutaciones para evaluar la significación del test.

3. ANÁLISIS PRELIMINAR DE LA HEREDABILIDAD DE LOS RAPDs

Tras realizar cruzamientos entre cuatro individuos macho y seis individuos hembra de la población de *M. galloprovincialis* de Balcobo, e inducir posteriormente el desove, se llevaron a cabo ampliificaciones, con los siete *primers* seleccionados, en larvas de cada uno de los cruces para comprobar la existencia de un patrón de herencia mendeliano en los marcadores RAPDs. Para ello, se comprobó si en el patrón de bandas de la descendencia había algún fragmento que no estuviese presente en el patrón de los progenitores, los cuales también habían sido amplificados previamente con los mismos *primers* (**Figuras 22 y 23**). Asimismo, se pudo comprobar la existencia de un posible candidato a marcador sexo-específico, el *locus* ABA-05-780, puesto que sólo lo amplificaron los individuos macho de esta población de Balcobo.

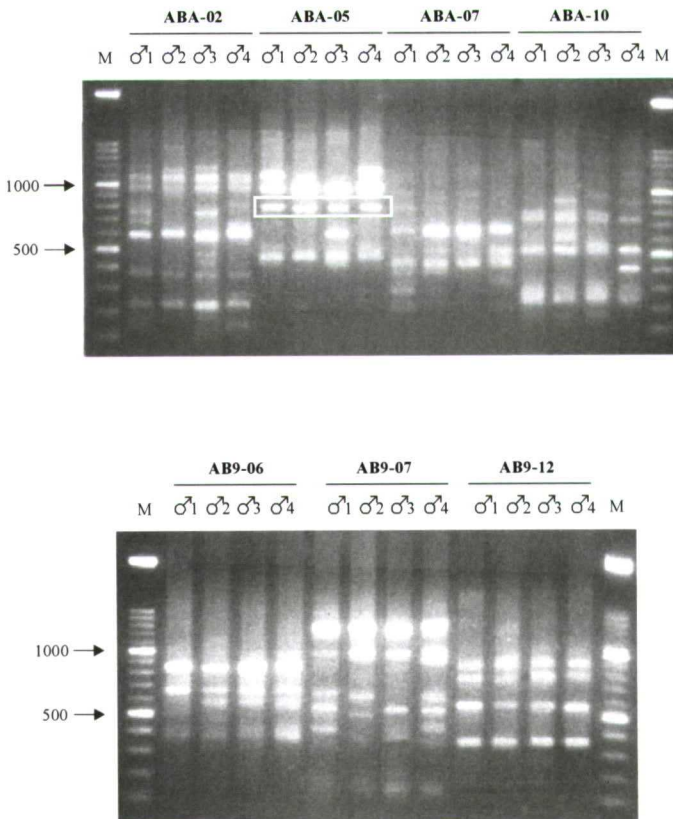


Figura 22. Amplificación, mediante los siete *primers* seleccionados, de cuatro individuos macho pertenecientes a la población de Balcobo. En el recuadro aparece el posible *locus* sexo-específico de 780 pb. **M:** Marcador de 100pb.

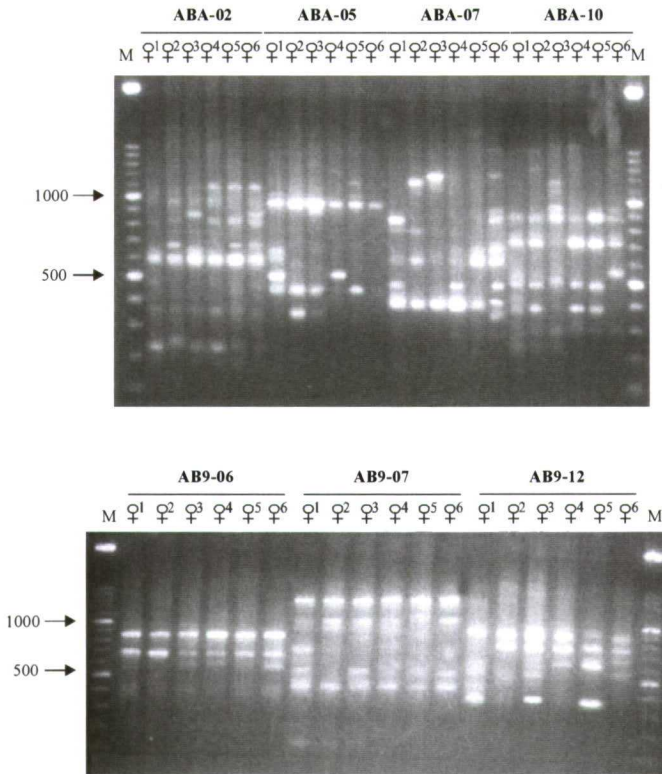


Figura 23. Amplificación, mediante los siete *primers* seleccionados, de seis individuos hembra pertenecientes a la población de Balcobo. Notar que no aparece el fragmento de 780 pb que sí amplificó en machos con el *primer* ABA-05. **M:** Marcador de 100pb.

Como resultado de todas las amplificaciones llevadas a cabo en cada una de las larvas (12 larvas/*primer*/cruzamiento), se observó la presencia de dos fragmentos, uno de 100 pb y otro de 1100 pb, obtenidos con los *primers* ABA-07 y AB9-12 respectivamente (**Figura 24**). Estos *loci* no aparecieron en los progenitores, pero tampoco habían sido tenidos en cuenta anteriormente a la hora de seleccionar los *loci* RAPDs utilizados en este trabajo, puesto que no cumplían con el criterio de reproducibilidad. Así, si sólo se consideran los fragmentos reflejados en la tabla de frecuencias, como el ABA-07-400, AB9-12-520, AB9-12-750 o el AB9-12-900, se podría constatar que no existe ninguna banda en la descendencia que no aparezca en los progenitores. Por su parte, el *locus* AB9-12-350 reveló que el macho número 1 era heterocigoto para este *locus*, puesto que en su descendencia, originada a partir del cruzamiento con la hembra 4 homocigota nula, hubo individuos que no presentaron este fragmento (**Figura 24**).

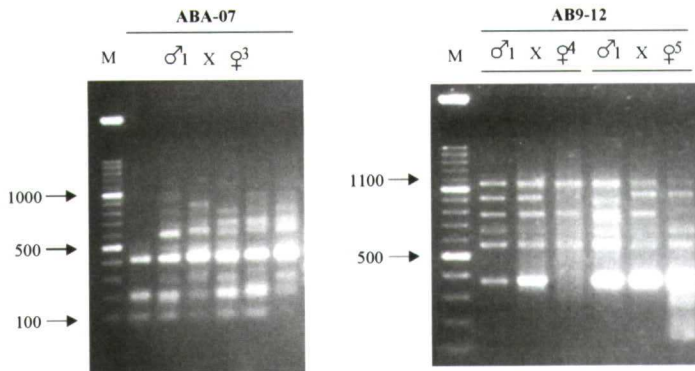


Figura 24. Bandas no parentales de 100 y 1100 pb, obtenidas con los *primers* ABA-07 y AB9-12 respectivamente, amplificadas en larvas procedentes de varios cruces entre individuos machos y hembras de la población de *M. galloprovincialis* de Balcobo. **M:** Marcador de 100pb.

4. APLICACIÓN DE MARCADORES RAPDs A OTRAS POBLACIONES DE MEJILLÓN

4.1 *Mytilus galloprovincialis* y *M. coruscus* de Japón (Bahía de Otsuchi)

En el presente estudio, también se han llevado a cabo ampliificaciones, mediante los siete *primers* seleccionados, en seis individuos de *M. galloprovincialis* y quince individuos de *M. coruscus* de la Bahía de Otsuchi, Japón. Dichas ampliificaciones fueron realizadas por duplicado para asegurar las condiciones de reproducibilidad. La matriz binaria de presencia-ausencia no ha sido modificada en cuanto a la adición de nuevos *loci*, debido a que no se ha podido conseguir un número significativo de individuos. De este modo, para su análisis, tanto descriptivo como preliminar, sólo se tuvieron en cuenta los 32 *loci* RAPDs previamente seleccionados.

En la **Figura 25** se muestran las ampliificaciones correspondientes a los *primers* del *kit* ABA. Así, con el *primer* ABA-02 ambas especies amplificaron los fragmentos de 1050 pb y 850 pb, no apareciendo en ningún caso la banda de 580 pb, característica de las poblaciones de *M. galloprovincialis* de la Península Ibérica. Con el *primer* ABA-05, se obtuvieron los fragmentos de 975 pb, 465 pb y 390 pb en ambas especies; sin embargo, tan sólo en tres de los quince individuos de *M. coruscus* amplificó el fragmento de 780 pb. El *primer* ABA-07 amplificó el fragmento de 475 pb en ambas

especies, mientras que el de 400 pb sólo se obtuvo en los individuos de *M. galloprovincialis* y en uno de *M. coruscus*. El primer ABA-10 amplificó en los seis individuos de *M. galloprovincialis* y en doce de *M. coruscus* el fragmento de 400 pb.

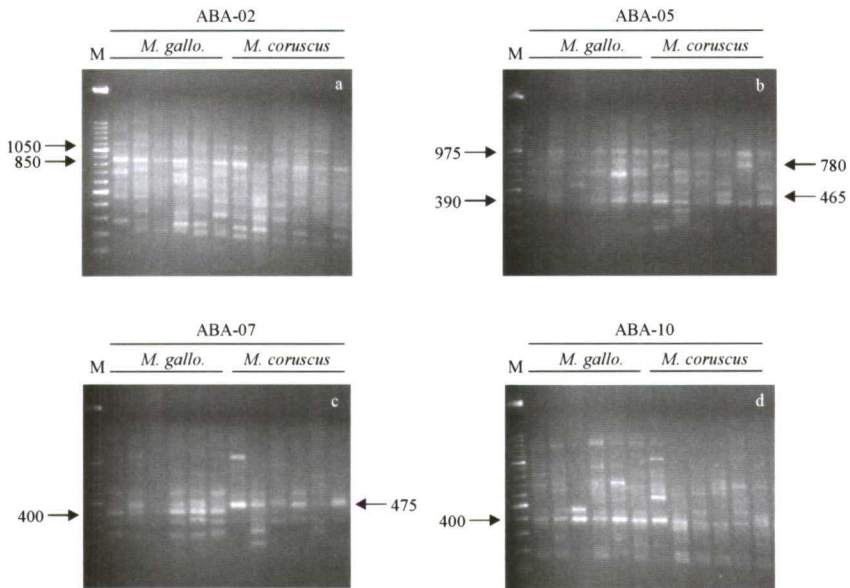


Figura 25. Amplificación de individuos pertenecientes a las poblaciones japonesas de *M. galloprovincialis* y *M. coruscus* con los primers a) ABA-02, b) ABA-05, c) ABA-07 y d) ABA-10. *M. gallo*: *M. galloprovincialis*; **M**: Marcador de 100pb.

Mediante los primers pertenecientes al kit AB9 (Figura 26), se pudo comprobar que el AB9-06 no amplificó los fragmentos de 500 pb y 700 pb seleccionados en este estudio, y sí un fragmento monomórfico de 600 pb en todos los individuos. El AB9-07 originó, en individuos de ambas especies, los fragmentos de 325 pb, 500 pb y 550 pb, así como un fragmento de ~250 pb que no era reproducible. Por último, el primer AB9-12 amplificó el fragmento de 900 pb en varios individuos de ambas especies.

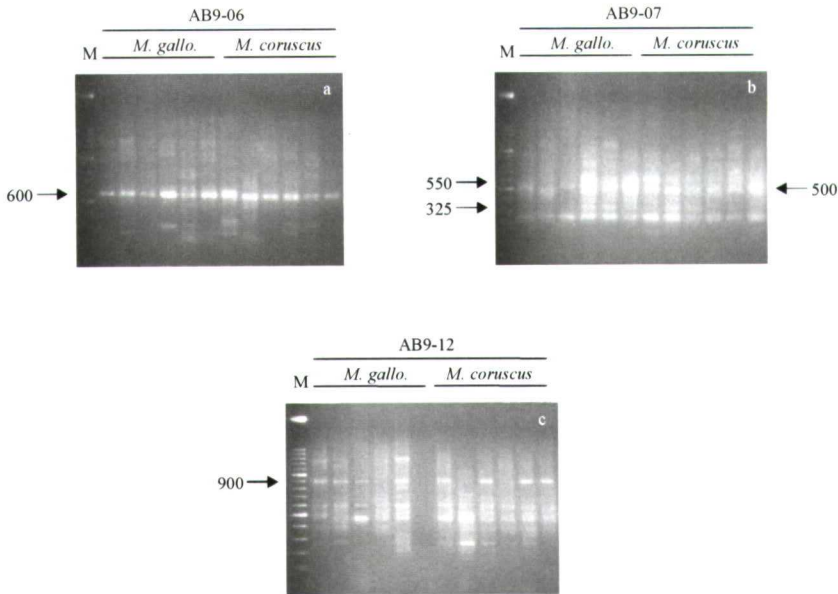


Figura 26. Amplificación de individuos pertenecientes a las poblaciones japonesas de *M. galloprovincialis* y *M. coruscus* con los primers a) AB9-06, b) AB9-07 y c) AB9-12. **M. gallo:** *M. galloprovincialis*; **M:** Marcador de 100pb.

Para realizar un análisis preliminar de estos resultados, se aplicó el método de componentes principales incluyendo las dos especies de Japón. Así, en la **Figura 27** se puede observar como ambas especies aparecen mezcladas en la nube de puntos con la población de Point No Point. Los componentes 1 y 2 explicaron un 22.5% y un 9.8% de la variación total respectivamente. Los 5 primeros un 49.6%.

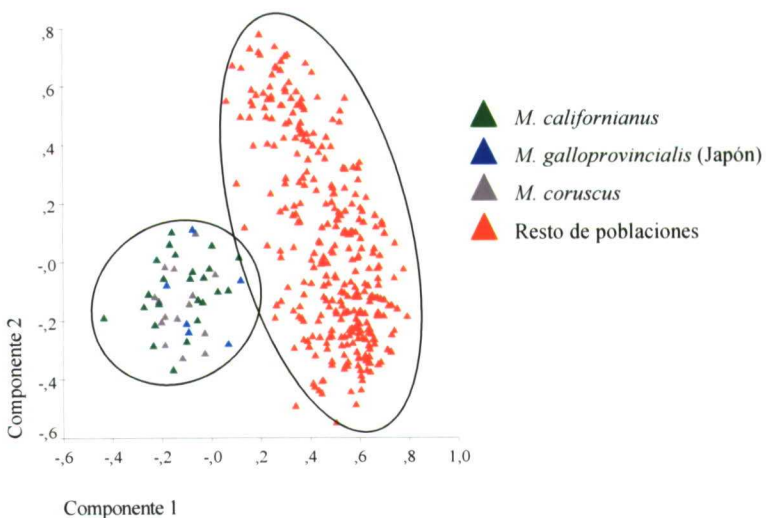


Figura 27. Análisis de componentes principales de 363 individuos pertenecientes a 14 poblaciones de *Mytilus*, incluyendo a las especies de Japón, utilizando 32 marcadores RAPDs.

A continuación, se llevó a cabo el mismo análisis pero sólo teniendo en cuenta las cuatro poblaciones de *M. galloprovincialis* de la Península Ibérica, las dos especies de Japón (*M. coruscus* y *M. galloprovincialis*) y la población de *M. californianus* de Point No Point. Así, según se observa en la **Figura 28**, los componentes 1 y 2, los cuales explicaron un 31.5% y un 10.6% de la variación respectivamente, separaron tres grupos claramente diferenciados, por un lado las dos especies de Japón, por otro las cuatro poblaciones de *M. galloprovincialis* de la Península Ibérica y, finalmente, la población de Point No Point. En este caso, las cinco primeras componentes explicaron el 58.2% de la varianza total.

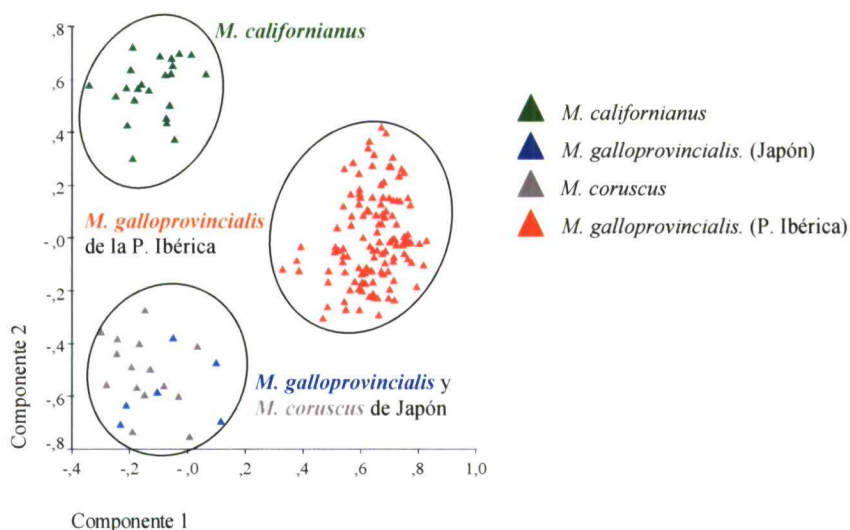


Figura 28. Análisis de componentes principales de 167 individuos pertenecientes a las poblaciones de Point No Point, las cuatro poblaciones de *M. galloprovincialis* de la Península Ibérica y las dos especies de Japón, utilizando 32 marcadores RAPD.

4.2 *Perna canaliculus* de Nueva Zelanda (Golden Bay)

Por otra parte, también se realizaron ampliaciones en 30 individuos pertenecientes a la población de *P. canaliculus* de Golden Bay con los *primers* ABA-02, ABA-05, ABA-07 y ABA-10. En este caso tampoco se ha tenido en cuenta esta especie a la hora de procesar la matriz binaria de presencia-ausencia, puesto que se trata de una especie no congénica con las demás, con lo que los fenómenos de comigración podrían ser mucho más frecuentes. Por lo tanto, en el presente trabajo se trató de buscar algún marcador o patrón de bandas que permitiese identificar esta especie con el fin de

evitar un posible fraude comercial. De este modo, los individuos de *P. canaliculus* amplificados con el *primer* ABA-02, nunca mostraron el fragmento de 580 pb característico de todos los individuos de las cuatro poblaciones de *M. galloprovincialis*; con el *primer* ABA-05, la población de *P. canaliculus* tampoco amplificó el fragmento de 975 pb, presente con una elevada frecuencia en las poblaciones de *M. galloprovincialis*. Por el contrario, como se observa en la **Figura 29**, todos los individuos de Golden Bay mostraron un patrón característico comprendido entre ~700 pb y 800 pb al ser amplificados con el *primer* ABA-07, además de no presentar el fragmento de 400 pb característico de las demás poblaciones analizadas. Dicho patrón de amplificación no se observó en ninguna de las demás poblaciones analizadas en este trabajo.

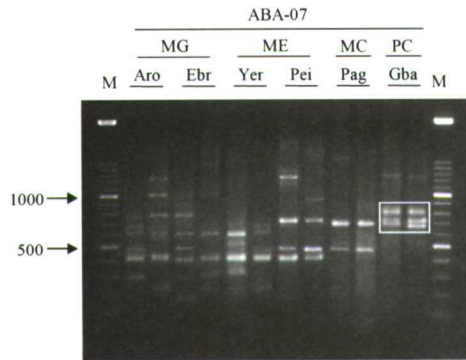


Figura 29. Amplificación, con el *primer* ABA-07, de individuos pertenecientes a distintas poblaciones de mejillón. En el recuadro aparece el patrón de amplificación de *P. canaliculus*. **MG:** *M. galloprovincialis*; **ME:** *M. edulis*; **MC:** *M. chilensis*; **PC:** *P. canaliculus*; **Aro:** Ría de Arousa; **Ebr:** Delta del Ebro; **Yer:** Yerseke; **Pei:** Prince Edward Island; **Pag:** Puerto Aguirre; **Gba:** Golden Bay; **M:** Marcador de 100pb.

5. ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE FRAGMENTOS RAPDs

En el presente trabajo, se llevó a cabo el análisis de las secuencias de algunos de los *loci* RAPDs seleccionados, con la finalidad de estudiar sus características, buscar alguna posible homología en las bases de datos y, si fuese posible, diseñar marcadores SCAR para identificar alguna de las poblaciones y/o especies objeto de estudio.

La selección de los fragmentos fue llevada a cabo en función de su frecuencia en cada una de las poblaciones analizadas. Así, los *loci* seleccionados fueron los siguientes: el ABA-02-580 de la población de la Ría de Arousa; el ABA-07-615 de Prince Edward Island, Isle of Man, Bedford Basin, Öland Island y Esquimalt Lagoon; el

ABA-07-400 de Balcobo; el ABA-10-500 de Balcobo; el AB9-06-850 de Prince Edward Island y Öland Island; el AB9-06-700 de la Ría de Arousa, Balcobo, Prince Edward Island, Isle of Man, Yerseke, Puerto Aguirre, Bedford Basin, Esquimalt Lagoon y Öland Island; el AB9-06-500 de la población de Point No Point y el AB9-07-1000 de Prince Edward Island.

El *locus* **ABA-02-580** apareció fijado en todas las poblaciones de *M. galloprovincialis*. Por ello, y aunque se ha manifestado con distinta frecuencia en cada una de las 8 poblaciones restantes, se llevó a cabo su secuenciación en individuos de la población de *M. galloprovincialis* de la Ría de Arousa. Como resultado, se obtuvo una secuencia consenso de 592 pb (Nº Acceso Genbank AJ315480) (**Figura 30**), con una proporción de adenina-timina del 63.24%. Su comparación con las bases de datos de ácidos nucleicos del EMBL y del Genbank no reveló ninguna homología significativa con ninguna de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas registradas.

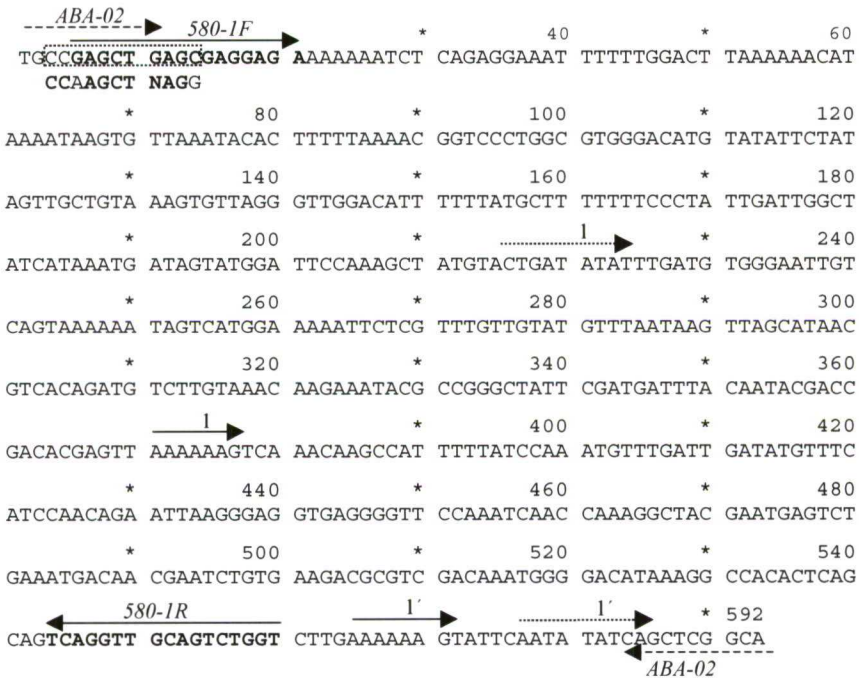


Figura 30. Secuencia consenso de 592 pb obtenida a partir de tres clones de diferentes individuos de la Ría de Arousa, en la cual se indican los *primers* 580-1F y 580-1R y el *primer* original de RAPD ABA-02. En el rectángulo de trazado discontinuo aparece, con una homología del 82%, una secuencia complementaria de la caja B (GGTTCGANTCC) de los promotores internos de los genes del ARNt. Las flechas continuas indican las repeticiones directas y las de puntos las inversas.

A partir de esta secuencia se diseñaron, una pareja de *primers*, el 580-1F (5'-GAG CTG AGC GAG GAG A-3') y 580-1R (5'-ACC AGA CTG CAA CCT GA-3'), para obtener marcadores SCARs que permitiesen diferenciar *M. galloprovincialis* de otras especies de mejillón. Después de llevar a cabo la amplificación en 40 individuos de la población de la Ría de Arousa (*M. galloprovincialis*), 40 del Delta del Ebro (*M. galloprovincialis*), 28 de Prince Edward Island (*M. edulis*), 34 de Yerseke (*M. edulis*), 33 de Puerto Aguirre (*M. chilensis*) y 30 de Golden Bay (*P. canaliculus*), los resultados obtenidos (**Figura 31**) mostraron la aparición de un fragmento de 555 pb presente en todos los individuos (100%) de la población de *M. galloprovincialis* de la Ría de Arousa y Delta del Ebro, en 5 individuos (17.85%) de la población de *M. edulis* de Prince Edward Island, en 2 de *M. edulis* de Yerseke (5.88%), en 3 de *M. chilensis* de Puerto Aguirre (9.09%) y en ningún individuo de la población de *P. canaliculus* de Golden Bay.

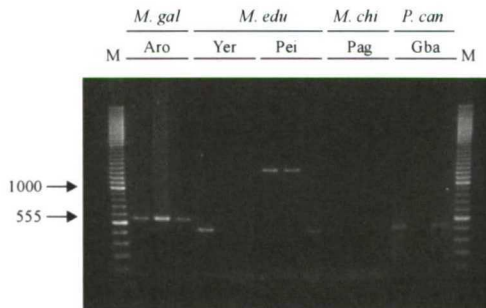


Figura 31. Marcadores SCARs en geles de agarosa al 1.5% obtenidos a partir de la amplificación con los *primers* 580-1F y 580-1R en diferentes individuos pertenecientes a distintas poblaciones de mejillón. *M. gal*: *M. galloprovincialis*; *M. edu*: *M. edulis*; *M. chi*: *M. chilensis*; *P. can*: *P. canaliculus*; **Aro**: Ria de Arousa; **Yer**: Yerseke; **Pei**: Prince Edward Island; **Pag**: Puerto Aguirre; **Gba**: Golden Bay; **M**: Marcador de 100pb.

El *locus* ABA-07-400 también fue secuenciado a partir de tres clones de tres individuos de la población de *M. galloprovincialis* de Balcobo. La secuencia consenso obtenida (**Figura 32**) constó de 410 pb, con una proporción de adenina-timina del 63.41%, y su comparación con las bases de datos de ácidos nucleicos del EMBL y del Genbank no reveló ninguna homología significativa con ninguna de las secuencias nucleotídicas registradas. A nivel aminoacídico, sí apareció cierta homología con la NADH deshidrogenasa de *Petromyzon marinus*, mostrando una proporción de un 31% de homología idénticas y un 52% de homología positivas. También se ha detectado 1 repetición directa de 8 pares de bases de longitud y 2 repeticiones inversas de 7 pares de bases de longitud, además de una homología del 91% con las secuencias consenso de las cajas A y B de los promotores internos de los genes del ARNt.

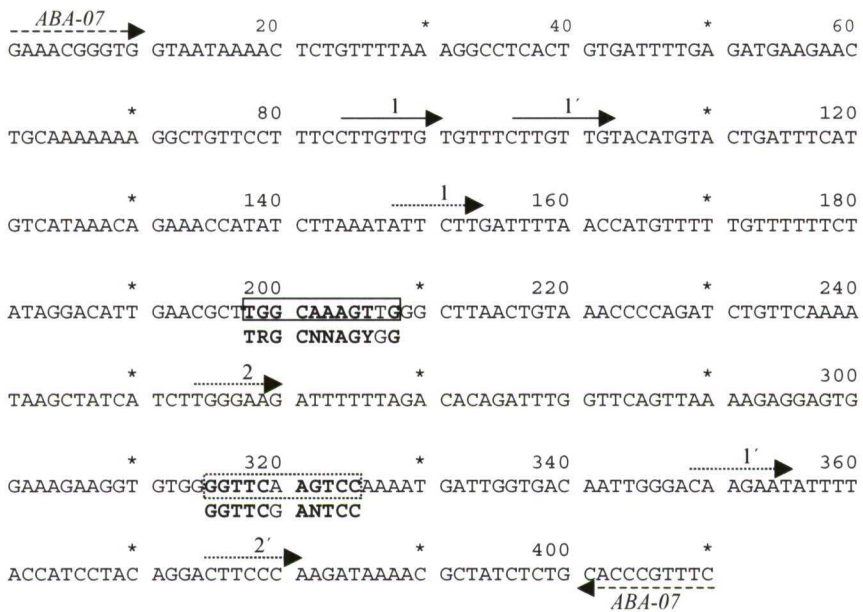


Figura 32. Secuencia consenso de 410 pb obtenida a partir de tres clones de tres individuos de Balcobo, en la cual se indica el *primer* original de RAPD ABA-07. Las probables secuencias homólogas a las secuencias consenso de las cajas A (TRGCNNAGYGG) y B (GGTTCGANTCC) aparecen en los rectángulos de trazado continuo y discontinuo respectivamente. Las flechas continuas indican las repeticiones directas y las de puntos las inversas.

El *locus* **ABA-10-500** fue secuenciado con el fin de intentar obtener algún marcador diagnóstico. Así, a partir de tres clones de la población de *M. galloprovincialis* de Balcobero, se obtuvo una secuencia consenso de 516 pb (**Figura 33**) con una proporción de adenina-timina del 64.73%. Su posterior comparación con las bases de datos nucleotídicas del EMBL y del Genbank no reveló ninguna similitud con ninguna de las secuencias registradas, tanto nucleotídicas como aminoácidas. En dicha secuencia, se han detectado 3 repeticiones directas y 2 inversas, de 7 pares de bases de longitud. Además de una homología del 91% con la secuencia complementaria de la caja A (TRGCNNAGYGG) de los promotores internos de los genes del ARNt.

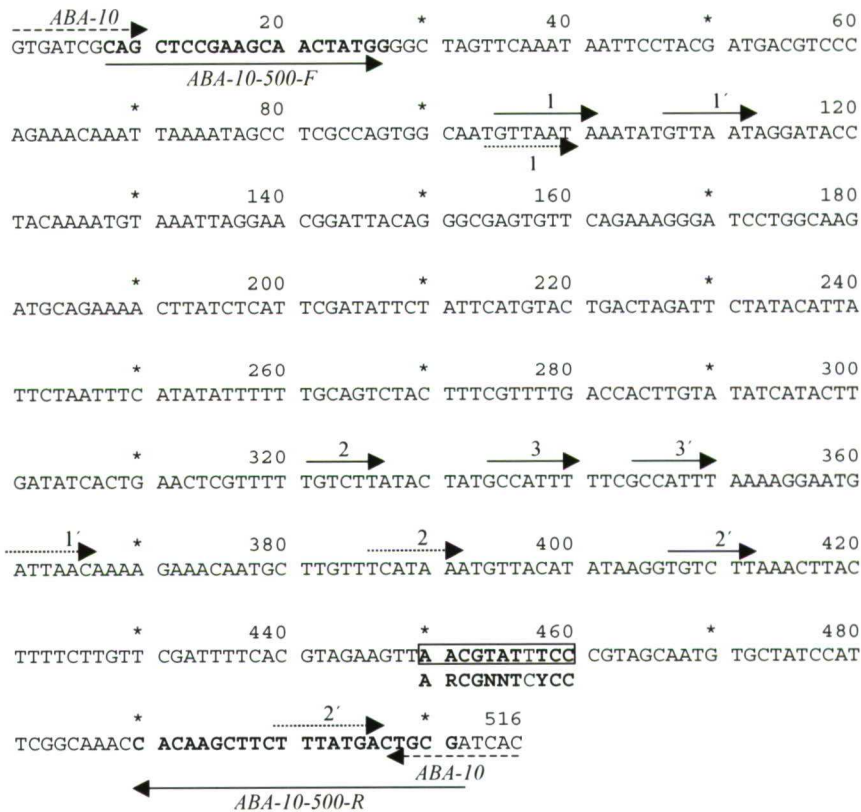


Figura 33. Secuencia consenso de 516 pb obtenida a partir de tres clones de tres individuos de Balcobero, en la cual se indica el *primer* original de RAPD ABA-10, y los *primers* ABA-10-500-F y ABA-10-500-R. En el rectángulo de trazado continuo aparece la probable secuencia complementaria a la caja A de los promotores internos de los genes del ARNt. Las flechas continuas indican las repeticiones directas y las de puntos las inversas.

Una vez obtenida la secuencia se diseñaron una pareja de *primers*, el ABA-10-500-F (5'-CAG CTC CGA AGC A AC TAT GG-3') y ABA-10-500-R (5'-CGC AGT CAT AAA GAA GCT TGT G-3'), para obtener marcadores SCARs que permitiesen diferenciar alguna de las poblaciones o especies objeto de estudio. Los resultados obtenidos no permitieron llevar a cabo esta identificación, puesto que en algunas poblaciones amplificaba un fragmento de ~ 550 pb y en otras, incluida la de Puerto Aguirre, no.

Con respecto al *locus* AB9-6-850, este fue clonado y secuenciado para evaluar su elevada frecuencia en las tres poblaciones de *M. trossulus* e intentar desarrollar algún marcador SCAR especie-específico. La secuencia consenso obtenida a partir de tres clones de un individuo de la población de *M. trossulus* de Öland Island (**Figura 34**) fue introducida en las bases de datos nucleotídicas del Genbank y mostró una gran homología con la secuencia parcial de la región correspondiente al ARNr 18S, la secuencia total de las regiones ITS1 y 5.8S, y la secuencia parcial de la región ITS2 de varias especies de mejillón. Dicha secuencia constó de 847 pb, con una proporción de adenina-timina del 48.29%.

```

-----AB9-06----->
GGGAACCCGT   20      *           40      *           60
TGAACCTCCT   TCGTGCTAGG   GATTGGGGCT   TGTAATTCTT   CCCCATGAAC

*           80      *           100     *           120
GAGGAATTCC   TAGTAAGCGC   GAGTCATAAG   CTCGCGTTGA   TTACGTCCTT   GCCCTTTGTA

*           140     *           160     *           180
CACACCGCCC   GTCGCTACTA   CCGATTGGGC   GTTTTAGTGA   GCGCCTCGGA   TTGGACCCGG

*           200     *           220     *           230
AAATGGTTGG   CAACAACCGT   ACCGGTGTGC   CGAAAAGACG   CGCAAACCTG   AACGCCTAGA

*           260     *           280     *           300
GGAAGTAAAA   GTCGTAACAA   GGTTCGCTA   GGTGAACCTG   CGGAAGGATC   ATTACCGCTA

*           320     *           340     *           360
TCGATCAGAT   TTATATACCT   TTTCATCGGG   GTTGTATTTC   TATCTAGCTT   ATCGTACGCA

*           380     *           400     *           420
AAAACATCGG   TCACCTTCGG   TGATCGATAT   CAAAAGTCCC   CGTGGTCTGC   GGTCTCGGTC

*           440     *           460     *           480
GCAGATCGGC   GGGGTGGGTG   CAGGTTTGAC   AGGTACACGG   GTTTTGTGCC   TTTTCAACGG
    
```

```

      *           500           *           520           *           540
GGTAAGGCTC GTTACCGGCC TGCTTACCTT CCTCCATGCT ATTTTTATTT TCTTTCCTC

      *           560           *           580           *           600
GAAACGTCAA TGAAAACCAA AGCATAACAC GCAGGTCGCC CCGTCGTAA AACATTTTCG

      *           620           *           640           *           660
TTGCCAGACG ACGGGGCTTC CGACACATTG GCACACGCCA AGGAAAAAAC ATATGAAAAAC

      *           680           *           700           *           720
TACTCTAGGC GGTGGATCAC TCGGCTCGTG CGTCGATGAA GAGCCAGCC AGCTGGCGTG

      *           740           *           760           *           780
AATTAATGTG AATTGCAGGA CACATTGAAC ATCGACATCT TGAACGCCAC ATTGCGGCTT

      *           800           *           820           *
TGGGTCACTC CCGGAGCCAC GCCTGTCTGA GGGTCGGTGG AACATCAATC GCCCAAACG ←

```

AB9-06

GGTCCC

Figura 34. Secuencia consenso de 847 pb obtenida a partir de tres clones de un individuo de Öland Island, en la cual se indica el *primer* original de RAPD AB9-06. Del primer nucleótido al 294 y en **negrita** aparece la región parcial correspondiente al gen 18S, del 295 al 659 la secuencia correspondiente a la región ITS1, del 660 al 818 y en **negrita** aparece la secuencia correspondiente al gen 5.8S y del 819 al 847 la secuencia parcial de la región ITS2.

A continuación, se procedió a la clonación y secuenciación del mismo fragmento pero a partir de un individuo de la población de *M. edulis* de Prince Edward Island. La secuencia consenso obtenida a partir de tres clones se alineó, mediante el programa ClustalX, con la secuencia consenso de la población de *M. trossulus* de Öland Island comprobando, como cabía esperar, su alto grado de homología. Así, tras obtener del Genbank una serie de secuencias correspondientes a la región 5.8S de algunas especies de la clase Bivalvia, se procedió a su alineamiento, cálculo de valores de distancia y coeficientes de transiciones/transversiones según el modelo de Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980) y posterior análisis de máxima parsimonia y Neighbor-Joining.

El análisis de la secuencia consenso completa correspondiente a la región 5.8S fue llevado a cabo en varias especies de la clase Bivalvia: *Perna viridis*, perteneciente al Orden Mytiloidea, Familia Mytilidae; *Tridacna crocea* (Familia Tridacnidae), *Arctica islandica* (Familia Arctidae), *Vesicomya pacifica* (Familia Vesicomidae), *Mytilopsis sallei* (Familia Dreissenidae) pertenecientes al Orden Veneroidea; y por último, para su empleo como *outgroup*, la especie *Saprolegnia multispora* (Familia Saprolegniaceae) perteneciente al Orden Saprolegniales de la Clase Oomycetes. La longitud de las secuencias osciló entre 156 y 161 nucleótidos, siendo las correspondientes a *T. crocea* y *S. multispora* las más divergentes (**Figura 35**).

<i>M. edu Pei</i> *	: C T A C T C T A G G - - - - C G G T G G A T C A C T C G G C T C G T G C G T C G A T G A A G A G C C	: 46
<i>M. tro Ola</i> *	: - - - -	: 46
<i>P. viridis</i>	: G	: 46
<i>M. sallei</i>	: G	: 46
<i>A. islandica</i>	: . A T - - - - G	: 46
<i>V. pacifica</i>	: . G . . . G . G . . G T A C G	: 50
<i>T. crocea</i>	: - - . . . G . G T A - - - . C T . . T . . G T A A . A . . C . . C . A G	: 44
<i>S. multispora</i>	: . A . . . T . C A A - - - . A G T . . A C A . A C A . G	: 46
<i>M. edu Pei</i> *	: - A G C C A G C T G - C G T G A A T T A A T G T G A A T T G C A G G A C - A C A T T G A A - C A T C	: 92
<i>M. tro Ola</i> *	: C G - - -	: 94
<i>P. viridis</i>	: C - - - -	: 93
<i>M. sallei</i>	: C - - - -	: 93
<i>A. islandica</i>	: C - - - -	: 93
<i>V. pacifica</i>	: C - - - -	: 97
<i>T. crocea</i>	: C . . . T . . A . . - T A A T G . G . . T C . C . T T . C C . T . T	: 93
<i>S. multispora</i>	: C T . . G . A A T . C G C A . T - T . . G . . G T	: 94
<i>M. edu Pei</i> *	: G A C A T C T T G A A C G C - A C A T T G C G G C T - T T G G G T C A C T C C C G G A G C C A C G C	: 140
<i>M. tro Ola</i> *	: C - - -	: 143
<i>P. viridis</i>	: . . T - - - -	: 141
<i>M. sallei</i>	: . . T - - - -	: 141
<i>A. islandica</i>	: . . . C - - C C . . C G T . . .	: 141
<i>V. pacifica</i>	: . . . C - - C C . . C G T . . .	: 145
<i>T. crocea</i>	: T . . . G . . C . T G . . - G . . G C T C C T . . T G C A G C . . T . N T	: 142
<i>S. multispora</i>	: A . A . . T - . T A C T . . - C C . . . T . G . . . T . G A G T . T . T	: 142
<i>M. edu Pei</i> *	: C T G T C T G A G G G T C G G T	: 156
<i>M. tro Ola</i> *	:	: 159
<i>P. viridis</i>	:	: 157
<i>M. sallei</i>	:	: 157
<i>A. islandica</i>	: C C	: 157
<i>V. pacifica</i>	: C C	: 161
<i>T. crocea</i>	: A . . T T . G . A -	: 157
<i>S. multispora</i>	: T . . A . C . . T . . . C . .	: 158

Figura 35. Alineamiento múltiple de las secuencias consenso correspondientes a la región 5.8S de varias especies de la Clase Bivalvia y Oomycetes. Los puntos (.) son sitios que no varían con respecto a la secuencia de *M. edulis* de la población de Prince Edward Island. Las posiciones variables se indican en la figura, mientras que los guiones (-) representan *gaps*. Con asterisco (*) se representan las dos especies del presente estudio, Prince Edward Island y Oland Island.

El cálculo de los valores de distancias y coeficientes de transiciones/transversiones según el modelo de Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980) (**Tabla 16**) mostró que la mayor distancia se originó entre *S. multispورا* y *T. crocea*, con un valor de 0.666, mientras que la menor distancia se produce entre las poblaciones de *M. edulis* y *M. trossulus*, y entre *P. viridis* y *M. sallei*. Con respecto al coeficiente de transiciones/transversiones, éste resultó ser menor que 1 tan sólo entre *T. crocea* y el resto de especies; mientras que alcanzó valores superiores a 2 al comparar las dos especies pertenecientes al género *Mytilus* con *P. viridis* y *M. sallei*.

Tabla 16 Valores de distancia y coeficiente de transiciones/transversiones (Ts/Tv), según el modelo de Kimura 2 parámetros, de las secuencias consenso de la región 5.8S de varias especies pertenecientes a las Clases Bivalvia y Oomycetes

Ts/Tv Distancia	<i>M. edulis</i> Pei	<i>M. trossulus</i> Ola	<i>P. viridis</i>	<i>M. sallei</i>	<i>A. islandica</i>	<i>V. pacifica</i>	<i>S. multispورا</i>	<i>T. crocea</i>
<i>M. edulis</i> Pei		ψ	2.025	2.025	1.032	1.399	1.670	0.602
<i>M. trossulus</i> Ola	0.000		2.024	2.024	1.031	1.399	1.666	0.602
<i>P. viridis</i>	0.020	0.019		θ	1.241	1.682	1.666	0.625
<i>M. sallei</i>	0.020	0.019	0.000		1.241	1.682	1.666	0.625
<i>A. islandica</i>	0.081	0.081	0.074	0.074		1.526	1.525	0.668
<i>V. pacifica</i>	0.096	0.095	0.088	0.088	0.033		1.675	0.668
<i>S. multispورا</i>	0.442	0.438	0.415	0.415	0.461	0.488		0.465
<i>T. crocea</i>	0.494	0.490	0.477	0.477	0.490	0.490	0.666	

Ola: Öland Island; **Pei:** Prince Edward Island; (ψ) Diferencias basadas en INDELS; (θ) Las dos secuencias son iguales.

El análisis de los árboles generados por el método Neighbor-Joining y el consenso del *bootstrap* por el principio de máxima parsimonia reveló una idéntica topología, por lo que en la **Figura 36** tan sólo se muestra el segundo. En él se pudo observar la presencia de dos *clusters*, uno englobando a *S. multispورا* y *T. crocea*, las más divergentes, y otro agrupando al resto de especies. Por otro lado se apreció una mayor relación, dentro de este segundo *cluster*, entre las secuencias de las dos especies del género *Mytilus* pertenecientes a este estudio y las correspondientes a *P. viridis* y *M. sallei*.

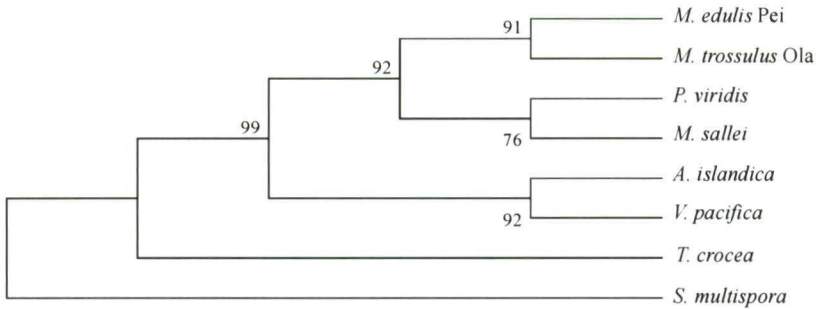


Figura 36. Árbol filogenético de máxima parsimonia de las secuencias consenso de la región 5.8S de varias especies pertenecientes a la Clase Bivalvia y Oomycetes. Los valores de *bootstrap* mayores del 50%, sobre 100 réplicas, se señalan en los nodos. **Pei:** Prince Edward Island; **Ola:** Öland Island.

El *locus* **AB9-06-700** fue aislado y secuenciado para evaluar la alta frecuencia que manifestó en la totalidad de las poblaciones analizadas. Dicho *locus* fue obtenido a partir de las poblaciones de la Ría de Arousa y Balcobo (*M. galloprovincialis*), Yerseke, Prince Edward Island e Isle of Man (*M. edulis*), Puerto Aguirre (*M. chilensis*), Bedford Basin, Esquimalt Lagoon y Öland Island (*M. trossulus*). En la **Figura 37** se muestra la secuencia consenso de tres clones pertenecientes a la población de la Ría de Arousa. Dicha secuencia constó de 652 pb, con una proporción de adenina-timina del 65.13%. Su comparación con las bases de datos de ácidos nucleicos del EMBL y del Genbank no reveló ninguna homología significativa con ninguna de las secuencias nucleotídicas ni aminoacídicas registradas. También se han detectado 1 repetición directa de 10 pb, 2 de 9 pb, 3 de 8 pb y 8 de 7 pb (no reflejadas en la figura), además de 3 repeticiones inversas de 8 pb de longitud y 10 de 7 pb (no reflejadas en la figura). También se detectó una posible homología del 82% y 53% con las secuencias reversas de la cajas A y C de los promotores internos de los genes del ARNt y ARN 5S respectivamente.



Análisis de marcadores RAPDs en el género Mytilus

	60	*	80	*	100	
<i>M. gal</i> Aro :	CTAATTGGTATATCCTATAA	CTTATTGTCATCTAAAATAATATGTACAC	:	100		
<i>M. gal</i> Bal :	:	100		
<i>M. edu</i> Yer :	:	100		
<i>M. edu</i> Pei :	:	100		
<i>M. edu</i> Man :	:	100		
<i>M. chi</i> Pag :	:	100		
<i>M. tro</i> Bed :	:	99		
<i>M. tro</i> Esq :	:	99		
<i>M. tro</i> Ola :	:	99		

	*	120	*	140	*	
<i>M. gal</i> Aro :	ATCTTAATCTAATGTTTATATCCAATT	TATCGGGAAGAAACTCGCAATTC	:	150		
<i>M. gal</i> Bal :	:	150		
<i>M. edu</i> Yer :	A.....	:	150	
<i>M. edu</i> Pei :	C.....A.....	:	150	
<i>M. edu</i> Man :	:	150	
<i>M. chi</i> Pag :A.....	:	150	
<i>M. tro</i> Bed :A.A.....	:	149	
<i>M. tro</i> Esq :A.A.....	:	149	
<i>M. tro</i> Ola :A.A.....	:	149	

	160	*	180	*	200	
<i>M. gal</i> Aro :	AGTAACATGCCGCCGTTTATCTAAACAACGCCACAGATCTTTGTGTGTC	:	200			
<i>M. gal</i> Bal :	:	200		
<i>M. edu</i> Yer :	T.....	:	200		
<i>M. edu</i> Pei :	T.....	C.....	:	200	
<i>M. edu</i> Man :	:	200	
<i>M. chi</i> Pag :	T.....	:	200	
<i>M. tro</i> Bed :	T.....	:	199	
<i>M. tro</i> Esq :	T.....	:	199	
<i>M. tro</i> Ola :	T.....	:	199	

	*	220	*	240	*	
<i>M. gal</i> Aro :	GTTCTGATAAACTGGTATACGATCTGGCAATTCAATATTGTCAACGTTAT	:	250			
<i>M. gal</i> Bal :	:	250		
<i>M. edu</i> Yer :	C.....	T.....	T.....	:
<i>M. edu</i> Pei :	G.....	A.T.....	:
<i>M. edu</i> Man :	:
<i>M. chi</i> Pag :	A.T.....	:
<i>M. tro</i> Bed :	:
<i>M. tro</i> Esq :	:
<i>M. tro</i> Ola :	:

	260	*	280	*	300	
<i>M. gal</i> Aro :	AAAAGTGACCTATTACTCATTAACTAATTAACCAGACTGAACTAAT	:	300			
<i>M. gal</i> Bal :	:	300		
<i>M. edu</i> Yer :	:
<i>M. edu</i> Pei :	C.....	:
<i>M. edu</i> Man :	:
<i>M. chi</i> Pag :	:
<i>M. tro</i> Bed :	:
<i>M. tro</i> Esq :	:
<i>M. tro</i> Ola :	:

	*	320	*	340	*	
M. gal Aro :	TCTCCATGGATTATCAGACAGACGGATTGATCCATACTCGCGAGGGAAGG					: 350
M. gal Bal :						: 350
M. edu Yer :						: 350
M. edu Pei :						: 350
M. edu Man :						: 350
M. chi Pag :						: 350
M. tro Bed :					A	: 349
M. tro Esq :					A	: 349
M. tro Ola :					A	: 349

	360	*	380	*	400	
M. gal Aro :	CAATATTGTTTTTCATTGAAATATCACCCGGGATGATAATGGTAATATCA					: 400
M. gal Bal :						: 400
M. edu Yer :						: 399
M. edu Pei :						: 400
M. edu Man :						: 400
M. chi Pag :						: 400
M. tro Bed :					A	: 399
M. tro Esq :	G				A	: 399
M. tro Ola :					A	: 399

	*	420	*	440	*	
M. gal Aro :	CCTTCCAGACAACATACGCTGTACATTCTATGCAATACCGCGTAATTCT					: 450
M. gal Bal :						: 450
M. edu Yer :				T	T	: 449
M. edu Pei :				T		: 450
M. edu Man :						: 450
M. chi Pag :				CT	T	: 450
M. tro Bed :				T		: 449
M. tro Esq :				T	T	: 449
M. tro Ola :				T		: 449

	460	*	480	*	500	
M. gal Aro :	AAT-TTTTT-ACGGTATTTAGCTGTTAAAATTCTGCATTATAGATGAAGT					: 498
M. gal Bal :					T	: 498
M. edu Yer :					T	: 498
M. edu Pei :					T	: 499
M. edu Man :					T	: 498
M. chi Pag :					T	: 499
M. tro Bed :	G.A				T	: 499
M. tro Esq :	G.A				T	: 499
M. tro Ola :	G.A				T	: 499

	*	520	*	540	*	
M. gal Aro :	TTTCAGGTGCTAATTGCAGGTAATTCGAGTATGTATTACAACCTTCCAAG					: 548
M. gal Bal :						: 548
M. edu Yer :						: 548
M. edu Pei :					A	: 549
M. edu Man :					C	: 548
M. chi Pag :						: 549
M. tro Bed :						: 549
M. tro Esq :					C.T.C.A	: 549
M. tro Ola :					A	: 549

	560	*	580	*	600	
<i>M. gal</i> Aro :	AGAAAACAATGATGGGTACTCTATCAGAAATGGTCTTTTGTTTAGTGTT	:	598			
<i>M. gal</i> Bal :T.....	:	598			
<i>M. edu</i> Yer :T.....A.....G.....	:	598			
<i>M. edu</i> Pei :T.....G.....	:	599			
<i>M. edu</i> Man :T.....A.....	:	598			
<i>M. chi</i> Pag :T.....A.....G.....	:	599			
<i>M. tro</i> Bed :T.....G.....AC.....	:	599			
<i>M. tro</i> Esq :	GAG.....G.....G.....AC.....	:	599			
<i>M. tro</i> Ola :T.....G.....AC.....	:	599			
	*	620	*	640	*	
<i>M. gal</i> Aro :	TGCGTGATACACCGACACATGAGTTTTTATATTGTATGTA-TTATGACGG	:	647			
<i>M. gal</i> Bal :	:	647			
<i>M. edu</i> Yer :	:	647			
<i>M. edu</i> Pei :G.....	:	648			
<i>M. edu</i> Man :CCA.T.....ATA.....A.....	:	647			
<i>M. chi</i> Pag :	:	648			
<i>M. tro</i> Bed :T..T.....	:	648			
<i>M. tro</i> Esq :T..T.....	:	648			
<i>M. tro</i> Ola :T..T.....	:	648			
<i>M. gal</i> Aro :	GTTCC-	:	652			
<i>M. gal</i> Bal :C	:	653			
<i>M. edu</i> Yer :C	:	653			
<i>M. edu</i> Pei :C	:	653			
<i>M. edu</i> Man :C	:	654			
<i>M. chi</i> Pag :C	:	654			
<i>M. tro</i> Bed :C	:	654			
<i>M. tro</i> Esq :	.G...C	:	654			
<i>M. tro</i> Ola :C	:	654			

Figura 38. Alineamiento múltiple de las secuencias consenso correspondientes al locus AB9-06-700 de varias poblaciones de mejillón del presente trabajo. Los puntos (.) son sitios que no varían con respecto a la secuencia de *M. galloprovincialis* de la población de la Ría de Arousa. Las posiciones variables se indican en la figura, mientras que los guiones (-) representan gaps. **M. edu:** *M. edulis*; **M. gal:** *M. galloprovincialis*; **M. tro:** *M. trossulus*; Aro: Ría de Arousa; Bal: Balcobo; Yer: Yerseke; Pei: Prince Edward Island; Man: Isle of Man; Pag: Puerto Aguirre; Bed: Bedford Basin; Esq: Esquimalt Lagoon; Ola: Öland Island.

El cálculo de los valores de distancias y coeficientes de transiciones/transversiones según el modelo de Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980) (Tabla 17) mostró que la mayor distancia se originó entre las poblaciones de Esquimalt Lagoon (*M. trossulus*) e Isle of Man (*M. edulis*), con un valor de 0.059, mientras que la menor distancia se produce entre las poblaciones de *M. galloprovincialis* de la Ría de Arousa y Balcobo, con un valor de 0.002. El análisis de correlación con la matriz de distancias de Nei (1978) del apartado 2.4 mostró un valor de $r = 0.34$ ($p < 0.09$). Con respecto al coeficiente de transiciones/transversiones, éste resultó ser mayor que 1 al comparar la población Yerseke con las de Prince Edward Island, Balcobo e Isle of Man,

y la de Puerto Aguirre con Prince Edward Island. Y resultó mayor que 2 entre las poblaciones de *M. trossulus*.

Tabla 17 Valores de distancia y coeficiente de transiciones/transversiones (Ts/Tv), según el modelo de Kimura 2 parámetros, de las secuencias consenso del locus AB9-06-700 de varias poblaciones de mejillón del presente estudio.

Ts/Tv Distancia	<i>M. gal</i> Aro	<i>M. gal</i> Bal	<i>M. edu</i> Yer	<i>M. edu</i> Pei	<i>M. edu</i> Man	<i>M. chi</i> Pag	<i>M. tro</i> Bed	<i>M. tro</i> Esq	<i>M. tro</i> Ola
<i>M. gal</i> Aro		θ	0.862	0.602	0.627	0.556	0.354	0.823	0.354
<i>M. gal</i> Bal	0.002		1.209	0.754	0.838	0.717	0.415	0.823	0.415
<i>M. edu</i> Yer	0.020	0.017		1.618	1.013	0.752	0.639	0.948	0.639
<i>M. edu</i> Pei	0.025	0.022	0.020		0.794	1.006	0.500	0.846	0.354
<i>M. edu</i> Man	0.020	0.017	0.035	0.039		0.776	0.557	0.866	0.557
<i>M. chi</i> Pag	0.022	0.019	0.011	0.015	0.036		0.461	0.835	0.461
<i>M. tro</i> Bed	0.030	0.027	0.028	0.033	0.044	0.030		2.023	#
<i>M. tro</i> Esq	0.046	0.046	0.046	0.052	0.059	0.049	0.019		2.538
<i>M. tro</i> Ola	0.030	0.027	0.028	0.030	0.044	0.030	0.003	0.022	

M. gal. *M. galloprovincialis*; ***M. edu.*** *M. edulis*; ***M. chi.*** *M. chilensis*; ***M. tro.*** *M. trossulus*; **Aro:** Ria de Arousa; **Bal:** Balcobo; **Yer:** Yerseke; **Pei:** Prince Edward Island; **Man:** Isle of Man; **Pag:** Puerto Aguirre; **Bed:** Bedford Basin; **Esq:** Esquimalt Lagoon; **Ola:** Öland Island. (#) Transversiones igual a cero, (θ) Las dos secuencias son iguales.

El análisis de los árboles según los métodos Neighbor-Joining y máxima parsimonia reveló una topología idéntica. Así, en la **Figura 39** se refleja el segundo, en el cual se puede observar cómo las poblaciones de *M. trossulus*, incluida la de Öland Island, aparecen agrupadas en un mismo *cluster* y las poblaciones de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. chilensis* en otro *cluster*.

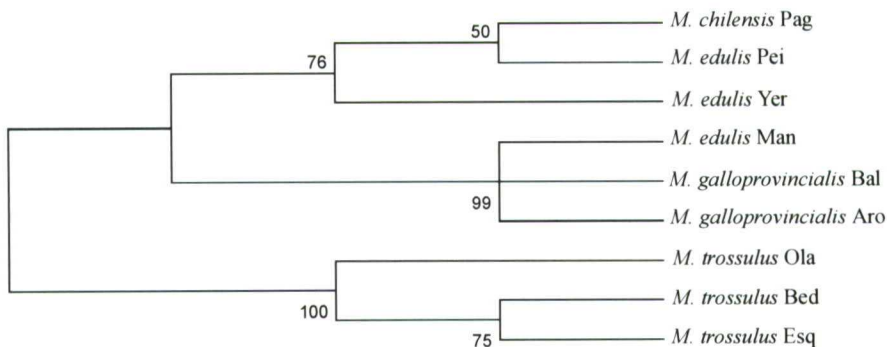


Figura 39. Árbol filogenético del consenso con *bootstrap* de máxima parsimonia de las secuencias consenso del locus AB9-06-700 de varias poblaciones de mejillón del presente trabajo. Los valores de *bootstrap* mayores del 50%, sobre 100 réplicas, se señalan en los nodos. **Pag:** Puerto Aguirre; **Pei:** Prince Edward Island; **Yer:** Yerseke; **Man:** Isle of Man; **Aro:** Ria de Arousa; **Bal:** Balcobo; **Bed:** Bedford Basin; **Esq:** Esquimalt Lagoon; **Ola:** Öland Island.

A continuación, se realizó la secuenciación del único *locus*, el **AB9-06-500**, que apareció fijado en las poblaciones de Point No Point (*M. californianus*) y Puerto Aguirre (*M. chilensis*). La secuencia consenso (**Figura 40**) obtenida a partir del análisis de tres clones de un individuo de *M. californianus* constó de 494 pb, con un contenido en adenina-timina del 59.51%. Su comparación con las bases de datos nucleotídicas y aminoacídicas del EMBL y del Genbank no reveló ninguna homología reseñable. Asimismo, se han detectado sendas repeticiones directas e inversas de 8 pb y 7 pb respectivamente. A partir de esta secuencia se diseñó una pareja de *primers*, el AB9-06-500-F (5'-CCG TTA CAA GTT TAG GCG CCC TA-3') y el AB9-06-500-R (5'-GAA CCC GTC TGA GGT TTT CGT TG - 3'). Como resultado de esta amplificación, se obtuvo un fragmento de ~500 pb en la mayoría de los individuos de todas las poblaciones analizadas. Esto llevó a descartar la idoneidad de considerar este fragmento como un marcador SCAR apto para diferenciar alguna de las poblaciones que se tratan en este estudio.

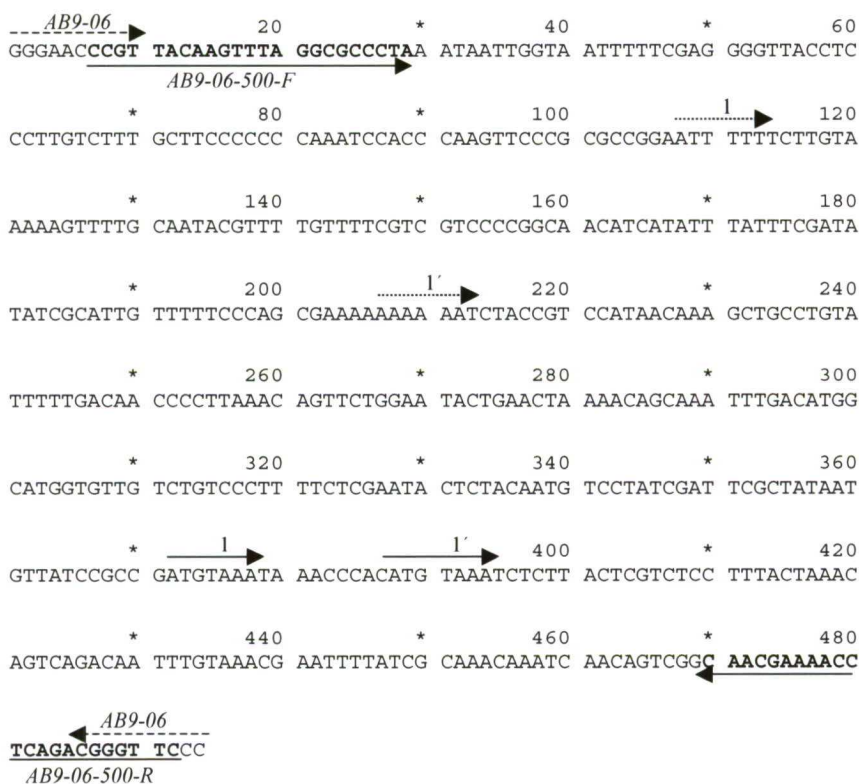


Figura 40. Secuencia consenso de 494 pb obtenida a partir de tres clones de un individuo de Point No Point, en la cual se indica la *primer* original de RAPD AB9-06, y los *primers* AB9-06-500-F y AB9-06-500-R. Las flechas continuas indican las repeticiones directas y las de puntos las inversas.

La secuenciación del *locus* **AB9-07-1000** fue llevada a cabo para, además de analizar y comparar su secuencia con otras registradas en las bases de datos nucleotídicas y aminoacídicas del EMBL y del Genbank, diseñar *primers* específicos que permitiesen contrastar los resultados obtenidos mediante las hibridaciones Southern Blot y Dot Blot del apartado 2.2. Como resultado, se obtuvo una secuencia consenso de 973 pb a partir de un individuo de la población de *M. edulis* de Prince Edward Island. Su contenido en adenina-timina fue del 64.03%. Asimismo, se han observado 2 repeticiones directas de 10 pb y 9 pb respectivamente y 3 repeticiones inversas, una de 11 pb y dos de 9 pb. También se detectó la presencia de un posible *ORF* (Open Repeat Frame) que podría estar relacionado con la síntesis de distintas subunidades de la enzima NADH deshidrogenasa de distintos organismos, según el análisis comparativo realizado con las secuencias aminoacídicas registradas en el Genbank. En este sentido, su comparación con las bases de datos aminoacídicas del Genbank reveló también cierta homología con un elemento genético móvil del mosquito *Anopheles gambiae*, mostrando una proporción de un 34% de homologías idénticas y un 47% positivas. En la **Figura 41** se muestra la secuencia consenso, en la cual se puede observar parte de la región codificante de la NADH deshidrogenasa y la secuencia proteica del transposón de *A. gambiae*.



```

Nucl : CAA AGA AAA AGA AAA GAT ATG TTT TAG TCA TAC GAG ACT TTT TTA : 630
Prot :                               Ser Tyr Glu Thr Phe Leu : 6
Trsp :                               Thr Ile Val Asp Arg Phe : 6
                                     2
Nucl : ACT AGA TGG ATA GAA GTC TAT CCA ATG CCT CAT CAA AAT GCA GAC : 675
Prot : Thr Arg Trp Ile Glu Val Tyr Pro Met Pro His Gln Asn Ala Asp : 21
Trsp : - - - Pro - Cys - - - - Asp Met Ser - Lys : 21

Nucl : TTC ATA GCA GAG AAA TTG GTT CAG GAA TTT ATA GCC AGA TAT GGA : 720
Prot : Phe Ile Ala Glu Lys Leu Val Gln Glu Phe Ile Ala Arg Tyr Gly : 36
Trsp : Thr Leu - - Thr Phe - Arg Asn Tyr - Pro - Phe - : 36

Nucl : GCA CCA CTG GAG ATC CAT ACT GAC CAG GGA AGG AAT TTT GAG AGT : 765
Prot : Ala Pro Leu Glu Ile His Thr Asp Gln Gly Arg Asn Phe Glu Ser : 51
Trsp : Cys - Ser Thr - Thr - - Arg - - Gln - Gln - : 51

Nucl : CAG TTA TTT GCA GAA GTT TGT AAA CTG CTA GAA ATC TCC AAG ATT : 810
Prot : Gln Leu Phe Ala Glu Val Cys Lys Leu Leu Glu Ile Ser Lys Ile : 66
Trsp : Lys - - Glu - Leu Thr - - - Gly Thr His His - : 66
                                     1
Nucl : AGG ACC ACA GCT TAT CAC CCA TCA TCA AAT GGA ATG ATA GAA AGA : 855
Prot : Arg Thr Thr Ala Tyr His Pro Ser Ser Asn Gly Met Ile Glu Arg : 81
Trsp : Lys - - - - - Gln - - - Val - - : 81
                                     3
Nucl : TTC AAC ATA ACA TTA GCT GGA ATG ATA AAA AGT ... .. : 888
Prot : Phe Asn Ile Thr Leu Ala Gly Met Ile Lys Ser ... .. : 96
Trsp : - His Arg His - Lys - Ala Leu - Ala Cys Glu Asp Asn : 96

Prot : ... .. : 111
Trsp : Thr His Trp Ile Ser Arg Leu Pro Leu Ile Leu Leu Gly Ile Arg : 111

Prot : ... .. : 126
Trsp : Val Ala Tyr Arg Asp Ala Leu Lys Gly Ala Pro Ala Glu Met Val : 126

Nucl : ... .. TTC ATT AAT TCA : 900
Prot : ... .. Phe Ile Asn Ser : 141
Trsp : Tyr Gly Glu Ser Leu Arg Leu Pro Ser Glu Val - Leu Pro - : 141

2
Nucl : AAA TGC AAA AAA ATG GGA TTT GTA ... .. TAT TTA TCT TCT TTT : 939
Prot : Lys Cys Lys Lys Met Gly Phe Val ... .. Tyr Leu Ser Ser Phe : 156
Trsp : Ala Ala - Ser Val Glu Asp - Pro Glu Phe Val Gln Asp - : 156

AB9-07-1000-R
Nucl : AGC AGC CTT TAG AAG TAG TCC ACA TCC GCA GCG A : 973
Prot : Ser Ser Leu End : 159
Trsp : Lys Lys Ala Leu Arg His Ile Asp Pro Cys Pro : 170
AB9-07

```

Figura 41. Secuencia consenso de 973 pb obtenida a partir de un individuo de Prince Edward Island, en la cual se indica el *primer* original de RAPD AB9-07, y los *primers* AB9-07-1000-F y AB9-07-1000-R. Las flechas continuas indican las repeticiones directas y las de puntos las inversas. Sombreado aparece la región correspondiente al posible ORF. A partir del nucleótido 613 se muestra la secuencia aminoacídica del transposón. Los guiones (-) son sitios que no varían con respecto a la secuencia aminoacídica del individuo de Prince Edward Island. Los puntos (.) representan *gaps*. Las *cursivas* indican homología positiva y las **negritas** indican homología idéntica. **Nucl:** Secuencia nucleotídica consenso de los tres clones del individuo de Prince Edward Island; **Prot:** Secuencia aminoacídica correspondiente; **Trsp:** Secuencia aminoacídica del transposón de *A. gambiae* alineada con la secuencia anterior.

A partir de esta secuencia consenso se diseñó una pareja de *primers* específicos, el AB9-07-1000-F (5'-AGG GTT ACA ACC AGA CAA C-3') y AB9-07-1000-R (5'-GAC TAC TTC TAA AGG CTG CT-3'), para contrastar las hibridaciones Southern Blot y Dot Blot llevadas a cabo en el apartado 2.2. Tras realizar la amplificación por PCR en 20 individuos de cada una de las poblaciones se observó que, al igual que en las hibridaciones Southern y Dot, sólo los individuos pertenecientes a la población control de Prince Edward Island mostraron un fragmento de ~1000 pb, mientras que en ninguno de los individuos pertenecientes a las tres poblaciones de *M. trossulus* se observó amplificación (**Figura 42**).

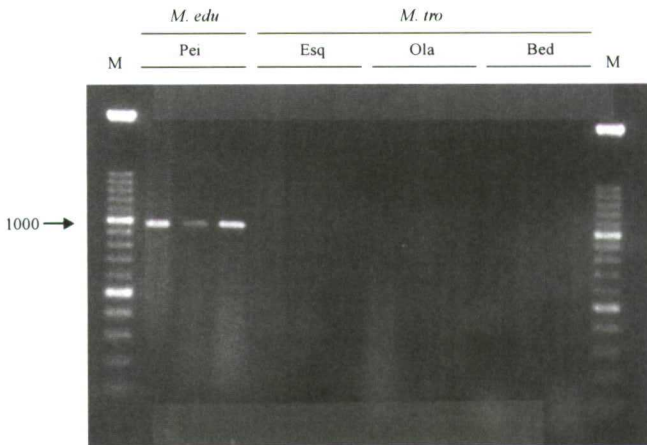


Figura 42. Marcadores SCARs en geles de agarosa al 1.5% obtenidos a partir de la amplificación con los *primers* AB9-07-1000-F y AB9-07-1000-R en diferentes individuos pertenecientes a distintas poblaciones de mejillón. **M. edu:** *M. edulis*; **M. tro:** *M. trossulus*; **Pei:** Prince Edward Island; **Esq:** Esquimalt Lagoon; **Ola:** Öland Island; **Bed:** Bedford Basin; **M:** Marcador de 100pb.

Finalmente, y como se describió anteriormente, el *locus* ABA-07-615 no fue considerado en este estudio puesto que el análisis de las secuencia de tres clones pertenecientes a distintos individuos representativos de alguna de las poblaciones, reveló la clara existencia de un fenómeno de comigración, aspecto que ya había sido determinado mediante la hibridación Southern Blot, de tal manera que, incluso tras realizar varias repeticiones, cada uno de los individuos analizados presentaba una secuencia diferente.

DISCUSIÓN

El género *Mytilus* engloba una serie de especies que muestran un complejo estatus taxonómico y constituyen un grupo de organismos de gran interés comercial. En el presente estudio se realiza un análisis de la variabilidad y estructura genética poblacional, mediante RAPDs, de diferentes mejillones distribuidos por todo el mundo. Este trabajo constituye el primer ensayo en el que se aborda el análisis de un elevado número de poblaciones de mejillón utilizando este tipo de marcador molecular.

1. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE *loci* RAPDs

Inicialmente se procedió a un análisis exhaustivo de todas y cada una de las condiciones para generar y seleccionar los *loci* RAPDs más adecuados para llevar a cabo, posteriormente, los análisis de variabilidad y estructura genética poblacional.

Así, el programa de PCR utilizado fue similar al descrito por Arribas *et al.* (1996) con algunas modificaciones, consistente en una primera fase de diez ciclos de baja astringencia, en lugar de cinco, y una segunda fase de treinta ciclos de alta astringencia, en vez de treinta y cinco. Se empleó una temperatura de *annealing* más elevada que el rango descrito en la bibliografía (entre 36°C y 42°C), obteniendo un menor número de fragmentos pero aumentando la intensidad y la reproducibilidad de los mismos. En cuanto a la elección de los *loci*, se ha seguido el criterio de polimorfismo de Lynch & Miligan (1994) para marcadores dominantes, si bien hay autores que tienen en cuenta también los fragmentos monomórficos para llevar a cabo un análisis cuantitativo de los patrones RAPDs (Aubert & Lightner, 2000; Callejas & Ochando, 2002). El número de *loci* seleccionados en este estudio es suficiente para analizar organismos muy relacionados y obtener estimadores de distancia entre ellos según lo descrito por dos Santos *et al.* (1994), Hallden *et al.* (1994) o Landry & Lapointe (1996). Del mismo modo, cumple el rango recomendado por distintos autores que sugieren que al menos 25 *loci*, en 20 a 30 individuos por población, son los adecuados para analizar la variabilidad genética y establecer filogenias a partir de frecuencias génicas (Nei, 1987; Aagard *et al.*, 1998; Gillies *et al.*, 1999).

Un aspecto a tener en cuenta al realizar estudios utilizando marcadores RAPDs, es la posible aparición de fenómenos de comigración. En este sentido, en el presente trabajo se realizaron, de acuerdo a las recomendaciones de Williams *et al.* (1990) y

Hadrys *et al.* (1992), hibridaciones Southern Blot y Dot Blot para verificar su presencia y en todo caso corregirlos si fuese necesario. Los resultados mostraron cinco *loci* comigrados: el ABA-02-850, ABA-05-975, ABA-07-615, AB9-07-1000 y AB9-07-325.

De los cinco *loci* descritos anteriormente, dos de ellos, el ABA-05-975 y el AB9-07-1000, manifestaron comigración en la población de Esquimalt Lagoon de *M. trossulus*. Para comprobar si este fenómeno se manifestaba en las otras dos poblaciones de *M. trossulus*, Bedford Basin y Öland Island, se realizó una hibridación Dot Blot, que reveló la presencia del *locus* ABA-05-975 en la población de Öland Island (**Figura 8**) si bien, a juzgar por la menor intensidad con respecto al ADN control del individuo de *M. galloprovincialis* de la Ría de Arousa, es probable que la homología de las secuencias fuese menor. Con respecto al *locus* AB9-07-1000, este no mostró señal de hibridación en ninguna población de *M. trossulus* (**Figura 11**), lo cual conllevó a considerarlo como ausente en dichas poblaciones.

Los *loci* ABA-02-850 y AB9-07-325 presentaron el fenómeno de comigración en la población de Point No Point de *M. californianus*. Teniendo en cuenta que esta especie es la más divergente de todas las que se analizan, tal y como se demostrará más adelante, y de la misma manera que ha sido descrito por numerosos autores (Geller *et al.*, 1994; Kenchington *et al.*, 1995; Hilbish *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2001; Martínez-Lage *et al.*, 2002), este resultado corrobora el hecho de que la probabilidad de que se origine comigración aumenta cuánto más lejanas taxonómicamente sean las muestras que se analicen (Hadrys *et al.*, 1992) y que los marcadores RAPDs sean más recomendables para analizar taxones muy próximos. No obstante, en este sentido determinados autores han sugerido la utilización de los RAPDs para comparar niveles taxonómicos más altos que el género (Millan *et al.*, 1996), incluso Landry & Lapointe (1996) proponen que se utilicen hasta el nivel de familia. A juzgar por los resultados obtenidos en este trabajo y teniendo en cuenta el elevado nivel de polimorfismo que generan, el nivel taxonómico máximo recomendable para inferir filogenias o realizar análisis de variabilidad y estructura genética mediante RAPDs en mejillón sería el de especie congénérica, de ahí que no se haya tenido en cuenta la especie *P. canaliculus* a la hora de llevar a cabo estos análisis. Si bien, sería necesaria la realización de hibridaciones Southern Blot para comprobar si alguno de los fragmentos seleccionados

hubiese comigrado, o bien, llevar a cabo la secuenciación de aquellos fragmentos que fuese necesario.

El *locus* ABA-07-615 fue retirado del análisis puesto que, para corroborar la presencia del fenómeno de comigración revelado por el Southern, se llevó a cabo la secuenciación de este fragmento a partir de distintos clones pertenecientes a individuos de diferentes poblaciones, obteniendo como resultado una secuencia distinta para cada caso.

Por otra parte, la hibridación Southern Blot reveló además la existencia de dos *loci* que presentaron el fenómeno contrario a la comigración, apareciendo en el gel con un peso molecular distinto: el ABA-07-400 y AB9-12-350 en la población de *M. chilensis* de Puerto Aguirre. Este aspecto corrobora lo expuesto por Aubert & Lightner (2000) en cuanto a la habilidad de los RAPDs para detectar mutaciones puntuales entre los sitios de inserción del *primer*, originando polimorfismos de longitud en los fragmentos amplificados.

Esta evaluación ha conducido a la identificación de 32 *loci* polimórficos para los estudios posteriores de variabilidad y estructura genética.

2. VARIABILIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

Una primera estima de la variabilidad generada por los RAPDs consistió en calcular el **porcentaje de *loci* polimórficos** por población. Así, los valores obtenidos oscilaron entre el 56% para la población de Prince Edward Island (*M. edulis*) y el 69% en las poblaciones de la Ría de Vigo (*M. galloprovincialis*) y la población de Öland Island (*M. trossulus*). En general, los valores obtenidos en este trabajo están dentro del rango de los calculados por Klinbunga *et al.* (2001) al analizar la variabilidad genética mediante RAPDs en diferentes especies de ostras de las costas de Tailandia. De manera global, el porcentaje de polimorfismo detectado mediante RAPDs en diferentes organismos es bastante elevado (Comes & Abbott, 2000; Freitas & Brehm, 2001), al igual que se observa en este análisis.

Este elevado nivel de polimorfismo que muestran los RAPDs puede ser debido a diferentes factores, entre los que se encuentran: su aptitud para detectar mutaciones puntuales (Aagaard *et al.*, 1995; Allegrucci *et al.*, 1995; Aubert & Lightner., 2000), la competencia existente entre los distintos productos de PCR, ya que el *primer* puede unirse a distintos sitios en todo el genoma (Heun & Helentjaris, 1993), y su habilidad para amplificar, no sólo regiones codificantes, sino también gran parte de regiones no codificantes de ADN, como se demuestra en este trabajo, que no están tan a expensas de las fuerzas selectivas, en las cuales las tasas de sustituciones nucleotídicas son de hasta dos veces las que se originan en regiones codificantes (Nei, 1987; Hadrys *et al.*, 1992; Tinker *et al.*, 1993; Moriyama & Powell, 1996; Rand, 1996); además, estas regiones no codificantes presentan elevadas proporciones de ADN repetitivo que albergan varias formas de mutaciones asociadas a replications y recombinaciones no mendelianas (Charlesworth *et al.*, 1994) y, como los RAPDs son amplificados, a veces, a partir de regiones de ADN repetitivo, podrían reflejar estas altas tasas de mutación (Williams *et al.*, 1990).

La variabilidad genética intrapoblacional es un factor de gran importancia para la posible adaptación a los cambios ambientales y consecuentemente para la supervivencia de la especie. En este sentido, los valores de **variabilidad genética intrapoblacional** fueron estimados mediante el índice de Shannon, reflejando un valor promedio de 0.349 (**Tabla 5**). Este resultado es ligeramente superior al reflejado por Li Ma *et al.* (2000) al realizar análisis de diversidad mediante RAPDs en varias poblaciones de *M. galloprovincialis* del Sur de California y al obtenido por de Wolf *et al.* (1998) cuando analizaron la variabilidad genética en diferentes poblaciones del molusco gasterópodo *Littorina striata*; aunque está dentro del rango observado en moluscos en base a datos alozímicos (Mardsen *et al.*, 1995). Así, analizando diferentes poblaciones de *M. galloprovincialis* del suroeste de Europa, Quesada *et al.* (1995) obtuvieron unos valores comprendidos entre 0.334 y 0.360.

Los resultados obtenidos pondrían de manifiesto dos aspectos: por un lado, la considerable proporción de variación intrapoblacional podría sugerir la existencia de un modelo de reproducción no endogámica en poblaciones con apareamiento al azar, para lo cual sería necesario mantener una elevada heterozigosidad intrapoblacional y mostrar una menor variación genética entre poblaciones dependiendo, asimismo, de la cantidad

de flujo genético y del aislamiento geográfico (Armbruster, 1997, 1998). Por otro lado, el empleo de alozimas y de RAPDs en el mejillón, generaría similares niveles de variabilidad, al igual que ha sido detectado por distintos autores al analizar la variación genética en diferentes organismos animales (de Wolf *et al.*, 1998) o vegetales (Peakall *et al.*, 1995; Aagaard *et al.*, 1998).

No obstante, estos resultados contrastarían con la opinión generalizada de que los valores de variabilidad genética obtenidos mediante RAPDs son mayores que los obtenidos mediante alozimas (Lou-Sun *et al.*, 1998; Cagigas *et al.*, 1999; Guadagnuolo *et al.*, 2001), debido al hecho de que los alozimas conforman una muestra poco representativa del genoma, además de estar sujetos a las fuerzas de la selección natural por tratarse de regiones codificantes, a diferencia de los RAPDs (Aagaard *et al.*, 1998; Heipel *et al.*, 1998; Lou-Sun *et al.*, 1998; Guadagnuolo *et al.*, 2001). Asimismo, el nivel de variabilidad intrapoblacional generado por los RAPDs y por otros tipos de marcadores basados en la amplificación por PCR, como los microsátélites o los ISSRs, muestra unos resultados similares (Raina *et al.*, 2001; Fernández *et al.*, 2002) y, en general, estos niveles son superiores a los registrados mediante marcadores basados en la generación de polimorfismos de restricción, como los RFLPs y AFLPs (Pejic *et al.*, 1998; Nocelli *et al.*, 1999). No obstante, Russel *et al.* (1997) y Garcia-Mas *et al.* (2000) encontraron una mayor variabilidad genética mediante AFLPs al analizar la variación genética en distintas especies vegetales.

Los valores de **distancia genética** calculados en base al índice de Nei (1978) revelaron que el intervalo que presentó la mayor frecuencia fue el comprendido entre 0.150 y 0.176 (**Figura 13**), siendo la población de Point No Point de *M. californianus* la que manifestó los valores más elevados (entre 0.298 y 0.410) con respecto al resto de poblaciones analizadas (**Tabla 6**). Este último aspecto apoyaría el hecho de que *M. californianus* sea considerada la especie más divergente, de acuerdo con lo descrito por otros autores (Geller *et al.*, 1994; Kenchington *et al.*, 1995; Hilbish *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2001; Martínez-Lage *et al.*, 2002).

Con respecto a las demás poblaciones, las que mostraron entre sí una mayor distancia genética fueron las pertenecientes a *M. edulis* ($D=0.109$), mientras que las poblaciones canadienses de *M. trossulus* fueron las que reflejaron un valor más bajo

($D=0.024$). Entre las poblaciones de *M. galloprovincialis*, la más distante fue la del Delta del Ebro, como ya había sido descrito por Sanjuan *et al.* (1994) y Quesada *et al.* (1995). La distancia obtenida entre la población del Delta del Ebro y las tres poblaciones gallegas fue de 0.063, ligeramente superior a la reflejada por Quesada *et al.* (1995) ($D=0.03$), e inferior a la obtenida por Sanjuan *et al.* (1997) ($D=0.13$) en base a datos alozímicos. Asimismo, estos resultados fueron muy similares a los obtenidos por Rodríguez (2001) empleando marcadores de ADN nuclear ($D=0.07$). Este valor de distancia podría estar relacionado con la existencia de la barrera geográfica del Mar de Almería-Orán (Quesada *et al.*, 1995; Sanjuan *et al.*, 1994, 1997). En base a la topología UPGMA realizada a partir de la matriz de distancias se observó, con un elevado índice de *bootstrap*, la separación de la población mediterránea de las atlánticas (**Figura 15**).

Comparando las distancias entre todas las especies objeto de estudio, el valor promedio obtenido ($D=0.192$) resultó ligeramente inferior al rango esperado ($D=0.228$) para las comparaciones entre subespecies de taxones de invertebrados descrito por Ferguson (1980). Al excluir a *M. californianus*, el valor promedio obtenido fue de $D=0.161$. No obstante, ambos valores estarían en consonancia con el rango comprendido entre 0.16 y 0.28 descrito por Skibinski *et al.* (1980), Grant & Cherry (1985) y Väinölä & Hvilson (1991) entre taxones de *Mytilus* aplicando métodos alozímicos. Así, en el presente estudio el valor más bajo, $D=0.067$, se obtuvo entre *M. trossulus* y *M. edulis*, de acuerdo con lo descrito por Wenne & Skibinski (1995) realizando análisis de restricción del ADN mitocondrial, y con lo descrito por Rodríguez (2001) mediante estudios de ADN nuclear en individuos del Mar Báltico. Sin embargo, no estaría de acuerdo con otros resultados obtenidos a partir de datos alozímicos (Bulnheim & Gosling, 1988; Väinölä & Hvilson, 1991), morfológicos (McDonald *et al.*, 1991) y de ADN nuclear (Beynon & Skibinski, 1996). Este valor de distancia entre *M. edulis* y *M. trossulus* podría estar relacionado con el hecho de que se haya demostrado la existencia de genes de *M. edulis* en la población de *M. trossulus* del Mar Báltico (Borsa *et al.*, 1999), o bien podría reflejar la existencia de individuos híbridos *M. edulis*-*M. trossulus* en la población de *M. edulis* de Isle of Man, del mismo modo que se han detectado individuos híbridos entre *M. edulis* del Mar del Norte y *M. trossulus* del Mar Báltico (Varvio *et al.*, 1988). En este sentido, Rodríguez *et al.* (2001) detectaron, en la población de Isle of Man, patrones de amplificación típicos de *M.*

trossulus al realizar análisis de la región no repetitiva de la proteína polifenólica adhesiva del biso.

En cuanto a la población de *M. chilensis* de Puerto Aguirre, los valores de distancia fueron, en general, más bajos con las poblaciones de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* que con las de *M. trossulus* y la de *M. californianus*, coincidiendo con lo expuesto por Gosling (1992). Este resultado podría corroborar el hecho de que *M. chilensis* contenga genes característicos, sobre todo de las poblaciones de *M. edulis*, aunque también de *M. galloprovincialis* del hemisferio Norte (McDonald *et al.*, 1991; Seed, 1992).

Al analizar la correlación entre las distancias genéticas y geográficas de las poblaciones de mejillón del Atlántico Norte se obtuvo un índice significativo ($r = 0.43$, $P < 0.021$), ligeramente superior al obtenido mediante marcadores microsatélites ($r = 0.42$, $P < 0.05$) en otros moluscos como *Haliotis rubra* (Huang *et al.*, 2000). No obstante, al excluir del análisis a las poblaciones americanas, el índice obtenido fue todavía mucho más significativo ($r = 0.78$, $P < 0.004$), lo cual podría sugerir la existencia de un modelo de aislamiento por distancia en las poblaciones europeas influenciado por la presencia de barreras genéticas a lo largo de la costa oeste de Europa, incluyendo la barrera oceanográfica del Mar de Almería-Orán (Quesada *et al.*, 1995; Sanjuan *et al.*, 1994, 1997), dando lugar a la formación de zonas mosaico, con un flujo genético restringido entre ellas (Bierne *et al.*, 2003). En definitiva, estos resultados permitirían indicar que existe un flujo genético restringido entre las poblaciones europeas de mejillón analizadas en este estudio.

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) es un método consistente en establecer diferentes estructuras jerárquicas para analizar la variación genética, generada por la diversidad haplotípica, en los distintos niveles de subdivisión (Excoffier *et al.*, 1992). En base a ello, se obtienen estimadores de los componentes de la varianza de los datos haplotípicos y análogos, a su vez, de los estadísticos $F(\Phi)$, sin tener en cuenta la heterocigosidad. Originariamente diseñado para analizar datos obtenidos a partir de RFLPs, los primeros autores que realizaron un análisis de la variabilidad genética mediante RAPDs empleando este método fueron Huff *et al.* (1993) en poblaciones naturales de la planta *Buchlœ dactyloides*. Desde entonces, existen en la literatura

numerosos trabajos que utilizaron este análisis para evaluar la estructura genética de las poblaciones (Peakall *et al.*, 1995; Paffetti *et al.*, 1996; Martinez & Pastene, 1999; Nesbo *et al.*, 1999; Song Ge *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Moya *et al.*, 2001), incluso en moluscos bivalvos, como *Pecten maximus* (Heipel *et al.*, 1998). En este sentido, el presente estudio es el primero que aplica este método para analizar la variabilidad genética originada por los RAPDs en diferentes taxones del género *Mytilus*.

Un indicio de la elevada variabilidad detectada es el hecho de que el número de individuos y haplotipos fue el mismo, es decir, cada individuo era genéticamente único, coincidiendo con lo obtenido por otros autores realizando estudios similares en otros moluscos bivalvos (Heipel *et al.*, 1998), moluscos gasterópodos (Huang *et al.*, 2000), bacterias (Paffetti *et al.*, 1996), plantas (Song Ge *et al.*, 1999), insectos (Moya *et al.*, 2001) o mamíferos (Cooper, 2000). Asimismo, en todas las agrupaciones realizadas en este trabajo se detectó un mayor grado de variación a nivel intrapoblacional, y una menor variación genética entre poblaciones, al igual que lo reflejado por otros autores al analizar la variabilidad genética en otras poblaciones de moluscos (Heipel *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2000) y otros organismos animales (Nesbo *et al.*, 1999; Cooper, 2000). Estos resultados estarían en consonancia con el elevado valor del estimador de diversidad de Shannon obtenido en este trabajo, lo cual indicaría una vez más la existencia de un modo de reproducción no endogámica en poblaciones con apareamiento al azar, según lo expuesto por Armbruster (1997, 1998).

Así, los resultados originados indicarían, en base a la clasificación de Wright (1969), la existencia de una estructura genética definida, con un valor global de $\Phi_{ST}=0.341$ ($P<0.001$). Este resultado está dentro del rango descrito por otros autores al analizar la diferenciación genética en poblaciones de plantas (Comes & Abbott, 2000), peces (Nesbo *et al.*, 1999) o mamíferos (Cooper, 2000). Si se estima este valor sin considerar a la población de *M. californianus* de Point No Point, especie congénérica de las demás y la más divergente, el resultado obtenido fue de $\Phi_{ST}=0.308$ reflejando, del mismo modo, una diferenciación genética clara entre las demás poblaciones. En este sentido, en el caso de Point No Point se apreció una diferenciación genética muy grande con respecto a las otras poblaciones, ya que sus índices de fijación con respecto a ellas mostraron unos valores superiores a 0.440, reflejando, una vez más, el grado de divergencia existente. Analizando la estructura a nivel intraespecífico, las tres

poblaciones de *M. edulis* (Yerseke, Isle of Man y Prince Edward Island) mostraron una diferenciación genética grande ($\Phi_{ST}=0.241$, $P<0.001$), mientras que las cuatro de *M. galloprovincialis* (Balcobo, Ría de Vigo, Ría de Arousa y Delta del Ebro), con un valor de $\Phi_{ST}=0.105$ ($P<0.001$), y las tres poblaciones de *M. trossulus* (Bedford Basin, Esquimalt Lagoon y Öland Island), con un índice de $\Phi_{ST}=0.140$ ($P<0.001$), reflejaron una diferenciación genética moderada. Al analizar dicha diferenciación genética a nivel de las tres poblaciones gallegas de *M. galloprovincialis* (Balcobo, Ría de Vigo y Ría de Arousa), el valor obtenido ($\Phi_{ST}=0.050$, $P<0.001$) podría reflejar la existencia de una estructura panmítica, con lo que sería más correcto denominarlas como localidades, en lugar de poblaciones.

En general, se puede indicar que el grado de diferenciación genética observado entre las poblaciones objeto de estudio fue superior a lo reflejado por otros autores analizando, mediante ensayos alozímicos, diferentes poblaciones de mejillón (Sanjuan *et al.*, 1990, 1994; Penney & Hart, 1999). Estas diferencias podrían ser explicadas en base a las limitaciones analíticas de los *loci* codificantes, más conservados evolutivamente y sujetos a los efectos del balance selectivo, lo cual tendería a infraestimar la variabilidad genética (Clegg, 1989; Karl & Avise, 1992; Peakall *et al.*, 1995). También es posible que estas diferencias sean el reflejo de las alteraciones genéticas no seleccionadas en secuencias sujetas a mecanismos tales como deleciones, amplificaciones o reordenaciones que son detectadas mediante RAPDs (Devos & Gale, 1992; Paran & Michelmore, 1993; N'Goran *et al.*, 1994).

Para evaluar el nivel de variación existente, la estructura poblacional también fue analizada en función del establecimiento de diferentes estructuras jerárquicas. Así, considerando como grupos distintos las cuatro poblaciones de *M. galloprovincialis*, las poblaciones de Yerseke, Isle of Man y Prince Edward Island de *M. edulis*, las tres poblaciones de *M. trossulus* y las poblaciones de Puerto Aguirre y Point No Point por separado, el porcentaje de variación obtenido entre estos cinco grupos (especies) fue del 26.32% (**Tabla 9**), el más elevado de todas las agrupaciones posibles. Sin embargo, al considerar la población de Puerto Aguirre como una población de *M. edulis*, esta variación disminuyó hasta un 23.19% (**Tabla 10**) y la variación entre poblaciones dentro de los grupos aumentó de 10.95% a 14.39%. Lo mismo sucedió al considerar a Puerto Aguirre como una población de *M. galloprovincialis*, obteniendo unos

porcentajes de variación muy similares. No obstante, al comparar la población de Puerto Aguirre con las de *M. edulis* el porcentaje de variación (15.93%) fue inferior al obtenido comparando la población de Puerto Aguirre con las de *M. galloprovincialis* (29.24%) (**Tabla 11**). Estos resultados podrían poner de manifiesto que la población de *M. chilensis* de Puerto Aguirre, aún conteniendo una serie de alelos característicos de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* del hemisferio Norte (McDonald *et al.*, 1991; Seed, 1992), manifestaría una identidad genética propia.

La posición ambigua de la población de Isle of Man reflejada en las diferentes topologías realizadas, originó que se llevase a cabo el análisis de otras estructuras jerárquicas. Así, los resultados obtenidos (**Tabla 12**) reflejaron que al considerar la población de Isle of Man como un grupo aparte de las otras poblaciones de *M. edulis*, la variación entre poblaciones dentro de los grupos era menor que si se consideraba a Isle of Man como población de *M. edulis*. Esto vendría reforzado por el valor de 24.11% de variación detectado entre las tres poblaciones de *M. edulis*, el cual es claramente superior al obtenido para las tres poblaciones de *M. trossulus* (13.95%) y para las cuatro poblaciones de *M. galloprovincialis* (10.54%). Posibles causas para explicar esta situación ambigua podrían ser el complejo sistema de corrientes que tiene lugar en el Mar de Irlanda, las cuales son altamente variables dependiendo de las condiciones climatológicas (Prestidge & Taylor, 1995), o bien que la población de Isle of Man esté constituida por híbridos *M. edulis*-*M. trossulus*, como consecuencia de la introducción de larvas en los tanques de lastrado de los barcos procedentes de Norte América y Este de Canadá al arribar a puertos importantes como Liverpool o Dublin, como ya ha sido descrito para otros moluscos bivalvos (Howlett, 1990). Este aspecto podría explicar la presencia de patrones de amplificación característicos de *M. trossulus* en la población de Isle of Man, obtenidos al analizar la región no repetitiva de la proteína polifenólica adhesiva del biso (Rodríguez *et al.*, 2001).

En cuanto a las poblaciones de *M. galloprovincialis*, el análisis de la varianza (**Tabla 13**) reflejó la ligera diferencia existente entre la población mediterránea y las atlánticas ya que, al considerar como un grupo aparte la población del Delta del Ebro, la variación entre poblaciones dentro de los grupos disminuyó desde un 10.54% a un 8.68%. Sin embargo, la diferenciación genética existente entre los dos grupos fue escasa ($\Phi_{CT}=0.033$, $P<0.001$)

Para evaluar la posible variación en función de la localización geográfica, se llevaron a cabo distintas agrupaciones (**Tabla 14**). Los resultados obtenidos mostraron los siguientes aspectos: el bajo porcentaje de variación (3.18%, $\Phi_{CT}=0.032$, $P<0.321$) entre las poblaciones europeas de *M. edulis* y la población sueca de *M. trossulus* vendría a demostrar la posición ambigua de la población de Isle of Man; la gran diferenciación genética (16.15%, $\Phi_{CT}=0.162$, $P<0.001$) obtenida al comparar las poblaciones gallegas con las poblaciones europeas de *M. edulis* estaría de acuerdo con lo expuesto en este trabajo al afirmar la existencia de una cierta correlación estadística entre las distancias genéticas y las distancias geográficas entre las poblaciones europeas, sugiriendo de nuevo la existencia de un modelo de aislamiento por distancia influenciado por presencia de barreras genéticas a lo largo de la costa oeste de Europa, como ya había sido descrito por Bierne *et al.* (2003); finalmente, al comparar las poblaciones atlánticas orientales y las occidentales, el porcentaje de variación obtenido (7.73%, $\Phi_{CT}=0.077$, $P<0.050$) revelaría la existencia de una estructura más taxonómica que geográfica, o bien una posible influencia humana en el establecimiento del flujo genético a ambos lados del océano Atlántico Norte.

Del mismo modo, se calcularon los valores de los índices F_{ST} de Weir & Cockerham (1984), adecuados para inferir estructuras poblacionales a partir de tamaños muestrales pequeños y desiguales (Apostol *et al.*, 1996) y para estimar patrones de flujo genético. A diferencia del índice Φ_{ST} , el F_{ST} tiene en cuenta la heterozigosis estimada a partir de las frecuencias alélicas. Así, para analizar la posible correlación existente entre ambos se utilizó el Test de correlación de Mantel, obteniendo un coeficiente extraordinariamente significativo de $r = 0.91$ ($P<0.001$). Asimismo, este índice manifestó una distribución similar (**Figura 14**) a la correspondiente al índice Φ_{ST} , siendo el rango comprendido entre 0.339 y 0.368 el que presentó una mayor frecuencia, mientras que para el índice Φ_{ST} lo fue el comprendido entre 0.320 y 0.345. Debido a esta elevada correlación detectada, se utilizó el F_{ST} para estimar los patrones de flujo genético.

La estimación del flujo genético es una herramienta muy útil de la genética poblacional para inferir las habilidades dispersivas de los organismos (Wright, 1978). Así, a partir de los valores de F_{ST} fue posible llevar a cabo la estimación del **número efectivo de migrantes por generación** (N_m) para inferir patrones de flujo genético

entre diferentes poblaciones de mejillón. Todos los valores calculados resultaron ser mayores que 1 lo cual indicaría que el flujo genético sería suficiente, en teoría, para evitar los efectos de la deriva genética (Slatkin, 1985b). De este modo, se observó un flujo genético restringido entre las poblaciones gallegas de *M. galloprovincialis* y las europeas de *M. edulis* ($N_m=3$, $F_{ST}=0.077$), reflejando la posible existencia de barreras genéticas que dificultarían en parte la migración de las larvas. El mayor valor de N_m ($N_m=7$, $F_{ST}=0.035$) se obtuvo al comparar las poblaciones orientales del Atlántico Norte con las occidentales. Este dato pondría de manifiesto la posibilidad de la influencia humana, la cual podría generar flujo genético hacia direcciones variadas y opuestas (Besnard *et al.*, 2001) conduciendo a la introgresión de genes de unos taxones en otros, fundamentalmente al introducir las larvas en zonas muy distantes geográficamente mediante el agua de lastrado de los barcos (Anderson *et al.*, 2002).

Entre las poblaciones de *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus* del Atlántico Norte se obtuvo el valor más bajo ($N_m=1.8$, $F_{ST}=0.120$), lo cual podría ser indicativo de que cada una de estas especies o taxones mantienen una identidad genética propia incluso a lo largo de grandes distancias, como ya había sido descrito por otros autores en base a datos alozímicos (Koehn, 1991; McDonald *et al.*, 1991). También se observó un flujo genético restringido entre las poblaciones europeas de *M. edulis* (Yerseke e Isle of Man) y la población de *M. trossulus* de Öland Island con un valor de $N_m=2.5$ ($F_{ST}=0.091$). Finalmente, el flujo genético detectado entre las poblaciones gallegas y la del Delta del Ebro resultó ser de $N_m=4.2$ ($F_{ST}=0.056$). En cualquier caso, estos valores contrastan con los obtenidos por otros autores al estimar el número efectivo de migrantes por generación para inferir patrones de flujo genético en mejillón. Así, Slatkin (1985a) obtuvo un valor de $N_m=42.0$ al analizar poblaciones naturales de *M. edulis*, y Quesada *et al.* (1995) obtuvieron valores comprendidos entre 35.5 y 41.4 analizando poblaciones de *M. galloprovincialis* de la Península Ibérica. No obstante, este valor disminuyó hasta 8.4, ligeramente superior al obtenido en este trabajo, al comparar veintiuna poblaciones a un lado y a otro de la barrera oceanográfica de Almería-Orán. Esto hecho podría indicar que la existencia de barreras oceanográficas y genéticas excluiría una posible hipótesis de rutas migratorias en el mejillón, sin embargo las relaciones genéticas de las poblaciones se pueden explicar fácilmente si se asume que la migración es más consistente durante el estadio larvario y mayoritariamente mediada por la corriente. Así, similares transportes mediados por las

corrientes han sido postulados para otros invertebrados bentónicos marinos con estado de larva planctónica (Scheltema, 1986; Palumbi, 1994).

No obstante, los valores de estas estimas de flujo genético debe tomarse con precaución debido, entre otros factores, a que los métodos indirectos de estimación de N_m reflejan la media histórica de flujo genético que es necesario para generar el patrón de diferenciación observado entre poblaciones, y este hecho sobrestima generalmente el flujo genético real (Slatkin, 1985b). Sin embargo, numerosos autores han estimado el número de migrantes efectivos por generación para inferir patrones de flujo genético a partir de valores de F_{ST} con datos obtenidos mediante RAPDs en moluscos gasterópodos (de Wolf *et al.*, 1998), insectos (Apostol *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 2000) o peces (Mamura *et al.*, 1999).

La **topología** obtenida, tanto UPGMA como Neighbor-Joining (**Figura 15**), a partir de la matriz de distancias de Nei (1978) reflejó la agrupación en un *cluster* de las poblaciones de *M. galloprovincialis*, en otro *cluster* se englobaron las poblaciones de *M. trossulus* y *M. edulis*, en cuyo caso aparecerían Yerseke y Prince Edward Island como poblaciones puras de *M. edulis*, y compartiendo otro *cluster* se agruparon las poblaciones de *M. chilensis* de Puerto Aguirre y *M. californianus* de Point No Point. La población de Isle of Man apareció, a su vez, agrupada con las poblaciones de *M. trossulus*. En cuanto a las topologías obtenidas a partir de la matriz de Φ_{ST} de Cockerham (1973) referente a datos haplotípicos se han encontrado diferencias en función del método utilizado, UPGMA o Neighbor-Joining. Del mismo modo, ambos métodos originaron topologías en cierto modo diferentes al árbol originado a partir de la matriz de distancias de Nei (1978). Así, la topología UPGMA (**Figura 16**) agrupó la población de *M. chilensis* de Puerto Aguirre con las poblaciones de *M. galloprovincialis*, de acuerdo con lo obtenido por Rodríguez (2001), aunque con un valor de *bootstrap* ligeramente bajo. Además, al contrario que lo reflejado en la topología derivada de la matriz de Nei (1978), la población de Isle of Man apareció agrupada con las poblaciones de *M. edulis* y estas, a su vez, aparecieron más relacionadas con *M. galloprovincialis* que con las de *M. trossulus*, al igual que lo reflejado mediante el método Neighbor Joining (**Figura 17**), y de acuerdo con lo descrito por numerosos autores utilizando métodos alozímicos (Koehn *et al.*, 1984; McDonald *et al.*, 1991), morfométricos (McDonald *et al.*, 1991) o mediante marcadores

de ADN mitocondrial (Geller *et al.*, 1993; Rawson & Hilbish, 1995) o nuclear (Rodríguez, 2001). Asimismo, en esta última topología (**Figura 17**), la población de Isle of Man apareció nuevamente agrupada con las poblaciones de *M. trossulus*, mientras que la población de Puerto Aguire se agrupó en otro *cluster* con *M. californianus* de Point No Point.

En general, todas las topologías generadas en este estudio mostraron la población de *M. californianus* de Point No Point como la más divergente y, a diferencia de otros autores utilizando marcadores de ADN nuclear amplificado por PCR (Rodríguez, 2001), la población de *M. trossulus* de Öland Island apareció agrupada con las poblaciones canadienses de *M. trossulus*, de acuerdo con lo descrito por Bulnheim & Gosling (1988). La población de *M. edulis* de Isle of Man mostró su posición ambigua al agruparse tanto con las poblaciones de *M. edulis* como con las de *M. trossulus*. Asimismo, tampoco se detectó en ningún caso una agrupación en función de la proximidad geográfica de manera estricta, sino más bien una clasificación en función de sus similitudes genéticas y/o haplotípicas, de acuerdo con lo reflejado con los índices de fijación y con los distintos análisis de la varianza molecular realizados (**Tabla 14**).

Las relaciones multidimensionales entre los individuos fueron examinadas realizando el **análisis de los componentes principales** a partir de los haplotipos generados mediante RAPDs. Este método fue ampliamente utilizado por distintos autores que analizaron la estructura genética de poblaciones mediante RAPDs en moluscos gasterópodos (Huang *et al.*, 2000), ballenas (Martinez & Pastene, 1999), plantas (Comes & Abbott, 2000; Semagn *et al.*, 2000; Freitas & Brehm, 2001) o peces (Callejas & Ochando, 2002). Del mismo modo, también fue empleado para analizar la estructura genética de poblaciones de mejillón a partir de datos alozímicos (Varvio *et al.*, 1988; McDonald *et al.*, 1991) y polimorfismos de longitud amplificados por PCR (Daguin *et al.*, 2001; Bierne *et al.*, 2003).

En el primer análisis (**Figura 18**) se tuvieron en cuenta los 342 individuos pertenecientes a doce poblaciones (excluyendo a la de Golden Bay y a las dos de la Bahía de Otsuchi), en el cual se reflejaron dos grupos claramente diferenciados por los dos primeros componentes: por un lado la población de *M. californianus* de Point No Point y, más alejada en el componente 1 y a lo largo del componente 2, el resto de

poblaciones de *Mytilus*. En este sentido, y siguiendo una interpretación de la gráfica similar a la descrita por Bierne *et al.*, (2003), en esta distribución aparecerían agrupados los taxones pertenecientes al “complejo *M. edulis*”, cuyas diferencias entre ellos vendrían reflejadas a lo largo del eje Y correspondiente al componente 2, y por otro lado la especie *M. californianus*, claramente diferente del grupo anterior.

Un segundo análisis (**Figura 19**) consistió en excluir a los individuos pertenecientes a la población de Point No Point. Los resultados obtenidos mostraron una distribución muy similar a la reflejada por McDonald *et al.* (1991), en los cuales se observaron tres grupos: las poblaciones de *M. galloprovincialis* y las de *M. edulis* a lo largo del componente 2, y las poblaciones de *M. trossulus* más alejadas a lo largo del componente 1. Asimismo, se apreció una vez más la distribución dispersa de la población de Isle of Man, entre las poblaciones de *M. edulis* y *M. trossulus*, y una situación similar para la población de Puerto Aguirre entre las poblaciones de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. En este sentido, el análisis de componentes principales para las poblaciones de *M. edulis* y la de Puerto Aguirre (**Figura 20a**) mostró dos grupos diferenciados, pudiéndose observar a la población chilena separada de las demás poblaciones de *M. edulis*. En el análisis entre poblaciones de *M. edulis* y *M. trossulus* (**Figura 20b**), se observó la mencionada distribución ambigua de la población de Isle of Man.

El análisis de los componentes principales a partir de las frecuencias alélicas para cada una de las poblaciones analizadas (**Figura 21**), similar al descrito por Varvio *et al.* (1988) y Daguin *et al.* (2001), fue realizado para observar la distribución de las agrupaciones de un modo más esquemático. En este sentido, la distribución obtenida fue similar a la reflejada, en conjunto, en las topologías generadas en este trabajo, apareciendo la población de Isle of Man en una posición ambigua entre las poblaciones de *M. trossulus* y las poblaciones de *M. edulis*. Del mismo modo, se observó a la población del Delta del Ebro ligeramente separada de las tres poblaciones gallegas de *M. galloprovincialis*. La posición de la población de *M. chilensis* de Puerto Aguirre, intermedia entre las poblaciones de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, estaría en concordancia con lo obtenido mediante el análisis UPGMA realizado a partir de los valores de Φ_{ST} , lo cual pondría de nuevo de manifiesto la posible presencia de alelos característicos de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* del hemisferio Norte en la población

chilena, según lo descrito por McDonald *et al.* (1991) y Seed (1992), apoyando la hipótesis postulada por Hilbish *et al.* (2000) según la cual habría tenido lugar una colonización, a través del océano Atlántico, desde el hemisferio Norte al hemisferio Sur durante el Pleistoceno. Por otro lado, su localización ligeramente desplazada a lo largo del componente 1 reflejaría el mantenimiento de una identidad genética propia.

En general, y a la vista de los resultados obtenidos, se corrobora que la amplificación y posterior digestión de la región ITS, descrita por Heath *et al.* (1995), es un método fiable, ya que no se detectó la existencia de híbridos *M. edulis*-*M. trossulus* en las poblaciones de la costa atlántica canadiense analizadas en este trabajo.

En este estudio también se llevó a cabo un análisis preliminar mediante componentes principales de las dos especies, *M. galloprovincialis* y *M. coruscus*, de la Bahía de Otsuchi, en Japón. Los resultados obtenidos (**Figuras 25 y 26**) mostraron la presencia en ambas especies de *loci* RAPDs más característicos de la población de Point No Point de *M. californianus*. No obstante, estos resultados preliminares deben ser tomados con precaución ya que, debido al escaso número de individuos analizados, sólo se han tenido en cuenta los 32 *loci* que habían sido previamente seleccionados. Así, en un primer análisis (**Figura 27**) incluyendo a la totalidad de los individuos (N=363), se observaron nuevamente dos grupos claramente diferenciados: por un lado los individuos pertenecientes a las especies japonesas y a la población de Point No Point indiferenciados unos de otros y, en otro conjunto los correspondientes al resto de poblaciones del género *Mytilus*. En un segundo análisis (**Figura 28**) sólo se tuvieron en cuenta las poblaciones de *M. galloprovincialis* y las poblaciones de *M. coruscus* y *M. californianus*. Así, en la gráfica se observó la presencia de tres grupos separados: a lo largo del componente 2 aparecieron las especies japonesas y la de Point No Point y más alejada en el componente 1 aparecieron las poblaciones de *M. galloprovincialis* de la Península Ibérica. Estos resultados reflejan una relación más estrecha entre las especies japonesas y la población de Point No Point que aquéllas, en concreto la población de *M. galloprovincialis*, con las poblaciones de *M. galloprovincialis* de la Península Ibérica, no reflejándose una relación clara entre *M. galloprovincialis* de la Bahía de Otsuchi y las poblaciones de la Península Ibérica como resultado de una posible introducción accidental en Japón, según lo descrito por Wilkins *et al.* (1983). En el caso de *M. coruscus*, aunque Vermeij (1989) había sugerido que podría tratarse de la misma

especie que *M. californianus* pero con variación geográfica en la prominencia de sus nerviaciones, los resultados obtenidos sugerirían que se tratan de especies diferentes, de acuerdo con lo afirmado por Milyutina & Petrov (1989).

La diferenciación entre ambas especies de Japón no ha podido determinarse, ni a nivel descriptivo de los *loci* amplificados, ni a nivel de la representación espacial de los individuos en función de sus haplotipos (componentes principales). No obstante, realizando la amplificación en un mayor número de individuos y utilizando en el análisis los posibles *loci* amplificados en individuos de ambas especies, sería más probable encontrar un marcador que permitiese diferenciarlas o, en su defecto, se podría analizar la posible variabilidad genética existente entre ellas.

3. ENSAYO PRELIMINAR DE LA HERENCIA MENDELIANA

A pesar de que una de las premisas adoptadas al llevar a cabo el análisis de la estructura poblacional mediante RAPDs consistió en considerar a estos marcadores como caracteres que se heredan de manera mendeliana (Apostol *et al.*, 1996), se realizó un ensayo para comprobar este tipo de herencia en *M. galloprovincialis*. Hasta la fecha, han sido numerosos los autores que han llevado a cabo este tipo de análisis, demostrando la herencia mendeliana de los RAPDs en plantas (Williams *et al.*, 1990), peces (Stott *et al.*, 1997; Appleyard & Mather, 2000) o abejas (Tavares *et al.*, 2000). No obstante, también existen referencias que ponen de manifiesto la presencia de bandas no parentales en la descendencia a partir de cruzamientos entre plantas (Carlson *et al.*, 1991; Reiter *et al.*, 1992) o abejas (Hunt & Page, 1992).

Tras comparar los patrones obtenidos en los padres (**Figuras 22 y 23**) con los amplificados por cada uno de los doce individuos de la descendencia, se observaron dos bandas no parentales (**Figura 24**). No obstante, estos fragmentos habían sido visualizados con anterioridad en algunos individuos de la población de Balcobo al llevar a cabo el análisis inicial pero no eran reproducibles, con lo que no se tuvieron en cuenta. Por lo tanto, si se restringe la comparación de fragmentos a aquellos que cumplan con el criterio de reproducibilidad, se podría afirmar que en *M. galloprovincialis* los *loci* RAPDs siguen un patrón de herencia mendeliano, similar al descrito en otros moluscos bivalvos (Patwary *et al.*, 1994).

Posibles explicaciones para la presencia de bandas no parentales han sido aportadas por distintos autores, así Riedy *et al.* (1992), los cuales fueron los primeros en descubrir este tipo de bandas en los RAPDs, aportaron distintas causas, entre las que se encuentran: mutaciones genómicas en un elevado porcentaje, contaminación de las muestras por los agentes de reacción, *slippage* de la Taq polimerasa durante la replicación o amplificación de recombinantes *in vitro*. Por otra parte, una explicación muy extendida para explicar la presencia de bandas no parentales en la descendencia es la formación de moléculas de heterodúplex entre dos secuencias alélicas de diferente tamaño (Hunt & Page, 1992; Scott *et al.*, 1992; Ayliffe *et al.*, 1994; Elo *et al.*, 1997). No obstante, todos estos autores coinciden en afirmar que la formación de bandas no parentales en los RAPDs es poco frecuente, principalmente debido al carácter dominante de estos marcadores moleculares (Willimas *et al.*, 1990). Por su parte, Garcia & Benzie (1995) detectaron una banda no parental en casi toda una generación de *Pernaemonax monodon*, según ellos derivada de algún tipo de contaminación bacteriana o algal de la muestra.

Durante el análisis preliminar de la heredabilidad de los RAPDs, se observó la amplificación de un posible fragmento sexo-específico, presente en los individuos macho de la población parental de Balcobo y ausente en las hembras. Si bien, en este sentido diversos autores consideran los RAPDs como una herramienta adecuada para identificar el sexo en diferentes organismos (Hadrys *et al.*, 1992; Lessells & Mateman, 1998; Urasaki *et al.*, 2002), lo cual consideran esencial para llevar a cabo estudios de ecología poblacional y evolutiva.

Por otra parte, en el presente estudio los marcadores RAPDs fueron generados a partir de ADN nuclear, corroborando lo que ya había sido descrito por Hadrys *et al.* (1992). Si bien, Aagaard *et al.* (1995) detectaron fragmentos de origen mitocondrial en algunos patrones RAPDs de coníferas.

4. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

El objetivo principal al llevar a cabo el análisis de secuencias de determinados fragmentos RAPDs fue diseñar marcadores SCARs para tratar de diferenciar poblaciones y/o especies de mejillón. Así, de los ocho fragmentos que fueron clonados

y secuenciados, cuatro fueron candidatos a marcadores SCARs, de los cuales tan sólo uno, el correspondiente al *locus* ABA-02-580, ha resultado útil para llevar a cabo la identificación de determinadas especies de mejillón desde el punto de vista comercial. Por otra parte, en todos los fragmentos secuenciados se determinaron sus características y se buscaron posibles homologías en las bases de datos nucleotídicas y aminoacídicas.

En general, todas las secuencias analizadas presentaron un porcentaje de Adenina-Timina superior al 50%, a excepción del *locus* AB9-06-850, con un valor ligeramente inferior. Además, y relacionado con las elevadas proporciones de ADN repetitivo que presentan las regiones no codificantes que pueden ser amplificadas mediante RAPDs (Williams *et al.*, 1990; Charlesworth *et al.*, 1994), también fueron detectadas un elevado número de repeticiones directas, las cuales se cree que son generadas mediante la duplicación de sitios diana durante la inserción de elementos transponibles (Kleckner, 1981), e inversas, las cuales parecen intervenir tanto en procesos de amplificación del ADN (Oshima *et al.*, 1992) como en procesos de formación de estructuras secundarias (Bianchi *et al.*, 1989).

En algunos casos se observaron secuencias de mayor o menor semejanza con las cajas A y B, que constituyen el promotor interno partido de los genes para el ARNt. El grado de homología encontrado fue superior al 75% en todos los casos, aunque superior con la caja A. Del mismo modo, el fragmento AB9-06-700 también presentó cierta homología (53%) con la caja C, o promotor interno del ARNr 5S. Por otro lado, la separación entre los tramos de secuencias homólogas a dichas cajas observados en las dos secuencias que contenían ambos pares de cajas está dentro del rango descrito por Singer & Berg (1991), de entre 25 y 60 pb, para la secuencia que contiene las cajas A y C (AB9-06-700), y fue ligeramente mayor en la secuencia que contiene las cajas A y B (ABA-07-400). Estos hechos podrían ser un indicativo del posible origen como pseudogenes de estas secuencias.

La secuenciación del *locus* ABA-02-580 dio lugar a una secuencia de 592 pb (Nº Acceso Genbank AJ315480), a partir de la cual se desarrolló un marcador SCAR, mediante el diseño de *primers* específicos, que permitió la diferenciación de *stocks* de poblaciones de *M. galloprovincialis*, gracias a la amplificación de un fragmento de

555pb obtenido en la totalidad de individuos analizados de esta especie, lo cual es especialmente importante desde el punto de vista comercial.

Al llevar a cabo la búsqueda de homologías para el *locus* AB9-06-850, se detectó que ese fragmento estaba constituido por parte de la familia génica del ADNr, poniendo de manifiesto la aptitud de los RAPDs para amplificar también regiones codificantes. Como consecuencia, se llevó a cabo el análisis comparativo de las secuencias completas correspondientes a la región 5.8S. Además, también se llevó a cabo un análisis comparativo de la secuencia consenso, no codificante, del *locus* AB9-06-700 en distintas poblaciones del presente estudio debido a la elevada frecuencia con la que este fragmento aparecía en cada una de ellas y por su elevado número de repeticiones, tanto directas como inversas.

La familia génica del ADNr es atractiva para la reconstrucción de filogenias debido a su elevado número de copias, universalidad y a las distintas tasas de evolución dentro y entre los componentes de la unidad de repetición y espaciadores (Baldwin, 1994). En concreto, los dos espaciadores, ITS1 e ITS2, han evolucionado más rápidamente que las regiones codificantes que los flanquean y, por ello, son adecuadas para la comparación de taxones próximamente relacionados (Shen *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2002). La región 5.8S, debido a su condición de región codificante, presenta un grado de variación más conservada que la región espaciadora ITS1, lo cual le confiere una especial aptitud para evaluar relaciones filogenéticas entre especies que divergieron después del Paleozoico. Así, en el presente trabajo, se analizaron las relaciones filogenéticas entre siete especies pertenecientes a la clase Bivalvia, incluidas las dos especies pertenecientes a este estudio, y una especie *outgroup* perteneciente a la clase Oomycetes. Los valores de distancia de Kimura y la relación transiciones/transversiones (**Tabla 16**) indicaron que la especie más divergente fue *T. crocea*, como así se reflejó también en el árbol filogenético de máxima parsimonia. Además, en el *cluster* que agrupa a las especies Pteriomorpha también se localiza la Heterodonta *M. sallei* (**Figura 36**).

Finalmente, el análisis comparativo de las secuencias del *locus* AB9-06-700 en individuos pertenecientes a distintas poblaciones tratadas en este trabajo (**Tabla 17**) reveló que los coeficientes Ts/Tv a nivel intraespecífico fueron superiores a los

obtenidos a nivel interespecífico. En base a los valores de distancia de Kimura estimados, las poblaciones pertenecientes a *M. trossulus* fueron las que mostraron un índice mayor con respecto al resto. La topología obtenida mediante máxima parsimonia (**Figura 39**), reflejó un *cluster* agrupando las tres poblaciones de *M. trossulus* y otro *cluster* englobando a las poblaciones de *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. chilensis*, coincidiendo con la topología UPGMA generada a partir de los valores de Φ_{ST} de Cockerham (1973) realizada en el presente estudio (**Figura 16**), así como con la agrupación obtenida al realizar el análisis de componentes principales (**Figura 21**), y de acuerdo con lo descrito por otros autores mediante secuencias de ADN satélite tipo III (Rodríguez, 2001). Por otra parte, se observó una ligera correlación estadística, $r = 0.35$ ($p < 0.08$), entre la matriz de distancias en base al modelo de Kimura 2 parámetros y la matriz de distancias de Nei (1978) para las mismas poblaciones analizadas mediante RAPDs.

El hecho de que *M. trossulus* sea la especie más divergente del complejo *M. edulis* estaría en consonancia con los valores más bajos de los coeficientes T_s/T_v que son detectados (**Tabla 17**) cuando aumenta el tiempo de divergencia entre secuencias, ya que valores cercanos a 0.4-0.5 son indicativos de secuencias cuyos niveles de sustitución están muy saturados (Holmquist, 1983; Nei, 1987).

5. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES O POBLACIONES MEDIANTE RAPDs

Hasta la fecha han sido empleados diferentes métodos para llevar a cabo la identificación de especies de mejillón, tales como el análisis del ADN mitocondrial (Skibinski, 1985; Carlton & Geller, 1993; Geller *et al.*, 1994), RFLPs de los *loci* ribosomales 18S-5.8S-28S (Heath *et al.*, 1995) o amplificaciones por PCR de fragmentos de ADN nuclear (Inoue *et al.*, 1995; Rawson *et al.*, 1996). Debido al elevado interés comercial de las especies de mejillón pertenecientes al género *Mytilus* y a la amplia expansión que está teniendo la producción de *P. canaliculus*, en el presente trabajo se ha descrito un método que permite diferenciar la especie neozelandesa de otras especies de mejillón de interés comercial. Esto evitaría la comercialización bajo la denominación de mejillón *M. galloprovincialis* o *M. edulis* de un producto que realmente sería *P. canaliculus*.

La amplificación mediante los *primers* 580-1F y 580-1R originaría un fragmento de 555 pb, el cual permitiría diferenciar *stocks* de *M. galloprovincialis* de otras especies de mejillón. Aquellos individuos que no presentasen dicho fragmento, serían amplificados con el *primer* ABA-07 y si originasen un patrón de bandas comprendido entre ~700 pb y 800 pb, estos mejillones serían identificados como *P. canaliculus*. Esta especie, endémica de Nueva Zelanda, es la más cultivada del género *Perna*, dentro de la familia Mytilidae, y su producción en acuicultura ha crecido extraordinariamente rápido en los últimos 20 años. No obstante, aunque ha sido objeto de una amplia investigación, mucha de esta información no ha sido publicada (Jeffs *et al.*, 1999). Algunos de los estudios llevados a cabo analizaron, mediante alozimas, la estructura genética de diferentes poblaciones distribuidas por Nueva Zelanda no encontrando apenas ningún tipo de diferenciación genética (Apte & Gardner, 2001). Sin embargo, estos mismos autores, realizando un análisis SSCP (Single Strain Conformation Polymorphism) de la región NADH IV del ADN mitocondrial, sí detectaron una intensa subdivisión genética poblacional Norte-Sur de poblaciones pertenecientes a esta especie (Apte & Gardner, 2002). Esta diferenciación genética fue posteriormente corroborada al analizar mediante RAPDs diferentes poblaciones del Norte y el Sur de Nueva Zelanda (Star *et al.*, 2003).

Por otra parte, amplificando con el *primer* ABA-10 los ejemplares que no hubiesen presentado el fragmento de 555 pb, sería posible diferenciar *stocks* de individuos de la población de Puerto Aguirre si dicha amplificación da lugar, en todos los individuos, a la presencia del fragmento de 580 pb y a la ausencia del fragmento de 500 pb, además de la presencia del fragmento de 700 pb en aproximadamente el 50% de la muestra.

Mediante la amplificación de los *loci* ABA-05-390 y AB9-06-300 se podría identificar la población de *M. californianus* de Point No Point, además de por la presencia de nerviaciones radiales presentes en su concha (Soot-Ryen, 1955). Asimismo, los individuos de la localidad japonesa de la Bahía de Otsuchi podrían ser fácilmente diferenciados del resto de poblaciones analizadas ya que amplifican el *locus* ABA-05-390, al igual que la población de Point No Point, pero se diferenciarían de ésta en la amplificación de los *loci* ABA-05-975 y ABA-05-465. No obstante, no se ha detectado ningún marcador que permitiera diferenciar inequívocamente las dos especies que cohabitan en dicha bahía, *M. galloprovincialis* y *M. coruscus*.

Finalmente, mediante la amplificación del *locus* ABA-10-1400 sería posible identificar la especie *M. trossulus*, puesto que este *locus* no es amplificado en ninguna otra especie; no obstante, teniendo en cuenta que no es un *locus* diagnóstico, sería necesario amplificar un elevado *stock* de individuos para asegurar la clasificación. En este caso, sería posible identificar la población de Öland Island, en aquellos individuos que presentasen dicho *locus*, mediante una hibridación Dot Blot, como la descrita en el apartado 2.2, positiva para el fragmento de 975 pb. Si bien, este último apartado sería más complicado debido a la escasa frecuencia con la que dicho fragmento aparece en la población de Öland Island.

CONCLUSIONES

1. Se han seleccionado, en base a criterios de calidad en la amplificación, reproducibilidad, nivel de polimorfismo y ausencia de comigración, un total de 32 *loci* RAPDs, generados a partir de siete *primers*.
2. El origen de los fragmentos RAPDs en el mejillón se corresponde con ADN nuclear, y se transmiten a la descendencia de forma mendeliana.
3. El valor del índice de diversidad de Shannon (0.349) reveló la existencia de un elevado grado de variabilidad genética intrapoblacional.
4. La población que mostró los valores de distancia de Nei más elevados fue la de Point No Point (*M. californianus*). Las poblaciones más distantes genéticamente fueron Point No Point (*M. californianus*) y Balcobo (*M. galloprovincialis*), siendo las menos distantes las dos poblaciones canadienses de *M. trossulus* (Bedford Basin y Esquimalt Lagoon). Asimismo, se ha detectado una correlación positiva entre las distancias genéticas y geográficas a nivel de las poblaciones europeas, sugiriendo la existencia de un modelo de aislamiento por distancia.
5. Las topologías UPGMA y Neighbor Joining derivadas del índice de Nei y del índice de fijación F_{ST} agruparon en un mismo *cluster* a las poblaciones de *M. edulis* y *M. trossulus*, mientras que las derivadas del índice Φ_{ST} agruparon juntas a las poblaciones de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. En todos los casos la población de *M. californianus* de Point No Point se mostró como la más divergente.
6. Los análisis de la varianza molecular y componentes principales reflejaron los siguientes aspectos:
 - La existencia de una estructura genética definida ($\Phi_{ST}=0.341$), desde un punto de vista taxonómico más que geográfico.
 - La elevada variación a nivel intrapoblacional.
 - Las tres poblaciones pertenecientes a *M. edulis* presentaron una gran diferenciación genética entre sí, mientras que las poblaciones de *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* presentaron una diferenciación genética moderada.

- Las tres poblaciones gallegas de *M. galloprovincialis* presentaron una estructura panmítica.
 - La población de Isle of Man apareció en una posición ambigua entre las poblaciones de *M. trossulus* y las de *M. edulis*, indicando la posible presencia de híbridos en esa población.
 - La población de *M. chilensis* de Puerto Aguirre podría presentar alelos característicos de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* del hemisferio Norte, pero manteniendo una identidad genética propia.
 - El análisis preliminar de los mejillones de la población japonesa de la Bahía de Otsuchi (*M. galloprovincialis* y *M. coruscus*) indicó una mayor proximidad a *M. californianus* que a cualquier otra forma del “complejo *M. edulis*”.
7. El estimador del número efectivo de migrantes por generación reveló:
- La existencia de un flujo genético restringido entre las poblaciones europeas de mejillón, apoyando la idea de un modelo de aislamiento por distancia.
 - La posible influencia humana en el establecimiento del flujo genético a ambos lados del Atlántico.
 - Cada una de las especies del “complejo *M. edulis*” mantiene una identidad genética característica incluso a lo largo de grandes distancias.
8. La caracterización de las secuencias correspondientes a distintos fragmentos RAPDs seleccionados mostró que:
- Mediante RAPDs es posible amplificar regiones codificantes, como el *locus* AB9-06-850, y no codificantes, como el *locus* AB9-06-700, lo cual permite desarrollar otros tipos de análisis filogenéticos a partir de estas secuencias.
 - El contenido en A-T fue superior al 50% en todas las secuencias, excepto en la correspondiente al *locus* codificante AB9-06-850. Asimismo, todas las secuencias analizadas mostraron un elevado número de repeticiones directas e inversas.

- La topología Neighbor-Joining y de máxima parsimonia obtenida a partir del análisis filogenético de la secuencia del *locus* AB9-06-700 agrupó en un *cluster* a las tres poblaciones de *M. trossulus* y, en otro *cluster* a poblaciones de *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y a la población de *M. chilensis* de Puerto Aguirre, coincidiendo con la topología UPGMA obtenida a partir de los valores de Φ_{ST} .
9. La amplificación con los *primers* 580-1F y 580-1R, diseñados a partir del fragmento de 580 pb clonado y secuenciado de individuos de *M. galloprovincialis* de la Ría de Arousa, originó un marcador SCAR de 555 pb que permitió diferenciar *stocks* de *M. galloprovincialis* de otras formas de mejillón. También ha sido posible identificar inequívocamente la especie *P. canaliculus* gracias al patrón de amplificación originado con el *primer* ABA-07 en individuos que no presentaron el fragmento de 555 pb. Asimismo, se han obtenido dos *loci* diagnósticos para *M. californianus*, el ABA-05-390 y el AB9-06-300, y un *locus* específico, el ABA-10-1400, para las tres poblaciones de *M. trossulus*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard, C.; Dalgaard, J.Z. & Garret, R.A. (1995). Intercellular mobility and homing of an archaeal rDNA intron confers a selective advantage over intron cells of *Sulfolobus acidocaldarius*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 12285-12289.
- Aagaard, J.E.; Krutovski, K.V. & Strauss, S.H. (1998). RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity*, 81: 69-78.
- Adamkewicz, L.S. & Harasewych, M.G. (1994). Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers to assess relationships among beach clams of the Genus *Donax*. *Nautilus*, 2: 51-60.
- Adamkewicz, S.L. & Harasewych, M.G. (1996). Systematics and biogeography of the genus *Donax* (Bivalvia: Donacidae) in eastern North America. *Am. Malacol. Bull.*, 13: 97-103.
- Agustí, N.; de Vicente, M.C. & Gabarra, R. (2000). Developing SCAR markers to study predation on *Trialeurodes vaporarorum*. *Insect Mol. Biol.*, 9: 263-268.
- Ahmad, M.; Skibinski, D.O.F. & Beardmore, J.A. (1977). An estimate of the amount of genetic variation in the common mussel *Mytilus edulis*. *Biochem. Genet.*, 15: 833-846.
- Ahmed, M. & Sparks, A.K. (1970). Chromosome number, structure and autosomal polymorphism in the marine mussels *Mytilus edulis* and *Mytilus californianus*. *Biol. Bull.*, 138: 1-13.
- Allegrucci, G.; Caccone, A.; Cataudella, S.; Powell, J.R. & Sbordonì, V. (1995). Acclimation of the European sea bass to freshwater: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms. *Mar. Biol.*, 121: 591-599.
- Anderson, A.S.; Bilodeau, A.L.; Gilg, M.R. & Hilbish, T.J. (2002). Routes of introduction of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) to Puget Sound and Hood Canal. *J. Shellfish Res.*, 21: 75-79.
- André, C.; Lindgarth, M.; Jonsson, P.R. & Sundberg, P. (1999). Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, 79: 563-565.
- Apostol, B.L.; Black, W.C.; Reiter, P. & Miller, B.R. (1996). Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*, 76: 325-334.
- Appleyard, S.A. & Mather, P.B. (2000). Investigation into the mode of inheritance of allozyme and random amplified polymorphic DNA markers in tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquac. Res.*, 31: 435-445.

- Apte, S. & Gardner, J.P.A. (2001). Absence of population genetic differentiation in the New Zealand greenshell mussel *Perna canaliculus* (Gmelin, 1791) as assessed by allozyme variation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 258: 173-194.
- Apte, S. & Gardner, J.P.A. (2002). Population genetic subdivision in the New Zealand greenshell mussel (*Perna canaliculus*) inferred from single-strand conformation polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Mol. Ecol.*, 11: 1617-28
- Armbruster, G. (1997). Genetische verarmung aufgrund von populationseinbrüchen: Eine analyse bei der seltenen landschneckenart *Cochlicopa nitens* (Gallenstein, 1848). *Natur. Lands.*, 72: 444-446.
- Armbruster, G. (1998). Bei einer verbreiteten landschnecke *Cochlicopa lubrica* (O. F. Müller), wird die frequenz von molekularem phänotypen durch selbstbefruchtung und habitatspezifische selektion beeinflusst. *Laufener Seminarbeiträge 2/98 der Bayerischen Akademie für Naturschutz und landschaftspflege (ANL)*, pp. 39-43.
- Arnason, U. (1990). Phylogeny of marine mammals-evidence from chromosomes and DNA. En: *Chromosomes today*. Vol. 10. Eds. Fredga, K.; Kihlman, A. & Bennet, M.D., pp. 267-278.
- Arribas, R.; Törtola, S.; Welsh, J.; McClelland, M. & Peinado, M.A. Arbitrarily primed PCR and RAPDs. En: *Fingerprinting methods based on arbitrarily primed PCR*. Eds. Micheli, M.R. & Bova, R., pp. 47-53.
- Aubert, H. & Lightner, D.V. (2000). Identification of genetic populations of the Pacific blue shrimp *Penaeus stylirostris* of the Gulf of California, Mexico. *Mar. Biol.*, 137: 875-885.
- Ausió, J. (1988). An unusual cysteine-containing histone H1-like protein and two protamine-like proteins are the major nuclear proteins of the sperm of the bivalve mollusc *Macoma nasuta*. *J. Biol. Chem.*, 263: 10141-10150.
- Ausió, J. & Subirana, J.A. (1982). Nuclear proteins and the organization of chromatin in spermatozoa of *Mytilus edulis*. *Exp. Cell Res.*, 141: 39-45.
- Ausió, J. (1992). Presence of a highly specific histone H1-like protein in the chromatin of the sperm of the bivalve mollusks. *Mol. Cell. Biochem.*, 115: 163-172.
- Avise, J.C. (1994). *Molecular markers, natural history and evolution*. Eds. Chapman & Hall. New York.
- Avise, J.C.; Arnold, J.; Martin Ball, R.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A. & Saunders, N.C. (1987). Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489-522.

- Ayliffe, M.A.; Lawrence, G.J.; Ellis, J.G. & Pryor, A.J. (1994). Heteroduplex molecules formed between allelic sequences cause nonparental RAPD bands. *Nucleic Acids Res.*, 22: 1632-1636.
- Badaracco, G.; Bellorini, M. & Landsberger, N. (1995). Phylogenetic study of bisexual *Artemia* using random amplified polymorphic DNA. *J. Mol. Evol.*, 41: 150-154.
- Bai, D. (1998). Three novel *Nicotiana debneyi* specific repetitive DNA elements derived from RAPD marker. *Genome*, 42: 104-109.
- Bai, D.; Reeleder, R. & Brandle, J.E. (1995). Identification of two RAPD markers tightly linked with the *Nicotiana debneyi* gene for resistance to black root of tobacco. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 1184-1189.
- Baldwin, B.G. (1994). Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution re-examined. *Am. J. Bot.*, 81: 254.
- Barsotti, G. & Meluzzi, C. (1968). Osservazioni su *Mytilus edulis* L. e *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. *Conchiglie*, 4: 50-58.
- Beagley, C.T.; Taylor, K.A. & Wolstenholme, D.R. (1997). Gender-associated diverse mitochondrial DNA molecules of the mussel *Mytilus californianus*. *Curr. Genet.*, 31: 318-324.
- Beaumont, A.R., Beveridge, C.M., Barnet, E.A. & Budd, M.D. (1989). Genetic studies of laboratory reared *Mytilus edulis*. II. Selection at the leucine aminopeptidase (lap) locus. *Heredity*, 62: 169-176.
- Beaumont, A.R. (1991). Genetic studies of laboratory reared *Mytilus edulis*: heterozygote deficiencies, heterozygosity and growth. *Biol. J. Linn. Soc.*, 44: 273-285.
- Beridze, T. (1986). *Satellite DNA*. Springer-Verlag, Berlin.
- Bernard, F.R. (1983). Catalogue of the living Bivalvia of the eastern Pacific Ocean: Bering Strait to Cape Horn. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, 6: 1-102.
- Besnard, G.; Baradat, P.; Chevalier, D.; Tagmount, A. & Bervillé, A. (2001). Genetic differentiation in the olive complex (*Olea europaea*) revealed by RAPDs and RFLPs in the rRNA genes. *Genet. Res. Crop Evol.*, 48: 165-182.
- Beynon, C.M. & Skibinski, D.O.F. (1996). The evolutionary relationships between three species of mussel (*Mytilus*) based on anonymous DNA polymorphisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 203: 1-10.

- Bianchi, M.E.; Beltrame, M. & Paonessa, G. 1989. Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1. *Science*, 243: 1056-1059.
- 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 *M. galloprovincialis*. *Mol. Ecol.*, 12: 447-461.
- Blot, M., Soyer, J. & Thiriot-Quévrevreux, C. (1987). Preliminary data on the genetic differentiation of *Mytilus desolationis* Lamy 1936 and *Aulacomya ater* regia Powell 1957 (Bivalvia, Mytilidae) in the Kerguelen Islands (Terres australes et antartiques Françaises). *Polar Biol.*, 7: 1-9.
- Borsa, P.; Daguin, C.; Ramos-Caetano, S. & Bonhomme, F. 1999. Nuclear-DNA evidence that northeastern Atlantic *Mytilus trossulus* mussels carry *M. edulis* genes. *J. Moll. Stud.*, 65: 504-507.
- Brock, V. (1985). Immo-electrophoretic studies of genetic relations between populations of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* from the Mediterranean, Baltic, East and West Atlantic, and East Pacific. En: *Proc. 19th Eur. Mar. Biol. Symp., Plymouth, England, 1984*. Ed. Gibbs, P. E. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 515-520.
- Brown, W.M. (1983). Evolution of animal mitochondrial DNA. En: *Evolution of genes and proteins*. Eds. Nei, M. & Koehn, R.K. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts, pp. 62-88.
- Bulnheim, H.P. & Gosling, E. (1988). Population genetic structure of mussels from the Baltic Sea. *Helgoländer Meeresunter*, 42: 113-129.
- Burow, M.D.; Simpson, C.E.; Paterson, A.H. & Starr, J.L. (1996). Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L) RAPD markers diagnostic of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) resistance. *Mol. Breeding*, 2: 369-379.
- Caetano-Anolles, G. & Bassam, B.J. (1993). DNA amplification fingerprinting using arbitrary ligo-nucleotide primers. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 42: 189-200
- Cagigas, M.E.; Vázquez, E.; Blanco, G. & Sánchez, J.A. (1999). Combined assessment of genetic variability in populations of brown trout (*Salmo trutta* L.) based on allozymes, microsatellites and RAPD markers. *Mar. Biotechnol.*, 1: 286-296.
- Callejas, C. & Ochando, M.D. (1998). Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *J. Fish Biol.*, 53: 208-215.
- Callejas, M. & Ochando, M.D. (2002). Phylogenetic relationships among spanish *Barbus* species (Pisces, Cyprinidae) shown by RAPD markers. *Heredity*, 89: 36-43.

- Carlos, S.; Jutglar, L.; Borrell, I.; Hunt, D.F. & Ausio, J. (1993). Sequence and characterization of a sperm-specific histone H1-like protein of *Mytilus californianus*. *J. Biol. Chem.*, 268: 185-194.
- Carlson, J.E.; Tulsieram, L.K.; Glaubitz, J.C., Luk, V.W.K.; Kauffeldt, C. & Rutledge, R. (1991). Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theor. Appl. Genet.*, 83: 194-200.
- Carlton, J.T. & Geller, J.B. 1993. Ecological roulette: the global transport of nonindigenous marine organism. *Science*, 261: 78-82.
- Cavalier-Smith, T. (1978). Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *J. Cell Sci.*, 34: 247-278.
- Charlesworth, B.; Sniegowski, P. & Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220.
- Chen, C.A.; Chen, C.P.; Fan, T.Y.; Yu, J.K. & Hsieh, H.L. (2002). Nucleotide sequences of ribosomal internal transcribed spacers and their utility in distinguishing closely related *Perenereis* polychaets (Annelida; Polychaeta; Nereididae). *Mar. Biotechnol.*, 4: 17-29.
- Chichvarkhin, A.Y. (2002). Re: Phylogeny and taxonomy of marine mussels: Comments on the paper by Distel (2000). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 22: 330-332.
- Clegg, M.T. (1989). Molecular diversity in plant populations. En: *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Eds. Brown, A.H.D.; Clegg, M.T.; Kahler, A.L. & Weir, B.S. Sinauer Associates. Sunderland, MA., pp. 98-115.
- Cockerham, C.C. (1973). Analysis of gene frequencies. *Genetics*, 74: 679-700.
- Comes, H.P. & Abbott, R.J. (2000). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and quantitative trait analyses across a major phylogeographical break in the Mediterranean ragwort *Senecio gallicus* Vill. (Asteraceae). *Mol. Ecol.*, 9: 61-76.
- Conrad, T.A. (1837). Description of new marine shells from upper California, collected by Thomas Nuttall. *Esq. J. Acad. Nat. Sci.*, 7: 227-268.
- Cooper, M.L. (2000). Random amplified polymorphic DNA analysis of southern brown bandicoot (*Isodon obesulus*) populations in Western Australia reveals genetic differentiation related to environmental variables. *Mol. Ecol.*, 9: 469-479.
- Côte-Real, H.B.S.M.; Holland, P.W.H. & Dixon, D.R. (1994a). Intron-targeted PCR: a new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve populations. *Mar. Biol.*, 120: 407-413.

- Côrte-Real, H.B.S.M.; Holland, P.W.H. & Dixon, D.R. (1994b). Inheritance of a nucleolar DNA polymorphism assayed in single bivalve larvae. *Mar. Biol.*, 120: 415-420.
- Cox, L.R.; Newell, N.D.; Branson, C.C.; Casey, R.; Chavan, A. et al. (1969). Systematic descriptions. En: *Treatise on Invertebrate Paleontology*. Ed. R.C. Moore. Geol. Soc. Am. and the University Press of Kansas. Part N, Mollusca 6, Bivalvia, pp. 225-8--.
- d'Orbigny, A. (1846). Mollusques lamellibranches. En: *Voyage dans l'Amérique Méridionale*. Vol. 5. Ed. d'Orbigny, A. Bertrand and Levraut, Paris, pp. 489-758.
- Daguin, C.; Bonhomme, F. & Borsa, P. (2001). The zone of sympatry and hybridization of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*, as described by intron length polymorphism at locus *mac-1*. *Heredity*, 86: 342-354.
- Daguin, C. & Borsa, P. (1999). Genetic characterization of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in North West Africa using nuclear DNA markers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 235: 55-65.
- Demeke, T.; Adams, R. P. & Chibbar, R. (1992). Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): A case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 990-994.
- Devos, K.M. & Gale, M.D. (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 84: 567-572.
- Diehl, W.J.; Gaffney, P.M.; McDonald, J.H. & Koehn, R.K. (1985). Relationship between weight-standarised oxygen consumption and multiple-locus heterozygosity in the mussel *Mytilus edulis*. En: *Proc. 19th Eur. Mar. Biol. Symp., Plymouth, England, 1984*. Ed. Gibbs, P. E. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 529-534.
- Diehl, W.J. & Koehn, R.K. (1985). Multiple locus heterozygosity, mortality and growth in a cohort of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 88: 265-271.
- Distel, D.L. (2000). Phylogenetic relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S rRNA data suggest convergence in Mytilid body plans. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 15: 25-33.
- Dixon, D.R. & Flavell, N. (1986). A comparative study of the chromosomes of *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 66: 219-228.
- Dixon, D.R. & McFadzen, I.R.B. (1987). Heterochromatin in the interphase nuclei of the common mussel *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 112: 1-9.
- Dixon, D.R.; McFadzen, J.R.B. & Sisley, K. (1986). Heterochromatin marker regions (nuclear organisers) in the chromosomes of the common mussel *Mytilus edulis* (Mollusca: Pelecypoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 97: 205-212.

- Dowling, T.E.; Moritz, C.; Palmer, J.D. & Rieseberg, L.H. (1996). Nucleic Acids III: analysis of fragments and restriction sites. En: *Molecular systematics*. 2nd edn. Eds. Hillis, D. M.; Moritz, C. & Mable, B.K. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, pp. 249-320.
- Drabent, B.; Kim, J.S.; Albig, W.; Prats, E.; Cornudella, L. & Doenecke, D. (1999). *Mytilus edulis* histone gene clusters containing only H1 genes. *J. Mol. Evol.*, 49: 645-655.
- Eirín-López, J.M.; González-Tizón, A.M.; Martínez, A. & Méndez, J. (2002). Molecular and evolutionary analysis of mussel histone genes (*Mytilus* spp.): possible evidence of an "Orphon origin" for H1 histone genes. *J. Mol. Evol.*, 55: 272-283.
- Elo, K.; Ivanoff, S.; Vourinen, J. A. & Piironen, J. (1997). Inheritance of RAPD markers and detection of interspecific hybridization with brown trout and Atlantic salmon. *Aquaculture*, 152: 55-65.
- Esbesen, K.; Schönkopf, S. & Midtgaard, T. (1994). *Multivariate analysis in practice*. CAMO, Wennbergs Trykkeri AS. Trondheim, Norway.
- Excoffier, L.; Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Felsenstein, J. (1993). *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c*. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Ferguson, A. (1980). *Biochemical systematics and evolution*. Blackie, Glasgow.
- Fernández, M.E.; Figueiras, A.M. & Benito, C. (2002). The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theor. Appl. Genet.*, 104: 845-851.
- Filpula, D.R.; Lee, S.M.; Link, R.P.; Strusberg, S.L. & Strausberg, R.L. (1990). Structural and functional repetition in a marine mussel adhesive protein. *Biotechnol. Prog.*, 6: 171-177.
- Fisher, C. & Skibinski, D.O.F. (1990). Sex-biased mitochondrial DNA heteroplasmy in the marine mussel *Mytilus*. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 242: 149-156.
- Freitas, H. & Brehm, A. (2001). Genetic diversity of the macaronesian leafy liverwort *Porella canariensis* inferred from RAPD markers. *J. Hered.*, 92: 339-345.

- Gaffney, P.M. (1994). Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: more light?. En: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Ed. Beaumont, A.R. Chapman and Hall. London, pp. 146-153.
- Galindo, M.; Rodríguez, H. & Olivares, C. (1992). Sperm basic nuclear proteins in the bivalve mollusc *Mesodesma donacium*: characterization and comparison with histone-like and protamine-like proteins of other molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 102: 947-952.
- García, D.K.B. & Benzie, J.A.H. (1995). RAPD markers of potential use in penaeid prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture*, 130: 137-144.
- García-Mas, J.; Oliver, M.; Gómez-Paniagua, H. & de Vicente, M.C. (2000). Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 860-864.
- Gartner-Kepkay, K.E.; Zouros, E.; Dickie, L.M. & Freeman, K.R. (1983). Genetic differentiation in the face of gene flow: a study of mussel populations from a single Nova Scotia embayment. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49: 443-451.
- Gauer, L. & Cavalli-Molina, S. (2000). Genetic variation in natural populations of maté (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity*, 84: 647-656.
- Geller, J.B. (1994). Sex-specific mitochondrial DNA haplotypes and heteroplasmy in *Mytilus trossulus* and *Mytilus galloprovincialis* populations. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 3: 334-337.
- Geller, J.B.; Carlton, J.T. & Powers, D.A. (1993). Interspecific and intrapopulation variation in mitochondrial ribosomal DNA sequences of *Mytilus spp.* (Bivalvia: Mollusca). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 2: 44-50.
- Geller, J.B., Carlton, J.T. & Powers, D.A. (1994). PCR-based detection of mtDNA haplotypes of native and invading mussels on the northeastern Pacific coast: latitudinal pattern of invasion. *Mar. Biol.*, 119: 243-249.
- Gillies, A.C.M.; Navarro, C.; Lowe, A.J.; Newton, A.C.; Hernández, M.; Wilson, J. & Cornelius, J.P. (1999). Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. *Heredity*, 83: 722-732.
- González-Tizón, A.M.; Martínez-Lage, A.; Rego, I.; Ausió, J. & Méndez, J. (2000). DNA content, karyotypes, and chromosomal location of 18S-5.8S-28S ribosomal loci in some species of bivalve molluscs from the Pacific Canadian coast. *Genome*, 43: 1065-1072.
- Gosling, E.M. (1984). The systematic status of *Mytilus galloprovincialis* in western Europe: a review. *Malacologia*, 25: 551-568.

- Gosling, E.M. (1992a). Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. En: *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Ed. Gosling, E.M. Elsevier Press. Amsterdam, pp. 1-20.
- Gosling, E.M. (1992b). Genetics of *Mytilus*. En: *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Ed. Gosling, E.M. Elsevier Press. Amsterdam, pp. 309-382.
- Gould, A.A. (1850). Shells from the United States Exploring Expedition. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, 3: 343-348.
- Gould, A.A. (1861). Descriptions of shells collected by the North Pacific Exploring Expedition. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, 8: 14-40.
- Grant, W.S. & Cherry, M.I. (1985). *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in southern Africa. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 90: 179-191.
- Guadagnuolo, R.; Savova-Bianchi, D. & Felber, F. (2001). Specific genetic markers for wheat, splot, and four wild relatives: comparison of isozymes, RAPDs and wheat microsatellites. *Genome*, 44: 610-621.
- Hadrys, H.; Balick, M. & Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.*, 1: 55-63.
- Hallden, C., Nilsson, N.O., Raiding, I.M. & Säll, T. (1994). Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 123-128.
- Heath, D.D.; Hatcher, D.R. & Hilbish, T.J. 1996. Ecological interaction between sympatric *Mytilus* species on the west coast of Canada investigated using PCR markers. *Mol. Ecol.*, 5: 443-447.
- Heath, D.D. & Hilbish, T.J. (1998). *Mytilus* protamine-like sperm-specific protein genes are multicopy, dispersed and closely associated with hypervariable RFLP regions. *Genome*, 41: 587-596.
- Heath, D.D.; Rawson, P.D. & Hilbish, T.J. 1995. PCR-based nuclear markers identify alien blue mussel (*Mytilus* spp.) genotypes on the west coast of Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 2621-2627.
- Heipel, D.A.; Bishop, J.D.D.; Brand, A.R. & Thorpe, J.P. (1998). Population genetic differentiation of the great scallop *Pecten maximus* in western Britain investigated by randomly amplified polymorphic DNA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 162: 163-171.
- Hellsten, M.E. & Sundberg, P. (2000). Genetic variation in two sympatric European populations of *Bosmina* spp. (Cladocera) tested with RAPD markers. *Hydrobiologia*, 421: 157-164.

- Hernández, P.; de la Rosa, R.; Rallo, L.; Dorado, G. & Martín, A. (2001). Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive gemplams evaluation and mapping. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 788-791.
- Heun, M. & Helentjaris, T. (1993). Inheritance of RAPDs in F₁ hybrids of corn. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 961-968.
- Hilbish, T.J.; Mullinax, A.; Dolven, S.I.; Meyer, A.; Koehn, R.K. & Rawson, P.D. (2000). Origin of the antitropical distribution pattern in marine mussels (*Mytilus* spp.): routes and timing of transequatorial migration. *Mar. Biol.*, 136: 69-77.
- Hinegardner, R. (1974). Cellular DNA content of the Mollusca. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47: 447-460.
- Hirschfeld, B.M.; Dhar, A.K.; Rask, K. & Alcivar-Warren, A. (1999). Genetic diversity in the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) from Massachusetts using the RAPD technique. *J. Shellfish Res.*, 18: 121-125.
- Hoeh, W.R.; Stewart, D.T.; Sutherland, B.W. & Zouros, E. (1996). Multiple origins of gender-associated mitochondrial DNA lineages in bivalves (Mollusca: Bivalvia). *Evolution*, 50: 2276-2286.
- Hoffman, R.; Boore, J.L. & Brown, W.M. (1992). A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics*, 131: 397-412.
- Holmquist, R. (1983). Transitions and transversions in evolutionary descent: an approach to understanding. *J. Mol. Evol.*, 19: 134-144.
- Howlett, D. J. (1990). The arrival in Britain of *Ensis americanus*. *Conchologist's Newsletter*, 114: 301-302.
- Hu, J. & Quiros, C. F. (1991). Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell. Rep.*, 10: 505-511.
- Huang, B.X.; Peakall, R. & Hanna, P.J. (2000). Analysis of genetic structure of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) populations using RAPD, minisatellite and microsatellite markers. *Mar. Biol.*, 136: 207-216
- Huff, D.R.; Peakall, R. & Smouse, P.E. (1993). RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 927-934.
- Hunt, G. J. & Page, R. E. (1992). Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honeybee. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 15-20.

- Hupé, H. (1854). Moluscos. En: *Historia física y política de Chile. Zoología*. Vol. 8. Ed. Gay, C. Paris, pp. 1-407.
- Ieyama, H. (1983). Karyotype in *Mytilus edulis* (Bivalvia, Mytilidae). *Mem. Facul. Edu. Ehime Univ. Serie III*, 3: 23-26.
- Ieyama, H.; Kameoka, O.; Tan, T. & Yamsaki, J. (1994). Chromosomes and nuclear DNA contents of some species in Mytilidae. *Venus*, 53: 327-331.
- Innes, D.J. & Bates, J.A. (1999). Morphological variation of *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus* in eastern Newfoundland. *Mar. Biol.*, 133: 691-699.
- Inoue, K. & Odo, S. (1994). The adhesive protein cDNA of *Mytilus galloprovincialis* encodes decapeptide repeats but no hexapeptide motif. *Biol. Bull.*, 186: 349-355.
- Inoue, K.; Odo, S.; Noda, T.; Nakao, S.; Takeyama, S.; Yamaha, E.; Yamazaki, F. & Harayama, S. 1997. A possible hybrid zone in the *Mytilus edulis* complex in Japan revealed by PCR markers. *Mar. Biol.*, 128: 91-95.
- Inoue, K.; Takeuchi, Y.; Miki, D. & Odo, S. (1995a). Mussel foot protein genes: structure and variations. *J. Mar. Biotechnol.*, 3: 157-160.
- Inoue, K.; Takeuchi, Y.; Miki, D. & Odo, S. (1995b). Mussel adhesive plaque protein gene is a novel member of epidermal growth factor-like gene family. *J. Biol. Chem.*, 170: 6698-6701.
- Inoue, K.; Takeuchi, Y.; Takeyama, S.; Yamaha, E.; Yamazaki, F.; Odo, S. & Harayama, S. (1996). Adhesive protein cDNA sequence of the mussel *Mytilus coruscus* and its evolutionary implications. *J. Mol. Evol.*, 43: 348-356.
- Insua, A.; Freire, R. & Ríos, J. (2001). Localización cromosómica y patrones de variación del ADN ribosómico en moluscos bivalvos. En: *Los moluscos bivalvos: aspectos citogenéticos, moleculares y aplicados*. Ed. Universidade da Coruña, Servicio de Publicacións. A Coruña, pp. 77-99.
- Insua, A.; Labat, J.P. & Thiriot-Quiévreux, C. (1994). Comparative analysis of karyotypes and nucleolar organizer regions in different populations of *Mytilus trossulus*, *M. edulis* and *M. galloprovincialis*. *J. Moll. Stud.*, 60: 359-370.
- Insua, A. & Méndez, J. (1998). Physical mapping and activity of ribosomal RNA genes in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Hereditas*, 128: 189-194.
- Jeffs, A.G.; Holland, R.C.; Hooker, S.H. & Hayden, B.J. (1999). Overview and bibliography of research on the greenshell Mussel, *Perna canaliculus*, from New Zealand waters. *J. Shellfish Res.*, 18: 347-360.

- Johannesson, K.; Kautsky, N. & Tedengren, M. (1990). Genotypic and phenotypic differences between Baltic and North Sea populations of *Mytilus edulis* evaluated through reciprocal transplantations. II. Genetic variation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 59: 211-219.
- Jones, C.S.; Noble, L.R.; Lockyer, A.E.; Brown, D.S. & Rollinson, D. (1997). Species-specific primers discriminate schistosome intermediate hosts: unambiguous PCR diagnosis of *Bulinus forskalii* group taxa (Gastropoda: Planorbidae). *Mol. Ecol.*, 6: 843-849.
- Karl, S.A. & Avise, J.C. (1992). Balancing selection at allozyme loci in Oysters: implications from nuclear RFLPs. *Science*, 256: 100-102.
- Kenchnington, E.; Landry, D. & Bird, C.J. (1995). Comparison of taxa of the mussel *Mytilus* (Bivalvia) by analysis of the nuclear small-subunit rRNA gene sequence. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 2613-2620.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Biol.*, 16: 111-120.
- Kleckner, N. 1981. Transposable elements in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, 15: 341-404.
- Klinbunga, S.; Ampayup, P.; Tassanakajon, A.; Jarayabhand, P. & Yoosukh, W. (2001). Development of species-specific markers of tropical Oyster (*Crassostrea belcheri*) in Thailand. *Mar. Biotechnol.*, 2: 476-484.
- Koehn, R.K. (1991). The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. *Aquaculture*, 94: 125-145.
- Koehn, R.K.; Hall, J.G.; Innes, D.J. & Zera, A.J. (1984). Genetic differentiation of *Mytilus edulis* in eastern North America. *Mar. Biol.*, 79: 117-126.
- Koehn, R.K.; Milkman, R. & Mitton, J.B. (1976). Population genetics of marine pelecypods. IV. Selection, migration and genetic differentiation in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Evolution*, 30: 2-32.
- Koehn, R.K. & Shumway, S.E. (1992). A genetic/physiological explanation for differential growth rate among individuals of the American oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Mar. Biol. Lett.*, 3: 35-42.
- Korn, E.D. (1978). Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (a review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 588-599.
- Krutovskii, K.V.; Vollmer, S.S.; Sorensen, F.C.; Adams, W.T.; Knapp, S.J. & Strauss, S.H. (1998). RAPD genome maps of Douglas-Fir. *J. Hered.*, 89: 197-205.

- Kumar, S. & Gadagkar, S.R. (2000). Efficiency of the neighbor joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. *J. Mol. Evol.*, 51: 544-553.
- Lamarck, J.B.P.A. 1819. *Histoire naturelle des animaux sans vertèbres*. Vol. 6. A.S.B. Verdiere Libraire, Paris.
- Lamy, E. 1936. Révision des Mytilidae vivants du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris. *J. Conchy.*, 80: 66-363.
- Landry, P.A. & Lapointe, F.J. (1996). RAPD problems in phylogenetics. *Zool. Scr.*, 25: 283-290.
- Laursen, R.A. (1992). Reflections on the structure of mussel adhesive proteins. En: *Structure, Cellular synthesis and assembly of Biopolymers. Results and Problems in Cell Differentiation*. Vol. 19. Ed. Case, S.T. Springer-Verlag, Berlin, pp. 55-74.
- Lee, S.Y. & Morton, B.S. 1985. The introduction of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* into Hong Kong. *Malacol. Rev.*, 18: 107-109.
- Lessels, C.M. & Mateman, A.C. (1998). Sexing birds using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol. Ecol.*, 7: 187-195.
- Lewis, J.R. & Seed, R. (1969). Morphological variations in *Mytilus* from SW England in relation to the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.). *Cah. Biol. Mar.*, 10: 231-253.
- Lima de Faria, A.; Arnason, U.; Widehren, B.; Essen-Möller, J.; Isaksson, M.; Olsson, E. & Jaworska, H. (1984). Conservation of repetitive DNA sequences in deer species studied by southern blot transfer. *J. Mol. Evol.*, 20: 17-24.
- Linné, C. (1758). *Systema naturae per regna tria naturae*. Regnum animale. Vol. 1. Laurentii Salvi, Stockholm. 10th Edition, pp. 1384.
- Lischke, C.E. (1868). Diagnosen neuer Meeres-Konchylien von Japan. *Malakozool. Blätter*, 15: 218-222.
- Lou-Sun, G.; Díaz, O.; Salomon, D. & von Bothmer, R. (1998). Genetic diversity in *Elymus caninus* as revealed by isozyme, RAPD and microsatellite markers. *Genome*, 42: 420-431.
- Lynch, M. & Milligan, B.G. (1994). Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.*, 3: 91-99.

- Mamuris, Z.; Stamatis, C. & Triantaphyllidis, C. (1999). Intraespecific genetic variation of striped red mullet (*Mullus surmuletus* L.) in the Mediterranean Sea assessed by allozyme and random amplified polymorphic DNA. *Heredity*, 83: 30-38.
- Mardsen, J.E.; Spidle, A. & May, B. (1995). Genetic similarity among zebra mussel populations within North America and Europe. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52: 836-847.
- Marillia, E.F. & Scoles, G.J. (1996). The use of RAPD markers in *Hordeum* phylogeny. *Genome*, 39: 646-654.
- Martínez, I. & Pastene, L.A. (1999). RAPD-typing of central and eastern north atlantic and western north pacific minke whales, *Balaenoptera acutorostrata*. *J. Mar. Sci.*, 56: 640-651.
- Martínez-Expósito, M.J.; Pasantes, J.J. & Méndez, J. (1994). NOR activity in larval and adult mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 94: 155-165.
- Martínez-Lage, A.; González-Tizón, A.; Ausió, J. & Méndez, J. (1997). Karyotypes and Ag-NORs of the mussels *Mytilus californianus* and *M. trossulus* from the Pacific canadian coast. *Aquaculture*, 153: 239-249.
- Martínez-Lage, A.; González-Tizón, A. & Méndez, J. (1994). Characterization of different chromatin types in *Mytilus galloprovincialis* Lmk. after C-banding, fluorochrome and restriction endonuclease treatments. *Heredity*, 72: 242-249.
- Martínez-Lage, A.; González-Tizón, A. & Méndez, J. (1995). Chromosomal markers in three species of the genus *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia). *Heredity*, 74: 369-375.
- Martínez-Lage, A.; González-Tizón, A. & Méndez, J. (1996). Chromosome differences between European mussel populations (genus *Mytilus*). *Caryologia*, 49: 343-355.
- Martínez-Lage, A.; Rodríguez, F.; González-Tizón, A.; Prats, E.; Cornudella, L. & Méndez, J. (2002). Comparative analysis of different satellite DNAs in four *Mytilus* species. *Genome*, 45: 922-929.
- Marzluff, W.F. (1986). Evolution of histone genes. En: *DNA Systematics*. Vol. 1. Ed. Dutta, S.K. CRC Press. Boca Raton, Florida, pp. 140-168.
- McDonald, J.H. & Koehn, R.K. (1988). The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. *Mar. Biol.*, 99: 111-118.
- McDonald, J.H.; Koehn, R.K.; Balakirev, E.S.; Manchenko, G.P.; Pudovkin, A.I.; Sergiyevskii, S.O. & Krutovskii, K.V. (1990). Species identity of the "common mussel" inhabiting the Asiatic of the Pacific Ocean. *Biol. Morya*, 1: 13-22.

- McDonald, J.H.; Seed, R. & Koehn, R.K. (1991). Allozyme and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern hemispheres. *Mar. Biol.*, 111: 323-335.
- Méndez, J.; Pasantes, J.J. & Martínez-Expósito, M.J. 1990. Banding pattern of mussel (*M. galloprovincialis*) chromosomes induced by 2xSSC/Giemsa-stain treatment. *Mar. Biol.*, 106: 375-377.
- Millan, T.; Osuna, F.; Cobos, S.; Torres, A. M. & Cubero, J. I. (1996). Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 273-277.
- Milyutina, I. A. & Petrov, N. B. (1989). Divergence of unique DNA sequences in bivalve mollusks of subfamily Mytilinae (Bivalvia: Mytilidae). *Mol. Biol.*, 23: 1373-1381.
- Mitton, J.B. (1994). Molecular approaches to population biology. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 25: 45-69.
- Mogensen, C.; Carlos, S. & Ausió, J. (1991). Microheterogeneity and interspecific variability of the nuclear sperm proteins from *Mytilus*. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.*, 282: 273-276.
- Moore, M.N., Lowe, D.L., Livingstone, D.R. & Dixon, D.R. (1986). Molecular and cellular indices of pollutant effects and their use in environmental impact assessment. *Wat. Sci. Tech.*, 18: 223-232.
- Moritz, C.; Dowling, T.E. & Brown, W.M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 269-92.
- Moriyama, E.N. & Powell, J.R. (1996). Intraspecific nuclear DNA variation in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, 13: 261-277.
- Moya, A.; Guirao, P.; Cifuentes, D.; Beitia, F. & Cenis, J.L. (2001). Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Mol. Ecol.*, 10: 891-897.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press. New York.
- Nesbo, C.L.; Fosshem, T.; Vollesta, L.A. & Jakobsen, S. (1999). Genetic divergence and phlogeographic relationships among European perch (*Perca fluviatilis*) populations reflect glacial refugia and postglacial colonization. *Mol. Ecol.*, 8: 1387-1404.
- Nicholas, K.B. & Nicholas, H.B.Jr. (1997). *Genedoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments*. Distributed by the author.

- Nocelli, E.; Giovannini, T.; Bioni, M. & Alicchio, R. (1999). RFLP and RAPD based genetic relationships of seven diploid species of *Avena* with the A genome. *Genome*, 42: 950-959.
- Nojima, H. & Sokabe, H. (1989). Structural organization of multiple rat calmodulin genes in the rat genome. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 255: 223-232.
- N'Goran, J.A.K.; Laurent, V.; Risterucci, A.M. & Lanaud, C. (1994). Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. *Heredity*, 73: 589-597.
- Ochman, H. & Wilson, A.C. (1987). Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol.*, 26: 74-86.
- 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 *Mytilus galloprovincialis* Lmk and *M. edulis* L. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 6: 123-130.
- Oshima, A.; Inouye, S. & Inouye, M. (1992). In vivo duplication of genetic elements by the formation of stem-loop DNA without an RNA intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1016-1020.
- Paffeti, D.; Scott, C.; Gnock, S.; Fancelli, S. & Bazzicalupo, M. (1996). Genetic diversity of an italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. *Appl. Environ. Microb.*, 2279-2285.
- Palumbi, S.R. (1994). Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 25: 547-572.
- Paran, I. & Michelmore, R.W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 985-993.
- Pascual, M. & Serra, L. (1999). RAPD diagnosis of the obscure group species sympatric with *D. subobscura* in North America. *J. Hered.*, 90: 580-582.
- Patwary, M.U.; Kenchington, E.L.; Bird, C.J. & Zouros, E. (1994). The use of random amplified polymorphic DNA markers in genetic studies of the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). *J. Shellfish Res.*, 13: 547-553.
- Peakall, R.; Smousse, P.E. & Huff, D.R. (1995). Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of buffalograss *Buchloë dactyloides*. *Mol. Ecol.*, 4: 135-147.

- Pechenik, J.A., Eyster, B.A., Widdows, J. & Bayne, B.L. (1990). The influence of food concentration and temperature on growth and morphological differentiation of blue mussel *Mytilus edulis* L. larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 136: 47-64.
- Pejic, I.; Ajmone-Marsan, P.; Morgante, M.; Kozumplick, V.; Castiglioni, P.; Taramino, G. & Motto, M. (1998). Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 1248-1255.
- Peltier, D., Farcy, E., Dulieu, H. & Bervill, A. (1994). Origin, distribution and mapping of RAPD markers from wild *Petunia* species in *Petunia hybrida* Hort lines. *Theor. Appl. Genet.*, 88: 637-645.
- Penney, R.W. & Hart, M.J. (1999). Distribution, genetic structure and morphometry of *Mytilus edulis* and *M. trossulus* within a mixed species zone. *J. Shellfish Res.*, 18: 367-374.
- Prestidge, M.C. & Taylor, A.H. (1995). A modelling investigation of the distribution of stratification and phytoplankton abundance in the Irish Sea. *J. Plankton Res.*, 17: 1397-1420.
- Quesada, H.; Warren, M. & Skibinski, D.O.F. (1998). Nonneutral evolution and differential mutation rate of gender-associated mitochondrial DNA lineages in the marine mussel *Mytilus*. *Genetics*, 149: 1511-1526.
- Quesada, H.; Zapata, C. & Alvarez, G. (1995). A multilocus discontinuity in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: the interaction of ecological and life-history factors. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 116: 99-115.
- Raina, S.N.; Rani, V.; Kojima, T.; Oghihara, Y.; Singh, K.P. & Devarumath, R.M. (2001). RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, 44: 763-772.
- Rand, D.M. (1996). Neutrality tests of molecular markers and the connection between DNA polymorphisms, demography and conservation biology. *Conserv. Biol.*, 10: 665-671.
- Rasmussen, S.W. (1999). *Software DNATools version 5.1-revision 644*. www.dnatools.dk.
- Rawson, P.D. & Hilbish, T.J. (1995). Evolutionary relationships among the male and female mitochondrial DNA lineages in the *Mytilus edulis* species complex. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 893-901.
- Rawson, P.D.; Joyner, K.L.; Meetze, K. & Hilbish, T. (1996). Evidence for intragenic recombination within a novel genetic marker that distinguishes mussels in the *Mytilus edulis* species complex. *Heredity*, 77: 599-607.

- Reiter, R.S.; Williams, J.G.K.; Feldman, K.A.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. & Scolnik, P.A. (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 1477-1481.
- Rhoads, D.D. & Roufa, D.J. (1989). *SEQAID II*. Molecular Genetics Laboratory. Kansas State University.
- Rice, E.L. & Bird, C.J. (1990). Relationships among geographically distant population of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta) and related species. *Phycologia*, 29: 501-510.
- Riedy, M.F.; Hamilton, W.J. & Aquadro, C.F. (1992). Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucleic Acids Res.*, 20: 918.
- Rodríguez, J.M.; Berke, T.; Engle, L. & Nienhuis, J. (1999). Variation among and within *Capsicum* species revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 147-156.
- Rodríguez, F. (2001). *Estudio molecular de secuencias de copia única y de ADN satélite en mejillón*. Tesis Doctoral. Universidade da Coruña. Mayo 2001.
- Rodríguez, F.; Rego, I. & Martínez, A. (2001). Marcadores moleculares en moluscos bivalvos. En: *Los moluscos bivalvos: aspectos citogenéticos, moleculares y aplicados*. Ed. Universidade da Coruña, Servicio de Publicacións. A Coruña, pp. 127-148.
- Rodríguez-Juiz, A.M.; Torrado, M. & Méndez, J. (1996). Genome-size variation in bivalve molluscs determined by flow cytometry. *Mar. Biol.*, 126: 489-497.
- Ruiz-Lara, S.; Prats, E.; Sainz, J. & Cornudella, L. (1992). Cloning and characterization of a highly conserved satellite DNA from the mollusc *Mytilus edulis*. *Gene*, 117: 237-242.
- Ruiz-Lara, S.; Prats, E.; Casas, M.T. & Cornudella, L. (1993). Molecular cloning and sequencing of a cDNA for the sperm-specific protein $\phi 1$ from the mussel *Mytilus edulis*. *Nucleic Acids Res.*, 21: 2774.
- Russell, J.R.; Fuller, J.D.; Macaulay, M.; Hatz, B.G.; Jahoor, A.; Powell, W. & Waugh, R. (1997). Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 714-722.
- Rychlik, W. & Rhoads, E. (1989). A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 17: 8543-8551.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.T. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
- Sanjuan, A.; Comesaña, A.S. & De Carlos, A. (1996). Macrogeographic differentiation by mtDNA restriction site analysis in the S.W. European *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 198: 89-100.
- Sanjuan, A.; Quesada, H.; Zapata, C. & Alvarez, G. (1990). On the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. on the N.W. coast of the Iberian Peninsula. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 143: 1-14.
- Sanjuan, A.; Zapata, C. & Alvarez, G. (1994). *Mytilus galloprovincialis* and *M. edulis* on the coasts of the Iberian Peninsula. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 113: 131-146.
- Sanjuan, A.; Zapata, C. & Álvarez, G. (1997). Genetic differentiation in *Mytilus galloprovincialis* Lmk. throughout the world. *Ophelia*, 47: 13-31.
- Santos, J.B. dos; Nienhuis, J.; Skroch, P.; Tivang, J. & Slocum, M. K. (1994). Comparisons of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotypes. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 909-915.
- Scarlato, O.A. (1981). Bivalve molluscs of temperate latitudes of the western portion of the Pacific Ocean. *Opred. Faune USSR*, 126: 1-461.
- Scheltema, R.S. (1986). On dispersal and planktonic larvae of benthic invertebrates: an eclectic overview and summary of problems. *Bull. Mar. Sci.*, 39: 290-322.
- Scott, M.P.; Haymes, K.M. & Williams, S.M. (1992). Parentage analysis using RAPD PCR. *Nucleic Acids Res.*, 20: 5493.
- Seed, R. (1976). Ecology. En: *Marine Mussels: their ecology and physiology*. Ed. Bayne, B.L. Cambridge University Press. Cambridge, pp. 13-56.
- Seed, R. (1978). The systematics and evolution of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.). En: *Marine Organisms: Genetics, Ecology and Evolution*. Ed. Battaglis, B. & Beardmore, J.A. Plenum Press. London, pp. 447-468.
- Seed, R. (1990). Taxonomic and evolutionary relationships within the genus *Mytilus*. En: *The Bivalvia proceedings of a memorial symposium in honour of Sir Charles Maurice Yonge 1986*. Ed. Morton, B. Hong Kong University Press. Hong Kong, pp. 97-110.
- Seed, R. (1992). Systematics evolution and distribution of mussels belonging to the genus *Mytilus*: an overview. *Am. Malacol. Bull.*, 9: 123-137.

- Semagn, K.; Bjornstad, A.; Stedje, B. & Bekele, E. (2000). Comparison of multivariate methods for the analysis of genetic resources and adaptation in *Phytolacca dodecandra* using RAPD. *Theor. Appl. Genet.*, 101: 1145-1154.
- Shen, Y.; Ford-Lloyd, B.V. & Newbury, H.J. (1998). Genetic relationships within the genus *Beta* determined using both PCR-based marker and DNA sequencing techniques. *Heredity*, 80: 624-632.
- Singer, M.F. (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.*, 76: 67-112.
- Singer, M. & Berg, P. (1991). *Genes and Genomes*. University Science Books, California.
- Singh, S.M. & Zouros, E. (1978). Genetic variation associated with growth rate in the American oyster (*Crassostrea virginica*). *Evolution*, 32: 342-353.
- Skibinski, D.O.F. (1985). Mitochondrial DNA variation in *Mytilus edulis* and the Padstow mussel. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 92: 251-258.
- Skibinski, D.O.F. & Beardmore, J.A. (1979). A genetic study of intergradation between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Experientia*, 35: 1442-1444.
- Skibinski, D.O.F.; Beardmore, J.A. & Cross, T.F. (1983). Aspects of the population genetics of *Mytilus* (Mytilidae: Mollusca) in the British Isles. *Biol. J. Linn. Soc.*, 19: 137-183.
- Skibinski, D.O.F.; Cross, T.F. & Ahmad, M. (1980). Electrophoretic investigations of systematic relationships in the marine mussels *Modiolus modiolus* L., *Mytilus edulis* L., *Mytilus galloprovincialis* Lmk., (Mytilidae Mollusca). *Biol. J. Linn. Soc.*, 13: 65-73.
- Skibinski, D.O.F.; Gallagher, C. & Beynon, C.M. (1994). Mitochondrial DNA inheritance. *Nature*, 368: 817-818.
- Skibinski, D.O.F.; Gallagher, C. & Quesada, H. (1999). On the roles of selection, mutation and drift in the evolution of mitochondrial DNA diversity in British *Mytilus edulis* (Mytilidae; Mollusca) populations. *Biol. J. Linn. Soc.*, 68: 195-213.
- Slatkin, M. (1985a). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39: 53-65.
- Slatkin, M. (1985b). Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 16: 393-430.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. (1995). *Biometry*, 3rd Ed. W.H. Freeman and Company. New York.
- Song Ge; Oliveira, G.C.X.; Schaal, B.A.; Gao, L. & Hong, D. (1999). RAPD variation within and between natural populations of the wild rice *Oryza rufipogon* from China and Brazil. *Heredity*, 82: 638-644.

- Soot-Ryen, T. (1955). A report on the family Mytilidae (Pelocypoda). *Allan Hancock Pacif. Exped.*, 20: 1-175.
- Stammers, M.; Harris, J.; Evans, G.M.; Hayward, M.D. & Foster, J.W. (1995). Use of random PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium/Festuca* complex. *Heredity*, 74: 19-27.
- Star, B.; Apte, S. & Gardner, J.P.A. (2003). Genetic structuring among populations of the greenshell mussel *Perna canaliculus* revealed by analysis of randomly amplified polymorphic DNA. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 249: 171-182.
- Stewart, C.N.Jr. & Excoffier, L. (1996). Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American cranberry). *J. Evol. Biol.*, 9: 153-171.
- Stewart, D.T.; Saavedra, C.; Stanwood, R.R.; Ball, A.O & Zouros, E. (1995). Male and female mitochondrial DNA linkages in the blue mussel (*Mytilus edulis*) species group. *Mol. Biol. Evol.*, 12: 735-747.
- Stott, W.; Ihssen, P.E. & White, B.N. (1997). Inheritance of RAPD molecular markers in lake trout *Salvelinus namaycush*. *Mol. Ecol.*, 6: 609-613.
- Strachan, T. & Read, A.P. (2000). Organization of the human genome. En: *Human Molecular Genetics*. BIOS Scientific Publishers Ltd. New York, USA, pp. 139-168.
- Suchanek, T.H. (1985). Mussels and their role in structuring rocky shore communities. En: *Ecology of Rocky Coasts*. Eds. Moore, P.G. & Seed, R. Hodder and Stoughton, Sevenoaks, Kent, pp. 70-96.
- Sutherland, B.; Stewart, D.; Kenchington, E.R. & Zouros, E. (1998). The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels, *Mytilus edulis*: Implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics*, 148: 341-347.
- Swofford, D.L. & Selander, R.B. (1997). *Biosys-2*, versión 2 del Biosys-1, de Swofford, D.L. & Selander, R.B. 1981. Biosys-1: a FORTRAN program for the comprehensive analysis of electrophoretic data in population genetics and systematics. *J. Hered.*, 72: 281-283.
- Tavares, M.G.; Ribeiro, E.H.; Campos, L.A.O.; Barros, E.G. & Oliveira, M.T.V.A. (2000). Inheritance pattern of RAPD markers in *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). *J. Hered.*, 92: 279-282.

- Tedengren, M., Andre, C., Johannesson, K. & Kautsky, N. (1990). Genotypic and phenotypic differences between Baltic and North Sea populations of *Mytilus edulis* evaluated through reciprocal transplantations. III. Physiology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 59: 221-227.
- Thiriot-Quévieux, C. (1984). Chromosome analysis of three species of *Mytilus* (Bivalvia: Mytilidae). *Mar. Biol.*, 5: 265-273.
- Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 24: 4876-4882.
- Thoma, F.; Koller, T. & Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell Biol.*, 83: 403-427.
- Tinker, N.A.; Fortin, M.G. & Mather, M.E. (1993). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for determination of genetic variation in wild populations of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 976-984.
- Toro, J.E. (1998). Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: the potential use in studies involving planktonic surveys. *J. Shellfish Res.*, 17: 1203-1205.
- Tracey, M.L.; Bellet, N.F. & Gravem, C.D. (1975). Excess allozyme homozygosity and breeding population structure in the mussel *Mytilus californianus*. *Mar. Biol.*, 32: 303-311.
- Urasaki, N.; Tokunoto, M.; Tarora, K.; Ban, Y.; Kayano, T.; Tanaka, H.; Oku, H.; Chinen, I. & Terauchi, R. (2002). A male and germaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 104: 281-285.
- Väinölä, R. & Hvilsum, M.M. (1991). Genetic divergence and a hybrid zone between Baltic and North Sea *Mytilus* populations (Mytilidae: Mollusca). *Biol. J. Linn. Soc.*, 43: 127-148.
- Varvio, S.L.; Koehn, R.K. & Väinölä, R. (1988). Evolutionary genetics of the *Mytilus edulis* complex in the North Atlantic region. *Mar. Biol.*, 98: 51-60.
- Vermeij, G.J. (1989). Geographical restriction as a guide to the causes of extinction: the case of the cold northern oceans during the Neocene. *Paleobiology*, 15: 335-356.
- Vermeij, G.J. (1991). Anatomy of an invasion: the trans-Arctic interchange. *Paleobiology*, 17: 281-307.
- Vermeij, G.J. (1992). Trans-equatorial connections between biotas in the temperate eastern Atlantic. *Mar. Biol.*, 112: 343-348.

- Vidal-Rioja, L.; Zambelli, A. & Semorile, L. (1994). An assessment of the relationships among species of Camelidae by satellite DNA comparison. *Hereditas*, 121: 283-290.
- Volkaert, F. & Zouros, E. (1989). Allozyme and physiological variation in the scallop *Placopecten magellanicus* and a general model for the effects of heterozygosity on fitness in marine molluscs. *Mar. Biol.*, 103: 51-61.
- Waite, J.H. (1992). The formation of mussel byssus: anatomy of a natural manufacturing process. En: *Case, Structure, Cellular Synthesis and Assembly of Biopolymers. Results and Problems in Cell Differentiation*. Vol. 19. Ed. Springer, S.T. Berlin, pp. 55-74.
- Warnke, K.; Söler, R.; Blohm, D. & Saint-Paul, U. (2000). Rapid differentiation between *Octopus vulgaris* Cuvier (1797) and *Octopus mimus* Gould (1852), using randomly amplified polymorphic DNA. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, 38: 119-122.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 7213-7218.
- Wenne, R. & Skibinski, D.O.F. (1995). Mitochondrial DNA heteroplasmy in European populations of the mussel *Mytilus trossulus*. *Mar. Biol.*, 122: 619-624.
- Wilkins, N.P.; Fujino, K. & Gosling, E.M. (1983). The Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Japan. *Biol. J. Linn. Soc.*, 20: 365-374.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6535.
- Wilson, A.C.; Ochman, H. & Prager, E.M. (1987). Molecular time scale for evolution. *Trends Genet.*, 3: 241-247.
- Wolf, H. de; Backeljau, T. & Verhagen, R. (1998). Congruence between allozyme and RAPD data in assessing macrogeographical genetic variation in the periwinkle *Littorina striata* (Mollusca, Gastropoda). *Heredity*, 81: 486-492.
- Wright, S. (1931). Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16: 97-157.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.*, 15: 323-354.
- Wright, S. (1969). The theory of gene frequencies. En: *Evolution and the genetics of populations, Vol. 2*. University of Chicago Press. Chicago.

- Wright, S. (1978). Variability within and among natural populations. En: *Evolution and the genetics of populations, Vol. 4*. University of Chicago Press. Chicago.
- Xu, M.; Huaracha, E. & Korban, S.S. (2001). Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple. *Genome*, 44: 63-70.
- Yin, T.; Huang, M.; Wang, M.; Zhu, L.; Zeng, Z. & Wu, R. (2001). Preliminary interspecific genetic maps of the *Populus* genome constructed from RAPD markers. *Genome*, 44: 602-609.
- Zalensky, A.O. & Zalenskaya, I.A. (1980). Basic chromosomal proteins of marine invertebrates– III. The proteins from sperm of bivalvia molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. B.*, 66: 415-419.
- Zbawicka, M.; Skibinski, D.O.F. & Wenne, R. (2003). Doubly uniparental transmission of mitochondrial DNA length variants in the mussel *Mytilus trossulus*. *Mar. Biol.*, 142: 455-460.
- Zouros, E.; Ball, A.O.; Saavedra, C. & Freeman, K.R. (1994a). Mitochondrial DNA inheritance. *Nature*, 368: 818.
- Zouros, E.; Ball, A.O.; Saavedra, C. & Freeman, K.R. (1994b). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7463-7467.
- Zouros, E. & Foltz, D.W. (1984). Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia*, 25: 583-591.

APÉNDICE

Ap. 1. SOLUCIONES UTILIZADAS

Extracción de ADN genómico:

- **PBS:** 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄.
- **Tampón de lisis:** 10 mM Tris, 100 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.75% SDS.
- **Solución de NaCl saturada:** 40 g NaCl en 100 mL de agua bidestilada.
- **IXTE:** 10 mM Tris-ClH pH 8.0, 1 mM EDTA.

Extracción de ADN mitocondrial:

- **Tampón TEK:** 50 mM Tris, 10 mM EDTA, 1.5% KCl, pH 7.5.
- **Solución TEK-Sacarosa 15%:** 1 L Tampón TEK, 150 g Sacarosa.
- **Tampón EST:** 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 150 mM NaCl pH 8.
- **SDS 18%:** 50 mL de agua bidestilada, 9 g SDS.

Extracción de ADN plasmídico (Miniprep):

- **Medio LB:** 10 mg/mL de Triptona, 5 mg/mL de Levadura, 10 mg/mL de NaCl.
- **Tampón glucosa:** 50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-ClH pH 8.0.
- **Tampón de lisis:** 0.2 N NaOH, 1% SDS.
- **Solución de acetato potásico:** 3 M acetato potásico pH 4.8, 2 M ácido acético glacial.

Electroforesis y cuantificación de ADN:

- **TAE:** 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8.0.
- **Tampón de carga 6X:** 0.25% azul de bromofenol, 0.25% azul de xianol, 30% glicerol.
- **ADN marcador III (Roche):** tiene una concentración de 250 µg/mL. Procede del ADN del fago λ, digerido con EcoRI y Hind III y produce fragmentos de 125, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148 y 21226 pb.
- **ADN marcador XIV (Roche):** consiste en 15 fragmentos de entre 50 y 750pb, en múltiplos de 50pb, y un fragmento adicional de 2642pb. Las bandas de 250 y 500pb son aproximadamente 2 ó 3 veces más intensas que el resto.

- **ADN marcador VI marcado con digoxigenina (Roche):** tiene una concentración de 10 µg/mL. Procede de una mezcla de ADN de pBR328 digerido con *Bgl* I y ADN de pBR328 digerido con *Hinf* I. Consiste en 15 fragmentos que oscilan entre 0.15 y 2.1kpb.

Hibridación Southern y Dot Blot:

- **Solución de desnaturalización:** 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl.
- **Solución de neutralización:** 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 3 M NaCl.
- **10XSSC, 2XSSC, 0.1XSSC:** se preparan a partir de una solución *stock* 20XSSC: 3 M ClNa, 0.3 M citrato sódico.
- **Solución de prehibridación:** 5XSSC, 0.02% SDS, 0.01% LSS, 0.3% Blocking de Roche.
- **Solución de hibridación:** 5XSSC, 0.02% SDS, 0.01% LSS, 0.3% Blocking de Roche, 25 ng/mL de sonda marcada con digoxigenina.
- **Tampón de ácido maleico:** 0.1 M ácido maleico, 0.15 M ClNa, ajustar a pH 7.5 con NaOH.
- **Tampón de lavado 1:** 2XSSC, 1% SDS.
- **Tampón de lavado 2:** 1XSSC, 1% SDS.
- **Tampón de lavado 3:** 0.2XSSC, 1% SDS.
- **Tampón de lavado 4:** Tween 20 al 0.3% en tampón de ácido maleico.
- **Tampón de lavado 5:** 0.2 M NaOH, 0.1% SDS.
- **Tampón bloqueante:** Blocking de Roche 1% en tampón de ácido maleico.
- **Tampón de detección:** 0.1 M Tris-ClH pH 9.5, 0.1 M ClNa, 50 mM MgCl₂.
- **TNB:** 0.1 M Tris HCl 0.15 M NaCl, 0.5% Blocking.

Purificación de fragmentos (según formulación del fabricante):

- **Tampón de solubilización (L1):** Solución concentrada de perclorato sódico, acetato y TBE.
- **Tampón de lavado (L2):** NaCl, EDTA, Tris-HCl.

Ap.2. ABREVIATURAS

- **(Medio) LB:** Luria-Bertani.
- **ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- **AMOVA:** analysis of molecular variance.
- **Anti-Dig-AP:** anti-digoxigenin-alkaline phosphatase.
- **ARN:** ácido ribonucleico.
- **BCIP:** 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt.
- **CA3:** cromomicina A3.
- **CSPD®:** Disodium 3-(4-methoxypropanoate-3, 2'-(5'-cloro) tricyclo [3. 3. 1. 1^{3,7}] decan} -4-yl) fenil fosfato).
- **DIG:** digoxigenina.
- **dNTP:** dinucleotide triphosphate.
- **DUI:** double uniparental inheritance.
- **EDTA:** etilen dinitril tetra-acetic acid.
- **FISH:** fluorescence *in situ* hybridization.
- **IPTG:** isopropyl β- -thiogalacto-pyranoside.
- **ITS:** internal transcribed spacer.
- **kb:** kilobases
- **NBT:** 4-nitroblue tetrazolium chloride.
- **NORs:** nucleolar organizer regions.
- **pb:** pares de bases.
- **PBS:** tampón fosfato salino.
- **PCA:** principal component analysis
- **PCR:** polymerase chain reaction.
- **pg:** picogramos.
- **RAPD:** random amplified polymorphic DNA.
- **RFLP:** restriction fragments length polymorphisms.
- **SCAR:** sequence characterized amplified region.
- **SDS:** sodium dodecyl sulfate.
- **SSC:** solución salina citrato.
- **TAE:** tris-acetate *buffer*.

- **TBE:** tris-borate *buffer*.
- **TE:** tris-EDTA *buffer*.
- **TNB:** tris-Na blocking.
- **UPGMA:** *unweighted pair group method with arithmetic mean*.
- **X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3indolyl- β -galactopyranoside.



UNIVERSIDADE DA CORUÑA