

ITS como marcador nuclear de polimorfismo en poblaciones de *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819)

CASTRO G., MARIBEB¹, SÁNCHEZ, RENÉ², TRONCOSO, LILIÁN³

¹ Universidad del Tolima, Facultad de Ciencias, Ibagué, Colombia.

² Universidad de Concepción, Departamento de Zoología.

³ Centro EULA, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

Resumen

Los marcadores genéticos basados en el ADN nuclear o mitocondrial de invertebrados son usados en genética de poblaciones como marcadores de polimorfismo entre individuos, especies o poblaciones. *Perumytilus purpuratus* es una especie ampliamente distribuida desde Ecuador hasta el Cabo de Hornos, con altas tasas de fecundidad y densidad en las costas chilenas. Con el objetivo de determinar diferencias en la estructura genética de *P. purpuratus* en áreas sometidas a estrés ambiental, se amplificó la región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal (ITS) y se analizó el polimorfismo de sus fragmentos de restricción. Los resultados mostraron que las poblaciones de *P. purpuratus* poseen dos alelos de ITS, 3 genotipos y 3 haplotipos característicos (al digerir con las enzimas TaqI y HhaI) que permitieron estimar la variabilidad intra-poblacional en áreas contaminadas o no contaminadas. Además, se determinó que hubo disminución en las frecuencias de aparición de los genotipos y de los haplotipos ITS, así como disminución de heterocigotos y tendencia a la desaparición de un alelo en las poblaciones de *P. purpuratus*, que habitan el área sometida a continuas descargas de contaminantes domésticos e industriales. Tales resultados sugieren que el ITS puede ser usado como un marcador nuclear en el análisis genético de poblaciones como *P. purpuratus*, que probablemente están cambiando su estructura genética ante condiciones de estrés ambiental fijando modificaciones en la frecuencia de genotipos y haplotipos ITS entre las poblaciones. Dicha variación podría mantenerse en equilibrio de acuerdo con la uniformidad de las condiciones ambientales.

Palabras clave: ITS, *Perumytilus purpuratus*, genética de poblaciones, ADN ribosomal, biomarcadores.

Abstract

Nuclear or mitochondrial DNA-based genetic markers of invertebrates are used in population genetic as polymorphism markers between individual, species and/or populations. *Perumytilus purpuratus* is specie widely distributed from Ecuador to Cabo de Hornos, with high fecundity rates and density along the Chilean coasts. With the goal to determine differences in the genetic structure of *P. purpuratus* populations in polluted areas, we

Correos electrónicos: mcastro@ut.edu.co - resanche@udec.cl - ltroncoso@agci.cl

amplified the internal transcribed spacer (ITS) region of the ribosomal DNA from *Perumytilus purpuratus* and we analyzed the restriction fragments polymorphism. The results showed that the *P. purpuratus* have two ITS-alleles, 3 genotypes and 3 haplotypes (by digestion with TaqI and HhaI enzymes) which were used to estimate intra-population variability in contaminated or no contaminated areas. Besides, the data indicated a decreasing in genotypes and haplotypes-ITS frequencies values, as well as heterozygote deficiencies and a tendency to disappearance of one allele from *P. purpuratus* population inhabiting the area with strong influx of domestic and industrial pollution.

Such results suggest that ITS can be used as nuclear marker for the genetic analysis of population such as *P. purpuratus* that probably are changing its genetic structure by environmental stress, and fixing changes on its genotypes and haplotypes frequencies between the populations. Such variation could to maintain the equilibrium in accordance with the environmental conditions uniformity.

Keywords: ITS, *Perumytilus purpuratus*, population genetic, biomarkers, ribosomal DNA.

1. INTRODUCCIÓN

En bivalvos, los estudios de genética de poblaciones se han enfocado en la búsqueda de polimorfismos que puedan ser usados como marcadores para diferenciación de individuos, especies o poblaciones. Para esto se han usado tanto estudios con aloenzimas (Venier et ál., 2003; Skibinski, 1994), como estudios con el ADN nuclear y el ADN mitocondrial analizando la hibridización ADN-ADN para análisis filogenético (Milyutina y Petrov, 1989), el polimorfismo del ADN por amplificación de secuencias al azar y el uso de enzimas de restricción, para determinar variación en el ADN mitocondrial entre especies (Skibinski, 1985; Blot et ál., 1990; Gardner y Skibinski, 1991; Geller et ál., 1994; Toro, 1998). Asimismo, las secuencias repetidas en grupos altamente diversos como los microsátélites y minisátélites, así como las regiones espaciadoras transcritas internas del ADNr nuclear, son marcadores moleculares muy usados en análisis filogenéticos y estudios poblacionales.

Para el caso del ADN nuclear se han usado secuencias repetitivas codificadoras y no codificadoras (importantes porque su variación puede ser independiente de la selección natural) cuyo potencial para detectar variación, en algunos casos, es mucho mayor que con el ADN mitocondrial. Los genes ribosomales nucleares (28S y 18S) han sido ampliamente usados en sistemática molecular de vertebrados, dado que su tasa de evolución es extremadamente baja (Skibinski, 1994) y las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS1, ITS2) y externas (ETS), así como los segmentos de expansión del ARN ribosomal 28S que evolucionan rápidamente y, por ende, son ampliamente variables, también son muy utilizados para comparar especies muy cercanas de invertebrados, tales como crustáceos, esponjas y bivalvos, entre otros (Chu et ál., 2001; Wörheide et ál., 2004). De igual forma, la región espaciadora intergénica (IGS) evoluciona muy rápidamente y puede ser usada en comparaciones de subespecies o poblaciones dentro de una especie (Phillips et ál., 1992; Mindell y Honeycutt, 1990; Williams et ál., 1988; Hillis y Davis, 1988). Sin embargo, pocos son los trabajos enfocados al uso del DNA nuclear como marcador de polimorfismos en bivalvos. En estos se ha usado el gen de la Calmodulina

(Corte-Real et ál., 1994), de la proteína adhesiva-Glue-5 (Inoue et ál., 1995; Toro, 1998), de la MAL-1 (Rawson et ál., 1999) y de la región ITS (Coleman y Vacquier, 2002; López-Piñón et ál., 2002; Yu et ál., 2000; King et ál., 1999).

Para el caso de *Perumytilus purpuratus*, conocido como chorito maico y chorito en Chile, Mejillón del Sur en Argentina y Choro en Perú, nada se ha hecho con respecto al estudio genético de sus poblaciones a pesar de que esta es una especie bentónica muy abundante en la zona intermareal rocosa. Esta especie tiene una amplia distribución geográfica que abarca en el Pacífico desde Ecuador hasta Isla Hermite en Cabo de Hornos y Estrecho de Magallanes, y en el Atlántico hasta Santa Cruz, Argentina (Osorio y Bahamonde, 1968; Ramorino y Campos, 1979). Esta especie desova durante todo el año en la zona central de Chile, y dada su alta fecundidad se sugiere que la estructura genética de estas poblaciones puede ser afectada por factores bióticos y abióticos, ya sea de manera selectiva o al azar. Entre dichos factores se incluye la contaminación de las áreas costeras chilenas, que en las pasadas décadas se ha visto particularmente afectada por el auge en la explotación del cobre en la zona norte y por el desarrollo de la industria pesquera en la zona centro-sur, además del crecimiento de la población, que ha llevado a un incremento en la contaminación antropogénica en dichas áreas. De ahí que los bivalvos sean usados actualmente como organismos bioindicadores de contaminación marina por varias ventajas que incluyen: su abundancia, distribución cosmopolita en muchas áreas templadas alrededor del mundo (caso *Mytilus spp.*) y su estilo de vida bentónico, que les permite a través de la filtración acumular muchos de los contaminantes orgánicos o metálicos que llegan a estas áreas (Dondero et ál., 2006). En el caso de *Perumytilus purpuratus*, su amplia distribución geográfica en Chile y su alta tasa de fecundidad lo convierten en un buen candidato para estudiar el efecto de la contaminación sobre sus poblaciones. De hecho, actualmente se desarrollan estudios con aloenzimas que muestran de manera preliminar diferencias en la estructura de las poblaciones entre hábitat contaminados y no contaminados. En ese sentido, el análisis de loci genéticos polimórficos de la región ITS pueden proveer mayores datos con respecto a la estructura genética de dichas poblaciones, a sabiendas de que esta región específica del genoma al parecer evoluciona neutralmente y, por ende, su polimorfismo será producto de selección neutral dentro de las poblaciones. Es así como el objetivo de este estudio fue determinar si la región ITS en *Perumytilus purpuratus* puede ser usada como un marcador genético nuclear en poblaciones sometidas a estrés ambiental por contaminación, con el fin de complementar los estudios que se están realizando con aloenzimas en esta especie.

2. METODOLOGÍA

2.1 Área de estudio

Se tomaron muestras de *Perumytilus purpuratus* en verano de 2002 en dos áreas costeras contaminadas del norte de Chile, cerca de la ciudad de Antofagasta a 24° latitud sur; la primera estación (AN1) se ubicó en la ensenada Coloso, que recibe todos los desechos de la explotación del cobre desde hace más de 20 años, y la segunda estación (AN2) se



Figura 1. Sitios de muestreo. C: área control en Concepción, región del Maule. AN1: Estación Coloso, Antofagasta. AN2: Área de descargas domésticas e industriales en la ciudad de Antofagasta.

ubicó en el área de descarga al mar de los efluentes domésticos e industriales de la ciudad. Como área control (C) se tomaron muestras de un lugar no impactado en la bahía de Concepción a 37° de latitud sur (figura 1).

2.2 Extracción de ADN

El ADN genómico total fue extraído de aproximadamente 50 mg de tejido del músculo aductor de cada uno de los 50 especímenes muestreados en cada área de estudio. El músculo fue removido y desmenuzado suavemente y luego digerido con 500 ml de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl (pH 8.0); 1% SDS; 25 MmEDTA) con 200 mg de proteinasa K a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente se adicionó 500 ml de fenol saturado-cloroformo-alcohol isoamílico (24:24:1) y se precipitó el ADN a -20 °C por 2 horas con 2,5 volúmenes de etanol. El ADN extraído fue resuspendido en 200 ml de TE (10 mmol/l Tris-HCl, pH 8.0, 1mmol/L EDTA) y guardado a -20 °C hasta su uso. La calidad y cantidad de ADN fueron evaluadas por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con 0,5 mg/L de bromuro de etidio.

2.3 Amplificación por PCR

Se realizó amplificación de la región espaciadora interna transcrita (ITS-1) del ADNr con los cebadores ITS18D 5'-CACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTG-3' e ITS28U 5'-CGTTACTGGGGGAATCCTGGT-3' descritos por Hillis y Dixon (1991).



Las amplificaciones fueron realizadas con mezclas de 30 µL de reacción que contenía: 1 µl de ADN molde (50 ng/µl) de cada uno de los individuos, 2,5 µM de dNTPs, 25 µM MgCl₂, 4 µM de cada cebador y 1 unidad de Taq polimerasa. A la mezcla de reacción se adicionó una gota de aceite mineral para prevenir la evaporación durante el PCR. El protocolo termal constó de una denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos con denaturación a 95 °C por 1 minuto, alineamiento a 50 °C por 1 minuto, extensión a 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C por 5 minutos. Los productos amplificados fueron observados y fotografiados con luz UV por tinción con bromuro de etidio en geles de agarosa al 2% que se dejaron correr por 1,5 horas a 80 voltios.

2.4 Análisis de restricción

Para este análisis se realizó inicialmente digestión con varias enzimas para determinar cuál de ellas mostraba un mejor patrón de restricción que permitiera la comparación de las poblaciones. Una cantidad de 10,7 μ L de producto amplificado de cada individuo fue digerido 3 horas a 37 °C con 0,5 unidades de las enzimas de restricción DpnII, MspI y HaeIII, AvaII, DdeI, HinfI, NciI, RsaI, HhaI, AluI, NlaIII, y a 65 °C con 0,5 unidades de la enzima TaqI, en un volumen total de 14 ml. Los productos digeridos fueron corridos durante 2 horas a 60 voltios en geles de agarosa al 3% y visualizados por luz UV con bromuro de etidio (0,5 mg/L).

2.5 Análisis de datos

Para determinar las distancias entre frecuencias alélicas de las poblaciones muestreadas se usó el programa TFGA versión 1.3 (Miller, 2000).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La amplificación de la región ITS de *Perumytilus purpuratus* generó dos productos de PCR de aproximadamente 1300 y 1100 pb. La mayoría de los individuos presentaron el amplicón de 1300 pb, mientras que muy pocos individuos presentaron sólo el amplicón de 1100 pb y algunos, ambos amplicones (figura 2).

Para corroborar que tales diferencias no correspondían a artefactos del PCR, se realizaron varias amplificaciones en las que se observó un comportamiento reproducible por individuo y por amplificación en las poblaciones muestreadas. Con base en lo anterior, la presencia de dos bandas ITS de diferente tamaño pudo deberse a:

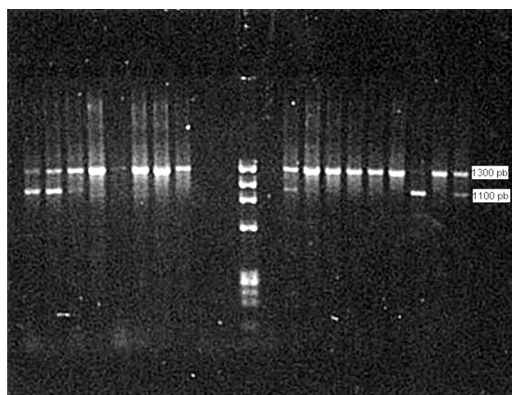


Figura 2. Amplificación de la región ITS para la población de Concepción. Al centro está el marcador de peso molecular ϕ X174 digerido con HaeIII. Los demás carriles muestran los tres haplotipos encontrados dentro de la población: individuos homocigotos para el alelo A1/A1 (banda de 1300 pb), individuos homocigotos para el alelo A2/A2 (banda de 1100 pb) e individuos heterocigotos para ambos alelos A1/A2 (con bandas de 1300 y 1100 pb, respectivamente).

1. La región ITS de *Perumytilus purpuratus* posee dos variantes alélicas que se hacen evidentes como bandas de diferente tamaño, representando alelos homólogos del mismo locus, como ha sido sugerido por Grosberg et ál. (1996). Así que al amplificar la región ITS, se observa que los homocigotos tienen bandas simples y los heterocigotos dos bandas, de la misma forma como se ha reportado con minisatélites (Skibinski, 1994), con la región repetitiva del gen de la proteína adhesiva (Inoue et ál., 1995) y con el gen de la Calmodulina de *M. edulis* (Corte-Real et ál., 1994), en el que las dobles bandas correspondieron a individuos heterocigotos. En todo caso, esto podría corroborarse demostrando heredabilidad de dichos alelos a través de cruces en la población.
2. Se está dando la amplificación simultánea de dos loci de la región ITS, lo cual se corroboraría por diferencia en la secuencia de ambos productos de amplificación.
3. Los heterocigotos están indicando la presencia de híbridos dentro de la población con una especie simpátrica que tiene el haplotipo de 1100 pb, como lo han reportado Inoue et ál. (1995) al amplificar el gen de la proteína adhesiva, y Rawson et ál. (1999) al amplificar tres marcadores nucleares (ITS, MAL-1 y GLU-5) en especies de *Mytilus*. Para evaluar esta alternativa se amplificó la región ITS de una población (40 individuos) de *Semimytilus algosus* también conocido como Chorito negro, que es la población más cercana y abundante que comparte la zona intermareal con *P. purpuratus*. Como se observa en la figura 3, dicha población presentó tres alelos de la región ITS de 1500, 1400 y 1300 pb. Complementariamente se digirió con la enzima MspI la banda de 1300 pb común a *P. purpuratus* y *S. algosus*, y se obtuvo un patrón de digestión similar en ambas especies. Los dos resultados indican que aunque puede existir similitud en las secuencias de este alelo para ambas especies, la ausencia de la banda de 1100 pb en la población muestreada de *S. algosus* corrobora que los individuos que presentan ambas bandas en las poblaciones de *P. purpuratus* no son híbridos de ambas especies sino individuos heterocigotos para ambos alelos dentro de la población.

Con base en lo anterior, se denotó a los dos alelos ITS como A1 (banda de 1300 pb) y A2 (banda de 1100 pb), y a los tres genotipos producto de su combinación como A1/A1, A1/A2, A2/A2. Luego se calculó la frecuencia de aparición (%) de cada genotipo en cada población, como se describe en la tabla 1.

El genotipo A1/A1 considerado como homocigoto fue el más frecuente en los tres sitios muestreados, con valores que oscilaron desde el 77,5% (en el área control, C) hasta el 96,7% (en la estación AN2), seguido por el genotipo heterocigoto A1/A2 cuya máxima frecuencia (17,5%) se presentó en el sitio control, y por el genotipo homocigoto A2/A2 que fue muy poco frecuente (máximo 5% en la estación AN1) o no apareció (estación AN2). Estos resultados indican que la población ubicada cerca del área de descarga doméstica en Antofagasta (AN2) presentó restricción de uno de los alelos de la región ITS o débil selección contra heterocigotos, que se reflejó en una muy baja frecuencia (<3,3%) del genotipo A1/A2 dentro de la población. Para determinar si existía mayor polimorfismo o variabilidad dentro de las poblaciones muestreadas, se realizó la digestión de la banda de 1300 pb, con 12 diferentes enzimas de restricción. Los resultados



Figura 3. Amplificación de la región ITS en *Semimytilus algosus* y *Perumytilus purpuratus*, mostrando diferentes bandas (alelos) entre ellos. Carril 1: marcador de peso molecular ϕ X174 digerido con HaeIII; los carriles 2, 3 y 4 muestran tres bandas (alelos) de amplificación de *S. algosus* (carril 2: 1 banda de ~1300 pb; carril 3: 2 bandas de ~1300 y 1400 pb, y carril 4: 1 banda de ~1500 pb); los demás carriles corresponden a haplotipos de *P. purpuratus*.

mostraron que aunque todas las enzimas digirieron el amplificado en mayor o menor grado, sólo la digestión con DpnII, Taq α I, HhaI y MspI permitió una mejor resolución de los fragmentos, y que sólo la digestión con HhaI y Taq α I mostró polimorfismo dentro de las tres poblaciones, dando lugar a tres haplotipos característicos.

Tabla 1. Porcentaje de frecuencia de genotipos ITS de *Perumytilus. purpuratus* en las tres poblaciones estudiadas. (A1/A1=homocigoto para el alelo A1:1300 pb; A2/A2=homocigoto para el alelo A2:1100 pb; A1/A2=heterocigoto para ambos alelos). Estación: C: área control en concepción, AN1: Coloso, Antofagasta; AN2: descargas domésticas e industriales.

Genotipos ITS	C	AN1	AN2
(n) muestreados	50	40	40
A1/A1	77,5	79,3	96,7
A1/A2	17,5	17,2	3,3
A2/A2	5	3,4	0,0

Con la enzima HhaI (figura 4a) se observó un haplotipo (A) con 5 fragmentos de aproximadamente 320, 251, 234, 160 y 118 pb, un haplotipo (B) con 6 fragmentos de aproximadamente 340, 320, 251, 234, 160 y 118 pb y un haplotipo (C) con 5 fragmentos de

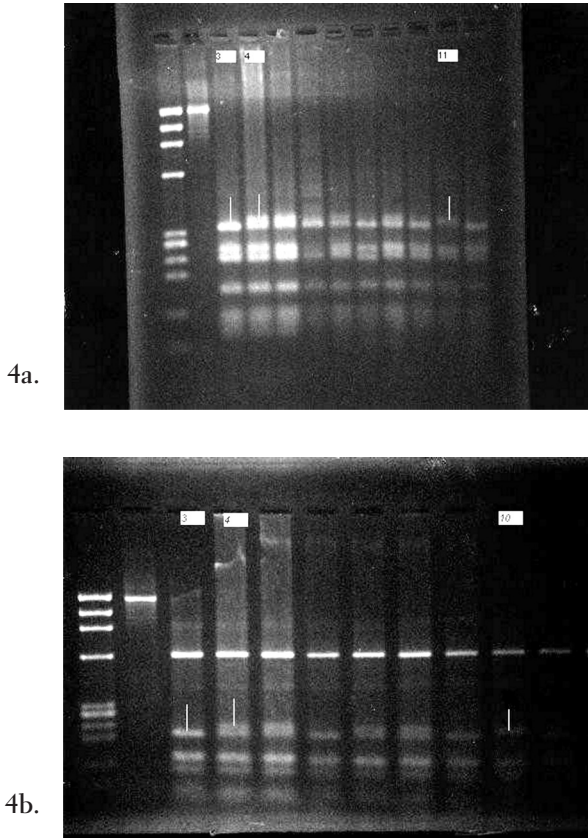


Figura 4. Fragmentos de restricción obtenidos al digerir la banda de 1300 pb (Alelo A1) de la región ITS en individuos la población control (C). A. Digestión con HhaI. B: Digestión con Taq α I. En ambos se tiene en carril 1: marcador de peso molecular ϕ X174 digerido con HaeIII; carril 2: alelo A1 no digerido. Los tres diferentes haplotipos se observan al digerir con HhaI en el carril 3, 4 y 11, y al digerir con Taq α I en el carril 3, 4 y 10, respectivamente. Se señalan las bandas características de cada haplotipo.

aproximadamente 330, 251, 234, 160 y 118 pb. Con la enzima Taq α I (figura 4b) se observó el haplotipo (A) con 5 fragmentos de aproximadamente 600, 195, 130, 110 y 70 pb, el haplotipo (B) con 6 fragmentos de aproximadamente 600, 220, 195, 130, 110, 70 pb, y un haplotipo (C) con 5 fragmentos de aproximadamente 600, 210, 130, 110 y 70 pb.

El análisis de las frecuencias de aparición de estos haplotipos en conjunto para las diferentes poblaciones (tabla 2) mostró que hay una tendencia a la disminución de la frecuencia de los haplotipos B (20%) y C (5%) en la población AN2 respecto de la población control y AN1, en las cuales los tres haplotipos se mantienen con frecuencias similares. Ambos resultados sugieren restricción en el flujo de genes en la población de *P.*

purpuratus en el área AN2 cerca de Antofagasta, que puede estar dada por efectos locales físicos, como cambios de salinidad, temperatura, incremento de la turbiedad y contaminantes, o variación en los regímenes de corrientes que están afectando la dispersión, el reclutamiento o la sobrevivencia de las larvas. En este sentido, se ha sugerido para otras especies de bivalvos que el exceso de homocigotos en poblaciones de *M. edulis* en un área estuarina y de *M. trossolus* (gen MAL-1) en la costa Pacífica norteamericana podría asociarse con restricciones hidrográficas (Corte-Real et ál., 1994) y la distribución geográfica e introgresión de las poblaciones a lo largo de la costa (Rawson et ál., 1999), y que el polimorfismo intrapoblacional de *M. desolationis* podría estar además relacionado con el factor contaminación (Blot, 1990).

Tabla 2. Porcentaje de frecuencia de los haplotipos obtenidos luego de la digestión del amplicón correspondiente al alelo A1 con HhaI y TaqαI en las tres poblaciones de *P. purpuratus* estudiadas. Haplotipo (A): 5 fragmentos, (B): 6 fragmentos y (C): 5 fragmentos. Estación: C: área control Maule, AN1: Estación Coloso, AN2: área de descargas domésticas e industriales.

Haplotipos	C	AN1	AN2
(n) muestreados	20	20	20
A	50,0	35,0	75,0
B	34,0	55,0	20,0
C	16,0	10,0	5,0

En general, los resultados mostraron que las poblaciones de *P. purpuratus* exhibieron tres genotipos ITS y tres haplotipos de restricción característicos y comunes para las tres poblaciones muestreadas. Además, el análisis estadístico estableció que la distancia genética entre las frecuencias alélicas en la estación AN2 son significativamente diferentes de la estación Control (probabilidad 0,01) y de la estación AN1 (probabilidad 0,06), lo cual corrobora las observaciones previas de las frecuencias de aparición de genotipos y haplotipos (tablas 1 y 2). Tales resultados sugieren que la disminución de la frecuencia de genotipos y haplotipos ITS, la reducción de heterocigotos y la tendencia a la desaparición de un alelo en el área AN2 podrían estar relacionadas con las continuas descargas de contaminantes domésticos e industriales, así como con el tipo y la cantidad de los mismos, que pueden estar llevando a cambios en la estructura genética de esta población respecto de lo observado en la estación AN1, que aunque contaminada por residuos de la explotación del cobre principalmente, no presentó cambios significativos (probabilidad 0,8) en la distancia genética de las frecuencias alélicas de ITS o en la frecuencia de aparición de los haplotipos de digestión con respecto al sitio control. En este sentido se ha reportado que los bivalvos son capaces de acumular grandes cantidades de contaminantes como el Cu en el lumen digestivo y de realizar una eficiente exocitosis, lo cual

podría explicar dicho comportamiento. Sin embargo, se considera que la mezcla de contaminantes orgánicos e inorgánicos producto de las actividades industriales en las áreas costeras son una de las principales causas del daño en el ADN y alteraciones citogenéticas, así como de la disminución de heterocigosis y cambios en la frecuencia genotípica en varios loci enzimáticos tanto en *Mytilus spp.* (Hummel y Patarne- llo, 1994; Hoare et ál., 1994) como en *M. galloprovincialis* (Venier et ál., 2003) y en bivalvos en general (Moore, 1985).

Lo anterior significa un riesgo de las poblaciones naturales a la pérdida de variabilidad genética, en pos de la fijación de alelos que permiten una mejor sobrevivencia en las condiciones de estrés, lo cual en el futuro representa una pérdida de éxito o *fitness* del organismo a la hora de enfrentarse a alteraciones ambientales venideras.

Para ampliar la perspectiva ante este probable cambio en la estructura genética de *Perumytilus purpuratus* se deben usar otros marcadores nucleares que evolucionan a altas tasas, como Mal-1, Glu-5, ETS o IGS, o marcadores mitocondriales como el de Citocromo Oxidasa, NADH o D-Loop, para corroborar variabilidad intrapoblacional, así como estudiar diferencias en el gen de las metalotioneínas y catalasas, o de aquellos que codifican proteínas de resistencia a metales, que aunque sean conservados y no tan variables, se relacionan estrechamente con el metabolismo y la homeóstasis de los metales en áreas sometidas a fuerte contaminación (Zehr y Hiorns, 1998), convirtiéndose en buenos bioindicadores por las fuertes variaciones en sus patrones de expresión (Dondero et ál., 2006). Sin embargo, se debe estudiar más sobre la fisiología básica de los bivalvos, su estatus reproductivo y nutritivo, su respuesta ante la mezcla de contaminantes complejos orgánicos e inorgánicos, para establecer una batería de biomarcadores (nucleares, mitocondriales, bioquímicos e histoquímicos) que ayuden a determinar cómo reaccionan los individuos y luego sí las poblaciones ante las condiciones de estrés ambiental.

CONCLUSIONES

La región ITS puede ser usada como un marcador nuclear complementario a los estudios realizados con aloenzimas para detectar polimorfismo intrapoblacional en *Perumytilus purpuratus*. El polimorfismo fue observado a través de la presencia de dos alelos y tres genotipos producto de amplificación de la región ITS, así como por la generación de tres haplotipos característicos, producto de la digestión con las enzimas Taq α .1 y HhaI.

Los resultados muestran que se está dando una selección a favor de uno de los alelos ITS con una concomitante pérdida de variabilidad alélica en la población de *P. purpuratus* que está siendo sometida a fuerte estrés ambiental por la descarga de aguas domésticas e industriales cerca de la ciudad de Antofagasta. Sin embargo, estudios más detallados y complementarios son requeridos para determinar cuáles son los factores físico-químicos, hidrológicos o geográficos que inciden directa o indirectamente sobre la fijación de dichos cambios en la población.


AGRADECIMIENTOS

A R. Galleguillo y R. Montoya por su colaboración en el trabajo del laboratorio y en el análisis estadístico, y a Minera Escondida Ltda. Por la consecución de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

- BLOT, M., LENDRE, B. & ALBERT, P. (1990). Restriction fragment length polymorphism of mitochondrial DNA in sub-Antarctic mussels. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 141, 79-86.
- COLEMAN, A. W. & VACQUIER, V. D. (2002). Exploring the phylogenetic utility of ITS sequences for animals. A test case for Abalone (*Haliotis*). *Journal of molecular evolution*, 54(2), 246-257.
- CORTE-REAL, H. B. S. M., DIXON, D. R. & HOLLAND, P. W. H. (1994). Intron-targeted PCR: A new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve populations. *Marine Biology*, 120 (3), 407-414.
- CHU, K. H., LI, C. P. & HO, H. Y. (2001). The first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in *Crustacea*. *Marine Biotechnology*, 3, 355-361.
- DONDERO, F., DAGNINO, A., JONSSON, H., CAPRI, F., GASTALDI, L. & VIARENCO, A. (2006). Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/gene expression approach. *Aquatic Toxicology*, 78S, S13-S24.
- GARDNER, J. P. A. & SKIBINSKI, D. O. F. (1991). Mitochondrial DNA and allozyme covariation in a hybrid mussel population. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 149 (1), 45-54.
- GELLER, J. B., CARLTON, J. T. & POWERS, D. A. (1994). PCR-based detection of mtDNA haplotypes of native and invading mussels on the North-eastern Pacific coast: latitudinal pattern of invasion. *Marine Biology*, 119, 243-249.
- GROSBERG, R. K., LEVITAN, D. & CAMERON, B. (1996). Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR marker: A random primer for the novice and nervous. En: FERRARIS, J. D. & PALUMBI, S. R. (Eds.). *Molecular Zoology: Advances, strategies, and protocols* (pp. 250-300). Wiley-Liss, Inc.
- HILLIS, D. M. & DAVIS, S. K. (1988). Ribosomal DNA: Intraspecific polymorphism, concerted evolution, and phylogeny reconstruction. *Systematic Zoology*, 37(1), 63-66.
- HILLIS, D. M. & DIXON, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *The quarterly review of biology*, 66(4), 411-453.
- HOARE, K., BEAUMONT, A. R. & DAVENPORT, J. (1994). Effects of copper exposure during early life stages on heterozygosity in laboratory-reared mussel (*Mytilus edulis* L.) populations. En: BEAUMONT, A. R. (Ed.), *Genetics and Evolution of Aquatic organisms* (p. 436). London, England. Chapman & Hall.

- HUMMEL, H. & PATARNELLO, T. (1994). Genetic effects of pollutants on marine and estuarine invertebrates. En: BEAUMONT, A. R. (Ed.), *Genetics and Evolution of Aquatic organisms* (p. 325). London, England: Chapman & Hall.
- INOUE, K., WAITE, J. H., MATSUOKA, M., ODO, S. & HARAYAMA, S. (1995). Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and *M. trossulus*. *Biological Bulletin*, 189 (3), 370-375.
- KING, T. L., EACKLES, M. S., GJETVAJ, B. & HOEH, W. R. (1999). Intra-specific phylogeography of *Lamigona subviridis* (Bivalvia: Unionidae): conservation implications of range discontinuity. *Molecular Ecology*, 8, S65-S78.
- LÓPEZ-PIÑÓN, M. J., INSUA, A. & MÉNDEZ, J. (2002). Identification of four scallop species using PCR and restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region. *Marine Biotechnology*, 4(5), 495-502.
- MILLER, M. P. (2000). Tools for population genetic analyses (TFPGA) version 1.3. Department of Biological Sciences Northern Arizona University.
- MILYUTINA, I. A. & PETROV, N. B. (1989). Divergence of unique DNA sequences in bivalve molluscs of subfamily Mytilinae (Bivalvia Mytilidae). *Molecular Biology*, 23, 1091-1098.
- MINDELL, D. P. & HONEYCUTT, R. L. (1990). Ribosomal RNA in vertebrates: Evolution and phylogenetic applications. *Annual Review of Ecology and Systematic*, 21, 541-566.
- MOORE, M. N. (1985). Cellular responses to pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, 16(4), 134-139.
- OSORIO, C. & BAHAMONDE, N. (1968). Los moluscos bivalvos en las pesquerías chilenas. *Biología Pesquera Chile*, 3, 69-128.
- PHILLIPS, R. B., PLEYTE, K. A. & BROWN, M. R. (1992). Salmonid phylogeny inferred from ribosomal DNA restriction maps. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49, 2345-2353.
- RAMORINO L. & CAMPOS, B. (1979). Desarrollo larval y postlarval de *Perumytilus purpuratus* (Lamarck, 1819). *Anales del Museo de Historia Natural*, 12, 207-214.
- RAWSON, P. D., AGRAWAL, W. & HILBISH, T. J. (1999). Hibridization between the blue mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* along the Pacific coast of North America: evidence for limited introgression. *Marine Biology*, 134, 201-211.
- SKIBINSKI, D. O. F. (1985). Mitochondrial DNA variation in *Mytilus edulis* L. and the Padstow mussel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 92, 251-25.
- SKIBINSKI, D. O. F. (1994). DNA technology and genetics of aquatic invertebrates. En: Beaumont, A. R. (Ed.), *Genetics and Evolution of Aquatic organisms*, (pp. 223-245). London, England: Chapman & Hall.
- TORO, J. E. (1998). PCR-based nuclear and mtDNA markers and shell morphology as an approach to study the taxonomic status of the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis* (Bivalvia). *Aquatic Living Resources*, 11(5), 347-353.

- VENIER, P., TALLANDINI, L. & BISOL, P. M. (2003). Characterization of coastal sites by applying genetic and genotoxicity markers in *Mytilus galloprovincialis* and *Tapes philippinarum*. *Chemistry and Ecology*, 19(2-3), 113-128.
- WILLIAMS, S. M., DEBRY, R. W. & FEDER, J. L. (1988). A commentary on the use of ribosomal DNA in systematic studies. *Systematic Zoology*, 37(1), 60-62.
- WÖRHEIDE, G., NICHOLS, S. A. & GOLDBERG, J. (2004). Intragenomic variation of the rDNA internal transcribed spacers in sponges (Phylum Porifera): implications for phylogenetic studies. *Molecular phylogenetics and evolution*, 33(3), 816-830.
- YU, E. T., JUINIO-MEÑEZ, M. A. & MONJE, V. D. (2000). Sequence variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Tridacna crocea*. *Marine Biotechnology*, 2(6), 511-516.
- ZEHR, J. P. & HIORNS, W. D. (1998). Molecular approaches to studies of the activities of marine organisms. En Keith, E. & Cooksey, L. (Eds.), *Molecular approaches to the study of the ocean* (pp. 500-550). London, England: Chapman & Hall. 

Referencia	Recepción	Aprobación
CASTRO G., M.; SÁNCHEZ, R.; TRONCOSO, L. ITS como marcador nuclear de polimorfismo en poblaciones de <i>Perumytilus</i> <i>Revista Tumbaga</i> (2008), 3, 128-140	Día/mes/año 22/02/2008	Día/mes/año 05/10/2008