



**ESTUDIO MOLECULAR DE SECUENCIAS DE COPIA ÚNICA
Y DE ADN SATÉLITE EN MEJILLÓN**

Fernanda Rodríguez Fariña



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

ESTUDIO MOLECULAR DE SECUENCIAS DE COPIA ÚNICA
Y DE ADN SATÉLITE EN MEJILLÓN

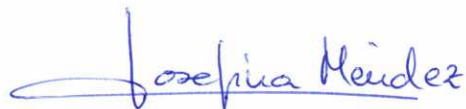
Memoria que para optar al Título de Doctora
presenta Fernanda Rodríguez Fariña

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 “Estudio molecular de secuencias de copia única y de ADN satélite en mejillón” presentado por Dña. Fernanda Rodríguez Fariña para optar al Título de Doctora en Biología ha sido realizado bajo nuestra dirección en el laboratorio de Genética del Departamento de Biología Celular y Molecular.

La Coruña, 16 de Marzo de 2001



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, 11F97-1295).

AGRADECIMIENTOS

En un trabajo que se realiza durante tantos años, son muchas las personas que de una forma u otra ayudan a la elaboración del mismo. Esperando no olvidarme de nadie, quisiera expresar mi sincero agradecimiento:

A la Dra. Josefina Méndez Felpeto y al Dr. Andrés Martínez Lage, directores de este trabajo, por su orientación, estímulo y dedicación constante, así como por su importante papel y los muchos momentos de su tiempo dedicados a mi formación científica.

A la Dra. Ana González Tizón por aportar sus conocimientos y comentarios, por su inestimable amistad y motivación durante todo este tiempo.

Al Dr. Luis Cornudella Mir por sus sugerencias y colaboración proporcionándome las sondas de ADN satélite, sin las cuales no hubiese sido posible la realización de una parte importante de este estudio.

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) y a ANFACO-CECOPECA por su colaboración en la obtención de mejillones de las poblaciones analizadas.

A mis compañeros del Área de Genética con los que he compartido muchas horas de laboratorio, dificultades y alegrías. Todos ellos han proporcionado un ambiente agradable y un importante apoyo moral y humano durante estos años, haciendo más fácil la realización de esta memoria.

A mis amigos, en especial a Cris, Eli, Fe y Mara, por su apoyo y ánimo constante en todos los momentos.

A todos que atendiendo, aconsejando o comprendiendo me han ayudado, GRACIAS.

A mi familia

A Pablo

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Taxonomía del género <i>Mytilus</i>	3
1.2. Características Citogenéticas del género <i>Mytilus</i>	7
1.3. Estudios Moleculares en el género <i>Mytilus</i>	10
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS	27
3.1. Material de Estudio	29
3.2. Extracción de ADN genómico	30
3.3. Extracción de ADN plasmídico	31
3.4. Electroforesis y cuantificación de ADN	32
3.5. Digestiones con endonucleasas de restricción	32
3.6. Amplificación de secuencias de copia única	33
3.7. Amplificación de la región ITS y de la fracción PLIIa	34
3.8. Marcaje de sondas	36
3.9. Análisis del ADN satélite <i>Apa I</i> mediante hibridación Southern Blot	36
3.9.1. Electroforesis y transferencia a membrana	36
3.9.2. Prehibridación e hibridación de la membrana	37
3.9.3. Lavados posthibridación y detección de la hibridación	37
3.10. Hibridación Dot Blot	38
3.11. Diseño de <i>primers</i> para el ADN satélite <i>Apa I</i>	39
3.12. Secuenciación del ADN satélite <i>Apa I</i>	40
3.12.1. Clonación de los tres tipos de secuencias ADN satélite	40
3.12.2. Detección, selección y mantenimiento de los transformantes	40
3.12.3. Secuenciación de ADN	41
3.13. Hibridación <i>in situ</i> sobre cromosomas	41
3.13.1. Obtención de metafases de individuos adultos	41
3.13.2. Pretratamiento de las preparaciones citológicas	42
3.13.3. Hibridación	42

3.13.4. Lavados posthibridación y bloqueo	42
3.13.5. Detección de la hibridación	43
3.13.6. Microscopía y Fotografía	43
3.14. Análisis filogenético	43
3.14.1. Análisis de secuencias de copia única	43
3.14.2. Análisis de las secuencias ADN satélite <i>Apa I</i>	44
4. RESULTADOS	45
4.1. Secuencias de copia única	47
4.1.1. Amplificación de la fracción PLIIa de la proteína <i>protamine-like</i> esperma específica PLII	47
4.1.2. Amplificación de la proteína <i>protamine-like</i> esperma específica PHI-1	50
4.1.3. Amplificación del intrón 3 del gen de la calmodulina (CaM1)	51
4.1.4. Amplificación del extremo 5' del exón gigante de la proteína polifenólica adhesiva del biso (Glu-5')	53
4.1.5. Amplificación de la región no repetitiva de la proteína del pie 1 (NRPP)	56
4.1.6. Análisis filogenético del género <i>Mytilus</i> mediante secuencias de copia única	58
4.2. Secuenciación del ADN satélite <i>Apa I</i>	60
4.2.1. Análisis de la variabilidad intraespecífica	61
4.2.2. Análisis de la variabilidad interespecífica entre clones de ADN satélite	76
4.3. Análisis filogenético de las secuencias consenso del ADN satélite <i>Apa I</i>	92
4.4. Amplificación de secuencias ADN satélite <i>Apa I</i>	102
4.5. Determinación del número de copia de secuencias ADN satélite <i>Apa I</i>	106
4.6. Análisis Southern blot de secuencias ADN satélite <i>Apa I</i>	109
4.6.1. Análisis del ADN satélite <i>Apa I</i> en <i>M. galloprovincialis</i>	109
4.6.2. Análisis del ADN satélite <i>Apa I</i> en diferentes especies de mejillón	113
4.7. Hibridación <i>in situ</i>	115

4.8. Utilización de las secuencias ADN satélite <i>Apa I</i> para la identificación de mejillones	117
5. DISCUSIÓN	121
5.1. Secuencias de copia única en mejillón	123
5.2. ADN satélite <i>Apa I</i> de mejillón	129
5.2.1. Características generales	130
5.2.2. Origen y Evolución	133
5.3. Análisis filogenético y Origen del género <i>Mytilus</i>	141
5.4. Utilización de marcadores de ADN en la identificación de especies comerciales de mejillón	145
6. CONCLUSIONES	149
7. BIBLIOGRAFÍA	153
8. APÉNDICE	177
8.1. Abreviaturas	179
8.2. Soluciones utilizadas	180

1. INTRODUCCIÓN

1.1. TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Mytilus*

Los mejillones del género *Mytilus* (familia Mytilidae, Rafinesque 1815) se caracterizan por presentar dos valvas de contorno triangular-subcuadrangular de color negro-violáceo, hinchadas y puntiagudas en la parte anterior y redondeadas en la parte posterior, alcanzando los individuos adultos una longitud de hasta 40 centímetros. El color del interior de las valvas varía del gris-azulado al violeta y entre ellas asoma el biso, mediante el cual se fijan a las rocas u otros sustratos. En los mitílidos el músculo aductor anterior es pequeño y el posterior muy grande y presentan dientes muy pequeños situados cerca del vértice. El género *Mytilus* se diferencia de otros de la misma familia, como *Perna* y *Choromytilus*, por la presencia de varios dientes bisagra, de un músculo aductor anterior, por la impresión del músculo retractor del pie y por la forma del borde del manto (Gosling, 1992a).

La familia Mytilidae tiene su origen en el Devónico reciente, hace 350 millones de años, directamente a partir de un linaje de la familia Modiolopsidae del Ordovícico (Soot-Ryen, 1955). El género se originó, posiblemente, durante el Jurásico reciente (Cox *et al.*, 1969), no encontrándose registros fósiles de *Mytilus spp.* anteriores al Plioceno (Soot-Ryen, 1955; Cox *et al.*, 1969), y considerándose *M. edulis* la forma ancestral (Soot-Ryen, 1955; Bernard, 1983; Seed, 1990). La especiación más reciente corresponde a *M. galloprovincialis*, la cual habría ocurrido hace 1-2 millones de años durante la glaciación del Pleistoceno (Barsotti & Meluzzi, 1968). Por otra parte, Vermeij (1991) propuso la hipótesis de que *M. edulis* y *M. trossulus* invadieron el Atlántico desde el Pacífico cuando el estrecho de Bering se abrió, hace aproximadamente 3.5 millones de años, no divergiendo morfológicamente las poblaciones del Atlántico y del Pacífico hasta el punto de poder discriminar entre estas especies (Vermeij, 1991).

Linné (1758) dio una interpretación muy amplia del género, incluyendo en él unas 22 especies de géneros muy distintos, como *Ostrea*, *Anadonta* o *Hiattella*, junto con las verdaderas especies de mejillón. Posteriormente, se han hecho numerosas revisiones de los mitílidos, entre las que destacan las de Jukes-Brown (1905), Lamy (1936), Dodge (1952) y Soot-Ryen (1969).

Lamy (1936), basándose en criterios morfológicos, reconoció las siguientes especies de mejillón: *Mytilus edulis*, Linné 1758, de latitudes templadas del Norte; *M. galloprovincialis*, Lamarck 1819, del Mar Mediterráneo; *M. trossulus*, Gould 1850, de la costa pacífica de Norte América; *M. chilensis*, Hupé 1864, de Chile; *M. platensis*, d'Orbygny 1846, de Argentina; *M. planulatus*, Lamarck 1819, de Australia y *M. desolationis*, Lamy 1936 (= *M. kerguelensis*,

Fletcher), de las Islas Kerguelen en el Sur del Océano Índico (TABLA I). Soot-Ryen (1955), analizando también la morfología de la concha, reconoció 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 Norte América, aunque considera la mayoría de las especies descritas por Lamy como *M. edulis*.

TABLA I
Especies del G. *Mytilus*

Lamy (1936)	Soot-Ryen (1955)	McDonald <i>et al.</i> (1991)	Gosling (1992b)
<i>M. edulis</i>	<i>M. edulis</i>	<i>M. edulis</i>	<i>M. edulis</i>
<i>M. platensis</i>			
<i>M. chilensis</i>			
<i>M. desolationis</i>		<i>M. e. desolationis</i>	
<i>M. galloprovincialis</i>		<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. e. galloprovincialis</i>
<i>M. planulatus</i>			
<i>M. trossulus</i>		<i>M. trossulus</i>	<i>M. e. trossulus</i>
	<i>M. californianus</i>	<i>M. californianus</i>	<i>M. californianus</i>
	<i>M. coruscus</i>	<i>M. coruscus</i>	<i>M. coruscus</i>

En un principio, la separación entre *M. edulis* y *M. galloprovincialis* se basó principalmente en la morfología de la concha. Actualmente, se ha aceptado que, de las cinco o seis características morfológicas utilizadas para separar *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, la forma de la concha es la menos precisa, ya que la plasticidad de dicho carácter da lugar a diferencias entre muestras de distintas localidades que no son constantes ni adecuadas para la identificación de especies individuales (Seed, 1972, 1974; Gosling, 1984; Beaumont *et al.*, 1989). De las características internas de la concha, la longitud de la impresión del músculo aductor anterior y de la charnela, se han considerado como las dos más fiables y han sido utilizadas por varios autores para separar estas dos especies de mejillón. En la mayoría de los estudios (Lewis & Seed, 1969; Seed, 1978; Wilkins *et al.*, 1983; Grant & Cherry, 1985; Lee & Morton, 1985) estos caracteres se consideraron por separado, pero Verduin (1979) y Sanjuan *et*

al. (1990) consiguieron una separación más efectiva al combinarlos en un único índice taxonómico.

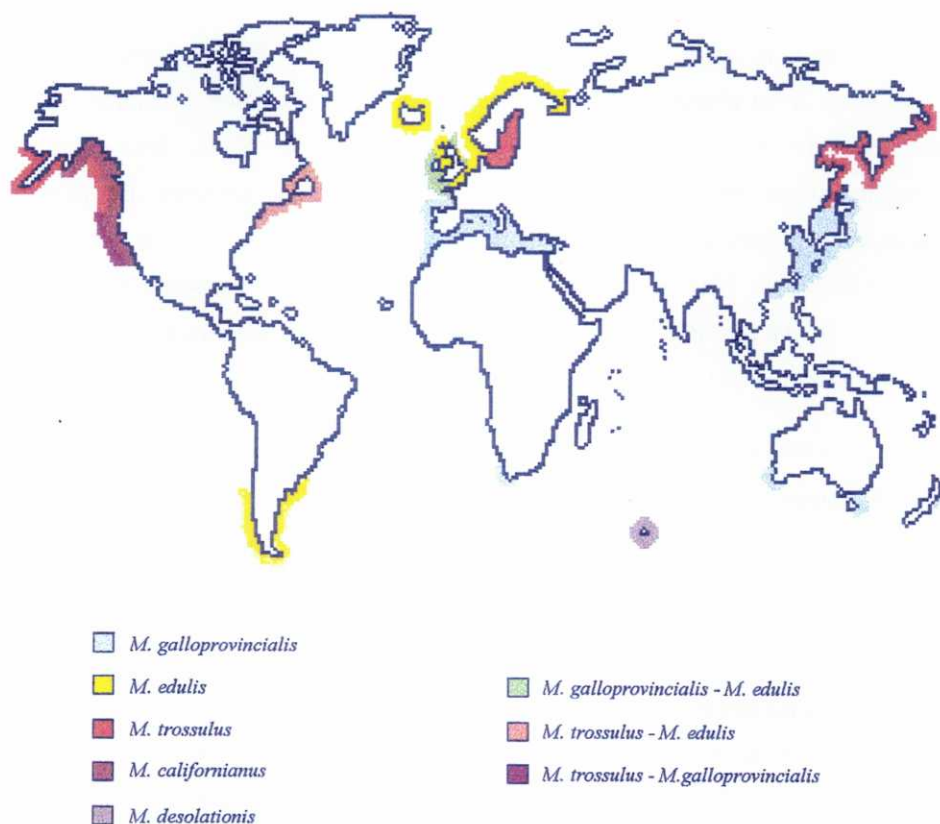
Posteriormente, McDonald *et al.* (1991), utilizaron el análisis discriminante de 18 caracteres morfométricos diferentes en muestras de distintas localidades de los hemisferios Norte y Sur. El análisis reveló tres *clusters* o grupos de individuos distintos en el hemisferio Norte, correspondientes a *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*. En el hemisferio Sur, donde *M. trossulus* no se ha identificado, las muestras de *M. edulis* resultaron ser morfológicamente intermedias entre *M. edulis* y *M. trossulus* del hemisferio Norte. Sin embargo, *M. galloprovincialis* de ambos hemisferios eran morfológicamente similares. En base a sus resultados, estos autores sugirieron que los mejillones del Sur de América, *M. chilensis* y *M. platensis*, y los de las Islas Kerguelen, *M. desolationis*, se podrían considerar *M. edulis* y los mejillones de Nueva Zelanda, *M. aoteanus*, y de Australia, *M. planulatus*, se considerarían *M. galloprovincialis* (TABLA I).

Gosling (1992b), basándose en las distancias de Nei (Nei, 1972) y las distancias euclidianas (Rogers, 1986), considera a *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* subespecies dentro del género *Mytilus* (TABLA I). Por este motivo, a estos tres tipos de mejillón se les incluye dentro del “complejo *M. edulis*”.

Las especies *M. californianus* (Soot-Ryen, 1955) y *M. coruscus* (Kira, 1962) se identifican fácilmente por la presencia de nervios radiales en la concha. Aunque, Vermeij (1989) observó que los nervios de *M. californianus* son menos prominentes en las muestras de las Islas Aleutianas que en aquellas más sureñas, y sugiere que *M. californianus* y *M. coruscus* pueden ser una única especie.

Teniendo en cuenta todos estos estudios, la distribución geográfica de las diferentes especies de mejillones pertenecientes al género *Mytilus* es la que se muestra en la FIGURA 1. En ella puede apreciarse que, en aquellas zonas donde coexisten *M. edulis* con *M. galloprovincialis*, *M. edulis* con *M. trossulus* ó *M. galloprovincialis* con *M. trossulus* se detecta la existencia de individuos híbridos. Los mejillones presentan un patrón de distribución antitropical, de forma que los taxones próximamente relacionados se encuentran en las zonas templadas de los hemisferios Norte y Sur, pero están ausentes en los trópicos (Hilbish *et al.*, 2000).

FIGURA 1. Distribución mundial de diferentes formas de *Mytilus*



Distribución basada en datos de 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 & Hvilsom, 1991; Gosling, 1992a, b; Seed, 1992; Sanjuan *et al.*, 1994.

1.2. CARACTERÍSTICAS CITOGENÉTICAS DEL GÉNERO *Mytilus*

El estudio de las características citogenéticas de una especie constituye el nivel básico de conocimiento para iniciar el análisis detallado de su genoma. La aplicación de diferentes técnicas ha aportado información sobre la genética del género *Mytilus*, contribuyendo a clarificar parcialmente el *status* taxonómico del mismo.

Uno de los primeros parámetros a determinar es el Valor-C (Swift, 1950), también denominado Tamaño de Genoma (Hinegardner, 1976), que se define como la cantidad total de ADN que constituye el genoma haploide de una especie. Los análisis cuantitativos del material hereditario han demostrado la ausencia de correlación entre la cantidad de ADN total que poseen los organismos eucariotas y su grado de complejidad estructural y funcional. Esta variación existe incluso entre especies muy relacionadas filogenéticamente (Hinegardner, 1976; Bennett & Smith, 1976). Así, especies del mismo género que presentan el mismo número de cromosomas, pueden mostrar importantes diferencias en el contenido de ADN. Esta observación es la base de lo que se conoce como la “Paradoja del Valor-C”.

Los primeros análisis del contenido de ADN en el género *Mytilus* fueron realizados por Hinegardner (1974), quién estimó el valor C de las especies *M. edulis* y *M. californianus* en 1.60 y 1.90pg respectivamente. En 1994, Ieyama *et al.* estimaron el contenido de ADN de *M. galloprovincialis* y de *M. coruscus* en 1.35 y 1.90pg, respectivamente. Posteriormente, mediante la utilización de técnicas más exactas, como la cuantificación nuclear por citometría de flujo y el análisis de imagen, Rodríguez-Juíz *et al.* (1996) obtuvieron unos valores de 1.92pg para *M. galloprovincialis* y de 1.71pg para *M. edulis* y González-Tizón *et al.* (2000), obtuvieron unos valores de 1.51pg para *M. trossulus* y de 1.61pg para *M. californianus*.

Otra de las características cariotípicas básicas es la determinación del número y de la morfología de los cromosomas. Todas las especies de *Mytilus* analizadas hasta el momento poseen un complemento diploide $2n = 28$, pero difieren en la morfología cromosómica. Como puede observarse en la TABLA II, el número de pares cromosómicos metacéntricos (m) es poco variable, mientras que el número de submetacéntricos (sm) y de subtelocéntricos (st) muestra diferencias a nivel intraespecífico e incluso intrapoblacional (Martínez-Lage *et al.*, 1996). No hay evidencias de cromosomas sexuales en este género, ni en ninguna otra especie de bivalvo (Dixon & McFadzen, 1987; Gosling, 1992b).

TABLA II
Cariotipos de *Mytilus* spp.

	<i>M. edulis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>			<i>M. trossulus</i>		<i>M. californianus</i>	<i>M. desolationis</i>
	OA	MM		OA	MB	OP	OP	OI
	(1),(2),(3),(4),(5)	(2),(4),(5)	(3),(5)	(5),(6)	(4),(5)	(7)	(7)	(2)
m	6	5	6	6	6	7	7	6
sm/st	8	9	8	8	8	7	7	8

OA = Océano Atlántico; **MM** = Mar Mediterráneo; **MB** = Mar Báltico; **OP** = Océano Pacífico; **OI** = Océano Índico; **m** = pares cromosómicos metacéntricos; **sm/st** = pares cromosómicos submeta/subtelocéntricos; **(1)** = Moynihan & Mahon, 1983; **(2)** = Thiriot-Quévieux, 1984; **(3)** = Dixon & Flavell, 1986; **(4)** = Insua *et al.*, 1994; **(5)** = Martínez-Lage *et al.*, 1996; **(6)** = Pasantes *et al.*, 1990; **(7)** = Martínez-Lage *et al.*, 1997.

Los métodos de inducción de bandas cromosómicas en distintas especies del género *Mytilus* han puesto de manifiesto la escasa cantidad de heterocromatina. *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* son las únicas especies en las que se han localizado bandas C (Dixon *et al.*, 1986; Dixon & McFadzen, 1987; Martínez-Lage *et al.*, 1994, 1995) y regiones ricas en pares de base G+C (Martínez-Lage *et al.*, 1994, 1995).

Sin embargo, existe un mayor número de estudios sobre la localización de los *loci* ribosomales mayores (18S, 5.8S y 28S). Así, mediante técnicas de tinción de los NORs con nitrato de plata (Ag-NORs) y/o mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) se han determinado las posiciones de los *loci* ribosomales en *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus* y *M. californianus*. Estos *loci* se localizan mayoritariamente en posición telomérica en cromosomas metacéntricos y submeta-subtelocéntricos, variando su número de 4 a 6 y siguiendo su distribución un patrón especie-específico (TABLA III).

TABLA III
Distribución de *loci* ribosomales en *Mytilus spp.*

ESPECIE	Nº DE <i>LOCI</i>	POSICIÓN	CROMOSOM A	AUTORES
<i>M. edulis</i>	4	Terminal, brazo largo	6 y 7	(1), (2), (4) y (8)
<i>M. galloprovincialis</i>	4	Terminal, brazo largo	6 y 7	(2), (3), (4), (5), (7) y (8)
<i>M. trossulus</i> *	6	Terminal, brazo largo	6 y 7	(2) y (4)
		Terminal, brazo corto	8	
<i>M. trossulus</i> **	6	Terminal, brazo corto	3, 7 y 9	(6) y (9)
<i>M. californianus</i>	6	Terminal, brazo corto	3, 5 y 12	(6) y (9)

* = población de la costa alemana del Mar Báltico, ** = población de la costa pacífica canadiense

(1) Dixon *et al.*, 1986; (2) Insua *et al.*, 1994; (3) Martínez-Expósito *et al.*, 1994; (4) Martínez-Lage *et al.*, 1995; (5) Martínez-Expósito *et al.*, 1997; (6) Martínez-Lage *et al.*, 1997; (7) Insua & Méndez, 1998; (8) Ríos, 1998; (9) González-Tizón *et al.*, 2000.

En *M. galloprovincialis* Méndez *et al.* (1990) describieron un patrón de bandas inducido por 2xSSC y Martínez-Lage *et al.* (1994) indujeron un patrón de bandas G, mediante tratamiento con tripsina. La inducción de bandas R y bandas Q, sólo se ensayó en *M. galloprovincialis*, pero los resultados no fueron satisfactorios, ya que la calidad y reproducibilidad de dichas bandas era muy baja (Martínez-Lage *et al.*, 1994). Por otra parte el conocimiento del ciclo celular en *M. edulis* y *M. galloprovincialis* permitió realizar estudios de inducción de intercambios entre cromátidas hermanas (Dixon & Clark, 1982; Dixon, 1983; Martínez-Expósito *et al.*, 1994), así como inducir bandas de replicación mediante el empleo de la BrdU (Martínez-Expósito *et al.*, 1994).

Finalmente el empleo combinado del bandeo C, tinción con los fluorocromos cromomicina A₃ y DAPI, inducción de Ag-NORs y digestión de cromosomas con endonucleasas de restricción permitieron describir diferentes tipos de heterocromatina en *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* (Martínez-Lage *et al.*, 1994, 1995).

1.3. ESTUDIOS MOLECULARES EN EL GÉNERO *Mytilus*

Los caracteres alozímicos se han utilizado para clarificar la compleja taxonomía del género *Mytilus*. A pesar del gran número de enzimas potencialmente disponibles, prácticamente sólo unas pocas presentan niveles de variación suficientemente altos para ser de valor taxonómico significativo (Ahmad *et al.*, 1977). Los primeros estudios sobre el complejo *M. galloprovincialis*-*M. edulis* (Gosling, 1984) utilizaron combinaciones de seis *loci*: esterasa-D (Est-D), leucina aminopeptidasa (Lap-1), glucosa-6-fosfato isomerasa (Gpi), aminopeptidasa (Ap), peptidasa-2 (Lap-2) y fosfoglucomutasa (Pgm). Posteriormente, octanol deshidrogenasa (Odh) y manosa-6-fosfato isomerasa (Mpi) se incorporaron al conjunto de enzimas utilizadas para diferenciar estos mejillones (Skibinski, 1983; Grant & Cherry, 1985; Varvio *et al.*, 1988; McDonald & Koehn, 1988).

Del análisis de genotipos de un único *locus* para discriminar entre especies del “complejo *M. edulis*” surgieron resultados controvertidos. Así, Varvio *et al.* (1988) consideran al *locus* Mpi casi diagnóstico para diferenciar *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. Igualmente, McDonald & Koehn (1988) encontraron que dicho *locus* era diagnóstico en casi todas las poblaciones alopatricas de *Mytilus* que analizaron y sugieren que una combinación de otros *loci* con grandes diferencias en las frecuencias alélicas podría ser efectiva para discriminar entre diferentes *taxa*. Sin embargo, cuando este mismo *locus* (Mpi) se empleó para diferenciar otras poblaciones de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, su carácter diagnóstico resultó más pobre (Beaumont *et al.*, 1989; Gosling, 1992b). Sanjuan *et al.* (1990) utilizaron una combinación de 4 *loci* alozímicos encontrando que la probabilidad de error en la clasificación era extremadamente baja (1.5×10^{-7}) y que el 99% de todos los mejillones individuales en sus muestras podrían denominarse correctamente utilizando únicamente el genotipo Est-D. En este sentido hay que tener en cuenta que las variaciones en el genotipo, en una escala local o geográfica, pueden reflejar patrones diferenciales de selección ambiental más que “backgrounds” evolutivos (Murdock *et al.*, 1975; Koehn *et al.*, 1980; Gartner-Kepkay *et al.*, 1983; Johannesson *et al.*, 1990; Tedengren *et al.*, 1990). Asimismo, la pérdida del poder diagnóstico entre especies de la misma localidad puede explicarse teniendo en cuenta que la hibridación puede ser considerable y que ciertos *loci* enzimáticos pueden estar sujetos a la selección local (Gartner-Kepkay *et al.*, 1980, 1983). Por estos motivos, Koehn (1991) y McDonald *et al.* (1991) realizaron un análisis discriminante para intentar diferenciar un gran número de poblaciones distribuidas por todo el mundo. Los

resultados obtenidos les permitieron establecer variables canónicas útiles para “diferenciar” entre *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*.

Los estudios alozímicos permitieron detectar el déficit de heterocigotos, el cual es un fenómeno común en bivalvos marinos y está bien documentado desde principios de los años 70 (para referencias ver Zouros & Foltz, 1984a; Volkaert & Zouros, 1989; Beaumont, 1991). En bivalvos, diversos estudios han demostrado la existencia de una relación positiva entre heterocigosidad, para un número pequeño de *loci* polimórficos, y eficacia biológica, para caracteres como el crecimiento, la fertilidad y la viabilidad, en especies de bivalvos (Singh & Zouros, 1978; Garton *et al.*, 1984; Koehn & Gaffney, 1984; Rodhouse & Gaffney, 1984; Koehn *et al.*, 1988; Zouros *et al.*, 1988; Volkaert & Zouros, 1989). Zouros & Foltz (1984a) propusieron varias hipótesis para explicar los déficits de heterocigotos en poblaciones de bivalvos. Algunas implican modelos selectivos, mientras que otras incluyen factores tales como la endogamia, el efecto Wahlund, los alelos nulos y la aneuploidía. Cualquiera podría ser responsable de las desviaciones persistentes del equilibrio Hardy-Weinberg observado en poblaciones de mejillón (Zouros & Foltz, 1984a, b; Singh & Green, 1984).

Los análisis moleculares de diferentes regiones del ADN, tanto nuclear como extranuclear, han aportado nuevos datos al conocimiento del genoma de mejillón. De las tres fracciones del ADN nuclear, el ADN de copia única o bajo número de copias está constituido por la fracción de ADN que renaturaliza lentamente. Es difícil distinguir entre secuencias presentes en una sola copia de las que lo están en 2 ó 3 copias, por lo que al referirse a ADN de copia única, se habla de ADN presente en una o pocas copias (hasta 10) por genoma haploide. Una parte de este ADN está constituido por genes que se expresan para dar proteínas y otra por secuencias con funciones reguladoras o desconocidas.

En el género *Mytilus*, los trabajos existentes sobre secuencias de bajo número de copia son los realizados en los genes que codifican para las proteínas *protamine-like* esperma-específicas (Ausió, 1992; Carlos *et al.*, 1993), la proteína polifenólica adhesiva del biso (Filpula *et al.*, 1990; Inoue *et al.*, 1995a, 1995b, 1996, 2000) y la actina (Mitta *et al.*, 2000); así como, estudios de caracterización de especies y poblaciones mediante la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a los genes de las *protamine-like* (Heath *et al.*, 1995; 1996), de la proteína polifenólica adhesiva (Inoue *et al.*, 1995c, 1997; Rawson *et al.*, 1996), de la calmodulina (Côte-Real *et al.*, 1994a) y de la actina (Ohresser *et al.*, 1997; Daguin & Borsa, 1999).

Las **proteínas protamine-like (PL)** son un grupo de proteínas nucleares básicas de los espermatozoides (Subirana, 1983; Ausió, 1995), estructuralmente muy heterogéneo, aunque exhiben un enorme parecido en su composición de aminoácidos (Ausió, 1986), lo cual en principio parece indicar que todas ellas pueden estar relacionadas entre sí. A diferencia de las histonas y al igual que las protaminas, las proteínas PL varían entre especies (Zalensky & Zalenskaya, 1980; Ausió & Subirana, 1982a; Ausió, 1988; Mogensen *et al.*, 1991; Ausió, 1992; Galinod *et al.*, 1992). Algunos autores han sugerido que estas proteínas PL representan la evolución intermedia entre las histonas más primitivas y las protaminas derivadas (Ausió & Subirana, 1982a; Martín-Ponthieu *et al.*, 1991; Saperas *et al.*, 1992, 1994, 1997; Rocchini *et al.*, 1996). En el esperma de las especies de *Mytilus* se han identificado tres proteínas PL (PL-II, PL-III y PL-IV) que constituyen aproximadamente el 80% del complemento proteico, junto con un pequeño componente de proteínas histonas (Ausió, 1992; Carlos *et al.*, 1993). De todas ellas, la PL-III (también denominada PHI-1 o “ $\phi 1$ ”) constituye el 70% de la dotación de proteínas básicas de los espermatozoides de *Mytilus* (Ausió & Subirana, 1982b).

Heath *et al.* (1995, 1996) desarrollaron dos marcadores, mediante amplificación por PCR, basados en polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs). Uno de estos marcadores consiste en la amplificación de la fracción codificante PLIIa de la proteína *protamine-like* esperma-específica PLII a partir de un ADNc obtenido por Carlos *et al.* (1993). Los resultados obtenidos fueron 100% diagnósticos en la diferenciación entre *M. trossulus* de la costa pacífica (Oregón) y *M. edulis* (Delaware)-*M. galloprovincialis* (California) (Heath *et al.*, 1995). En un artículo posterior, estos autores describieron otro marcador mediante la amplificación por PCR de la proteína *protamine-like* esperma-específica PHI-1 (PL-III o “ $\phi 1$ ”) a partir de un ADNc obtenido por Ruiz-Lara *et al.* (1993), que resultó ser diagnóstico para diferenciar poblaciones americanas de *M. californianus* del resto de especies de *Mytilus* (Heath *et al.*, 1996).

Recientemente, Heath e Hilbish (1998) realizaron un estudio para determinar la secuencia y estructura del gen de la PL-III en cuatro especies del G. *Mytilus*: *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. trossulus* y *M. californianus*. La secuencia resultó ser extremadamente variable, no sólo a nivel interespecífico sino también a nivel intraespecífico, e incluso intrapoblacional; siendo la secuencia de *M. californianus* la más divergente.

La **proteína polifenólica adhesiva del bisco** se produce en la glándula endocrina del pie y es un componente importante en la sujeción al sustrato (Waite, 1992). Se han descrito cuatro

tipos de proteínas polifenólicas adhesivas del biso, denominadas proteínas del pie "1-4", que tienen como característica principal la incorporación de 3,4-dihidroxifenilalanina (dopa) en sus estructuras primarias (Papov *et al.*, 1995).

La estructura primaria completa de la proteína del pie 1 sólo se ha determinado en *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. coruscus* (Filpula *et al.*, 1990; Laursen, 1992; Inoue & Odo, 1994; Inoue *et al.*, 1995a, b, 1996) y consta de un dominio repetitivo largo y un dominio no repetitivo relativamente corto, que difieren entre especies. En *M. edulis* el dominio repetitivo contiene más de 70 motivos de repetición decapeptídicos y 13 ó 14 motivos de repetición hexapeptídicos, pero el número y el patrón de distribución de estos motivos son variables incluso dentro de la misma especie (Filpula *et al.*, 1990; Laursen, 1992). Sin embargo, en *M. galloprovincialis* contiene 62 repeticiones del motivo decapeptídico y ningún motivo hexapeptídico (Inoue & Odo, 1994); además, el dominio no repetitivo difiere del de *M. edulis* en una delección de 18 aminoácidos en su secuencia (Inoue *et al.*, 1995a).

La secuenciación de diferentes regiones de la proteína polifenólica adhesiva del pie 1 ha mostrado la existencia de variaciones interespecíficas en las especies pertenecientes al "complejo *M. edulis*" (Inoue *et al.*, 1995c, 1996). Estos autores diferenciaron *M. galloprovincialis* (Japón), *M. edulis* (Delaware) y *M. trossulus* (Alaska), basándose en la secuencia de la región no repetitiva de la proteína polifenólica (NRPP); mientras que la amplificación de la región repetitiva de esta proteína solo diferencia *M. edulis* de *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*. Además analizan diferentes poblaciones de Japón donde se supone que *M. galloprovincialis* fue introducido desde Europa después de 1935 (Wilkins *et al.*, 1983), encontrando que efectivamente *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* coexisten en muchas de las poblaciones japonesas llegando a existir híbridos entre las dos especies (Inoue *et al.*, 1997).

Aproximadamente, los últimos 875 residuos aminoácidos de la proteína del pie 1, están codificados por un único "exón gigante" de ~2.5kb y, principalmente, están organizados en repeticiones decapeptídicas en tándem (Filpula *et al.*, 1990). Rawson *et al.* (1996) analizaron dos nuevos marcadores obtenidos mediante la amplificación por PCR de regiones específicas en los extremos 5' y 3' del exón gigante. Estos autores denominaron al gen que codifica la proteína polifenólica adhesiva como gen Glu. Uno de estos marcadores, el Glu-5', discrimina las tres especies de mejillón del "complejo *M. edulis*"; mientras el segundo, Glu-3', sólo permite diferenciar *M. edulis* y *M. galloprovincialis*.

La secuencia de aminoácidos de la proteína del pie 2 se ha determinado en *M. galloprovincialis* y *M. coruscus* (Inoue *et al.*, 1995a; Inoue *et al.*, 2000). Ambas secuencias presentan una homología del 82.7% y la estructura básica, incluyendo el número y los motivos de repetición, está altamente conservada (Inoue *et al.*, 2000).

La **calmodulina** (CaM) es una importante proteína reguladora implicada en gran variedad de procesos celulares mediados por Ca^{+2} . Cuando está activada por la unión al Ca^{+2} , la calmodulina es capaz de interactuar con numerosas proteínas intracelulares, las cuales, a su vez, activan y regulan numerosos procesos, tales como la contracción muscular y la actividad citoesquelética (Klee & Vanaman, 1982; Weinstein & Mehler, 1994). El gen de la calmodulina está muy conservado, se encuentra muy distribuido filogenéticamente y posee las posiciones de los intrones muy conservadas (Nojima & Sokabe, 1989). En ciertas especies, como en insectos y gasterópodos, la calmodulina presenta una única copia (Doyle *et al.*, 1990; Swanson *et al.*, 1990), en otras como en la trucha (Hardy *et al.*, 1988) y el mejillón (Côrte-Real *et al.*, 1994a) presenta dos copias y en vertebrados (Nojima, 1989) presentan tres copias y algunos pseudogenes.

Côrte-Real *et al.* (1994a, b) analizaron el intrón 3 de un gen de la calmodulina (CaM1) en larvas e individuos adultos de diferentes poblaciones naturales de mejillón de las Islas Británicas (*M. edulis*) y de la laguna de Venecia (*M. galloprovincialis*) y encontraron que este marcador es polimórfico en poblaciones híbridas de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. En los estudios con larvas, observaron ciertas desviaciones de los genotipos esperados en herencia mendeliana que atribuyen a la existencia, en algunos casos, de larvas aneuploides, pero mayoritariamente a una selección en algún *locus* ligado al de la calmodulina. Sin embargo, en estudios posteriores no se observaron diferencias significativas en cuanto a la descendencia observada y esperada en cruzamientos de mejillón (Del Río-Portilla *et al.*, 1997).

Las **actinas** son proteínas contráctiles y estructurales altamente conservadas, que se encuentran prácticamente en todas las células eucariotas, y desempeñan un papel no sólo en la movilidad, sino también en la determinación de la forma celular y la citoquinesis (Korn, 1978). En vertebrados superiores, se han observado varias isoformas, divididas en actinas citoplasmáticas (clase I) y musculares (clase II) (Rubenstein, 1990). En invertebrados, la mayoría de las actinas parecen ser de clase II (Lamers *et al.*, 1998).

Ohresser *et al.* (1997) mediante la amplificación del intrón 1 del gen de la actina, detectan un polimorfismo en los individuos de las poblaciones analizadas que no les permite diferenciar entre *M. edulis* (de Boyardville, Oeste de Francia) y *M. galloprovincialis* (de Sète, Sur de Francia). Sin embargo, sí detectan un déficit de heterocigotos en una población de *M. galloprovincialis* (Polzeath Bay, Suroeste de Inglaterra) con respecto a las frecuencias Hardy-Weinberg, al igual que se había observado mediante el estudio de *loci* alozímicos (Zouros & Foltz, 1984b; Koehn, 1991; McDonald *et al.*, 1991; Gosling, 1992b; Gaffney, 1994) y de marcadores moleculares (Karl & Avise, 1993).

Daguin & Borsa (1999), realizaron un análisis genético de poblaciones de *Mytilus* de la costa Noroeste de África, utilizando como marcador el polimorfismo de longitud del *locus* mac-1 del intrón 1 del gen de la actina (Ohresser *et al.*, 1997). Estos autores caracterizaron los mejillones africanos como *M. galloprovincialis*, mediante la comparación de dichas poblaciones con poblaciones de referencia de *M. galloprovincialis* (Mediterráneo Oeste y Atlántico de Portugal) y de *M. edulis* (Dinamarca y Polzeath Bay).

Otra fracción del genoma eucariota está constituida por el ADN moderadamente repetido, el cual corresponde a la fracción de ADN con una velocidad de reasociación intermedia y con un número que puede variar desde 10 a 10^4 copias por genoma haploide. Esta fracción incluye, normalmente como componente minoritario, aquellos genes o familias génicas que se presentan en el genoma con un número elevado de copias (ARNr, ARNt, histonas). El componente mayoritario está constituido por secuencias de longitud variable y función desconocida, dispersas por el genoma entre otras secuencias no repetidas.

En moluscos bivalvos se han realizado varios estudios utilizando secuencias del ADN_r 18S (Rice *et al.*, 1993; Kenchington *et al.*, 1994, 1995; Winnepeninckx *et al.*, 1994, 1996; Steiner & Müller, 1996; Adamkewicz *et al.*, 1997) para establecer relaciones filogenéticas entre diferentes especies. Sin embargo, la comparación de secuencias y reconstrucción filogenética produce resultados confusos en algunos casos, debido a que el número de secuencias disponibles resulta insuficiente, considerando la diversidad de los bivalvos, y, al mismo tiempo, conlleva un escaso conocimiento de la variación de la tasa de sustitución. Los resultados obtenidos por Kenchington *et al.* (1995) sugieren que *M. edulis* y *M. galloprovincialis* se separaron durante el Oligoceno, e incluso utilizando tasas de mutación más elevadas, como las correspondientes al ADN_r 16S, las especies del “complejo *M. edulis*” tendrían entre 10 y 20 millones de años, y la separación de éstas se habría producido durante el Mioceno.

Heath *et al.* (1995) desarrollaron un marcador mediante amplificación por PCR de la región espaciadora transcrita interna (ITS) comprendida entre los genes del ADNr 18S y 28S. Basándose en los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), estos autores diferencian *M. trossulus* de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. En un trabajo posterior, Heath *et al.* (1996) distinguen *M. californianus* de las especies del "complejo *M. edulis*", mediante la amplificación y digestión de dicha región.

Las **histonas** son proteínas muy básicas involucradas en el empaquetamiento del ADN en los cromosomas eucariotas, así como en papeles de carácter funcional. Constituyen un grupo de proteínas estructuralmente bastante homogéneo y evolutivamente muy conservado (Isenberg, 1978), a excepción de las histonas de la familia H1 que presentan un grado considerable de variación evolutiva. Se encuentran presentes en los complejos cromatínicos de las células somáticas de los organismos eucariotas y en el caso de las histonas octaméricas (H2A, H2B, H3 y H4) son las responsables de la organización nucleosomal de la cromatina, mientras los miembros de la familia H1 participan en niveles superiores de organización en la fibra de cromatina (Marzluff, 1986).

Drabent *et al.* (1999), realizaron el primer estudio de caracterización de la histona H1 en *M. edulis* y sugieren que los genes de esta clase de histonas se agrupan de forma repetitiva y en tándem, de manera independiente a la de las histonas del *core* nucleosomal, y con al menos 100 copias por genoma haploide. Anteriormente se había descrito una proteína tipo H1 (*H1-like*) en esperma maduro de *M. californianus*, existiendo similitud entre su secuencia y la consenso para el dominio central de H1 (Jutglar *et al.*, 1991; Ausió, 1999).

Una de las fracciones del genoma eucariota más estudiadas es el ADN altamente repetido que está constituido por la fracción de ADN que más rápidamente renaturaliza y, por lo general, consta de secuencias cortas que se repiten muchos miles de veces (en un número de copias superior a 10^4). Las secuencias de ADN altamente repetido ordenadas de manera reiterada en tándem, se conocen como ADN satélite (Singer, 1982; Beridze, 1986) y, generalmente, están asociadas con la heterocromatina constitutiva localizada en las regiones centromérica y telomérica de los cromosomas (Brutlag, 1980). Por otro lado, las secuencias de ADN altamente repetitivo no organizadas en tándem se localizan en intrones (secuencias intercalares), flanqueando regiones génicas, formando parte de genes no codificantes o pseudogenes o de genes en copias múltiples, y se clasifican, según el tamaño de la unidad de repetición, en: SINES, secuencias repetitivas dispersas cortas, y LINES, secuencias repetitivas dispersas largas.

La longitud de las unidades de repetición de un ADN satélite puede ser tan corta como la que distingue a los micro- y minisatélites (2-5pb y 10-100pb, respectivamente), o sobrepasar las 2kb (Miklos & Gill, 1982), como ocurre en los satélites de bovinos, algunos con una unidad repetitiva de hasta 2600pb (Singer, 1982). Sin embargo, el tamaño medio de los monómeros de ADN satélite suele oscilar entre 100 y 300pb. A diferencia de los micro- y los minisatélites, estas secuencias se organizan como grandes *clusters*, de hasta 100Mb, en las regiones heterocromatínicas de los cromosomas y, aparentemente, no son tan variables en el tamaño de repetición dentro de poblaciones (Charlesworth *et al.*, 1994).

La proporción de ADN satélite en el genoma, varía enormemente cuando se comparan especies distintas, oscilando el contenido del mismo por genoma entre 1% y 60% (McGregor & Sessions, 1986), incluso si se comparan dos especies íntimamente emparentadas (Li & Graur, 1991). En cuanto a la variabilidad a nivel de secuencia, hay que distinguir entre variabilidad intraespecífica e interespecífica. La variabilidad entre las secuencias de una familia de ADN satélite dentro de una especie es, generalmente, del 15% (Singer, 1982; Ruíz-Lara *et al.*, 1992).

Si bien cada familia de ADN satélite tiene una unidad monomérica perfectamente definida, cuando se analizan sus secuencias se pueden detectar periodicidades internas, reflejo de la evolución de ese ADN satélite. Estas periodicidades consisten en repeticiones directas o inversas; por ejemplo, el ADN satélite menor centromérico de *Mus musculus*, está formado por monómeros de 234pb. Sin embargo, cuando se analiza su secuencia se puede observar que la longitud actual de las unidades monoméricas se ha originado a partir de ciclos alternantes de mutación y amplificación de un nonanucleótido (Hörz & Altenburger, 1981).

La mayoría de los ADN satélites están restringidos a un grupo o a unos pocos grupos de especies relacionadas, lo cual implica que pueden tener un origen evolutivo relativamente reciente (Singer, 1982). A menudo, muestran cambios rápidos entre las especies, incluso entre especies emparentadas, pudiendo perderse o aparecer nuevas familias de ADN satélite en un período de tiempo relativamente corto (Miklos, 1985). Así, existen ADN satélites especie-específicos (Fanning *et al.*, 1989; Bachmann *et al.*, 1994) y ADN satélites género-específicos (Van den Busche *et al.*, 1993; Wijers *et al.*, 1993). Sin embargo, otros ADN satélites muestran un mayor grado de conservación, siendo comunes a una familia completa, como el ADN satélite de la familia *Cebidae* (Fanning *et al.*, 1993), los ADN satélites de *Cetacea* (Arnason, 1990) y el ADN satélite α centromérico de primates (Willard, 1991; Fanning *et al.*, 1993), que están

ampliamente extendidos entre las especies de un orden completo y pueden llegar a tener una antigüedad de 40-50 millones de años (Fanning *et al.*, 1993).

El proceso básico de aparición de cualquier familia de secuencias repetidas es la amplificación por duplicación de una secuencia. Una vez duplicada, ciertos mecanismos moleculares de cambio pueden facilitar una amplificación aún mayor. Uno de estos, el entrecruzamiento desigual, fue propuesto por Smith (1976) como producido por el intercambio desigual entre dos unidades cromosómicas. La transposición duplicativa también puede ser responsable de la aparición de *novo* y amplificación de una familia de ADN satélite. De forma alternativa, Walsh (1987) propuso la amplificación mediante la producción de múltiples copias, a través del mecanismo del "círculo rodante" (Hourcade *et al.*, 1973), de ADN extracromosómico, seguido de la integración en el genoma de dichas copias. Stephan (1989) sugiere el "deslizamiento replicativo" (*replicación slippage*) (Levinson & Gutman, 1987), el cual posiblemente tenga mayor importancia en la amplificación de minisatélites y secuencias simples como las secuencias CA (Tautz *et al.*, 1986; Schloeterer & Tautz, 1992), y cuyos efectos se observan en diversos ADN satélites (Plohl & Ugarkovic, 1994). Posteriormente, se ha propuesto un proceso de amplificación en el que intervienen repeticiones inversas con capacidad para formar estructuras en tallo-bucle ("*stem-loop*") (Oshima *et al.*, 1992). Más recientemente, Stephan & Cho (1994) diseñaron un modelo teórico para explicar el papel de la selección natural en la formación de los tándems repetitivos.

Las familias de secuencias repetidas evolucionan de manera concertada (Smith, 1974; Dover, 1993), de tal forma que la identidad entre los miembros de una familia en una especie es mayor que entre miembros de la misma familia en dos especies distintas, incluso cuando éstas están muy emparentadas. Las nuevas variantes que aparecen se expanden gradualmente a través de una familia mediante mecanismos como el entrecruzamiento desigual, lo que conduce a la homogenización de las nuevas variantes dentro de una especie. Pero en la homogenización de las secuencias de una familia en una especie intervienen otros mecanismos como la conversión génica (Strachan *et al.*, 1985; Plohl & Ugarkovic, 1994) que consiste en la transferencia no recíproca de una secuencia entre dos copias de la familia.

La aparente ausencia de actividad transcripcional, la ausencia de capacidad codificadora y los cambios rápidos en sus secuencias, junto con la falta de conservación entre grupos de especies, incluso a veces entre especies muy emparentadas (Miklos, 1985), son las razones por las que el ADN altamente repetido ha sido considerado como ADN *basura* o ADN *trivial* (Ohno,

1974) sin ninguna función, o incluso ADN *egoísta* o ADN *parasitario* (Orgel & Crick, 1980; Doolittle & Sapienza, 1980). Sin embargo, el ADN satélite puede tener un significado funcional en el comportamiento y en la evolución cromosómica (Brutlag, 1980), aunque no se sabe si el papel que desempeña es *accidental* (Dover, 1978), por ser un ADN *ignorante*, neutro a la selección y expandido de acuerdo a un proceso totalmente estocástico (Dover, 1980), o bien porque ha sido seleccionado para ello (Cavalier-Smith, 1980, 1985). Además, algunas secuencias de ADN satélite altamente conservadas, como es el caso del ADN telomérico y del ADN centromérico, tienen importantes funciones a nivel del mantenimiento de la estructura cromosómica (Vogt, 1990, 1992; Blackburn, 1991; Zinkowski *et al.*, 1991; Haaf *et al.*, 1992; Greider, 1996; Griffith *et al.*, 1999).

Las características del ADN satélite, así como la evolución rápida de sus secuencias lo hacen un material genético de gran utilidad en el análisis de las relaciones filogenéticas entre especies relacionadas (Lima de Faria *et al.*, 1984; Bogenberger *et al.*, 1987; Fanning *et al.*, 1989; Arnason, 1990; Bachmann & Sperlich, 1993; Van den Busche *et al.*, 1993; Vidal-Rioja *et al.*, 1994).

Los patrones de divergencia entre los ADN satélites de un grupo de especies se han analizado mediante la comparación de las secuencias de cada uno de ellos. En este caso, se han comparado las secuencias consenso del ADN satélite en cada especie (Gretarsdottir & Arnason, 1992; Garrido-Ramos *et al.*, 1999), o bien, se ha considerado, además, la variabilidad intraespecífica mediante la comparación de un número determinado de secuencias monómero de cada especie (Strachan *et al.*, 1985; Laursen *et al.*, 1992; Adegoke *et al.*, 1993; Bachmann & Sperlich, 1993; Garrido-Ramos *et al.*, 1999). Sin embargo, los datos de secuenciación del ADN satélite hay que manejarlos con precaución, conociendo y teniendo en cuenta los mecanismos que intervienen en la evolución del mismo. Se puede inferir una filogenia a partir de secuencias consenso, pero puede ocurrir que la divergencia entre dichas secuencias sea menor que la variabilidad intraespecífica. Esto se explica si se tiene en cuenta que los sitios variables en los monómeros de una especie pueden ser sitios en estado de transición en el proceso de fijación de los mismos (que posiblemente no se vean reflejados en la secuencia consenso), mientras que los sitios totalmente homogeneizados y fijados en cada especie se verán reflejados en esa secuencia consenso y analizados como sitios divergentes entre las dos especies que se comparan (Gretarsdottir & Arnason, 1992). Cuando se comparan distintas unidades monoméricas de cada especie la existencia de sitios variables en una de ellas (estados de transición), puede llevar a la

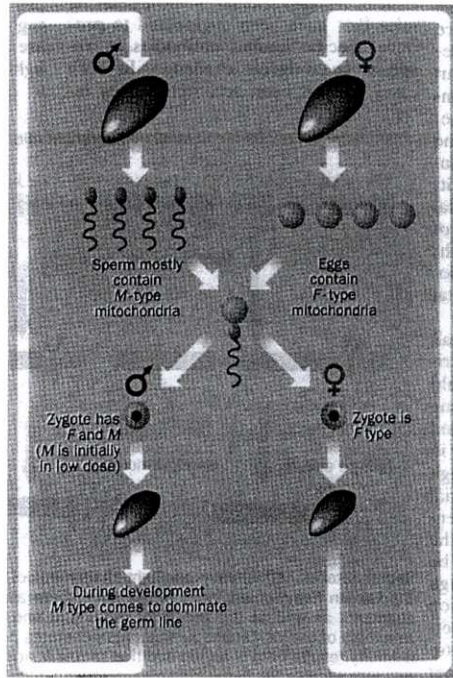
paradoja de que secuencias monoméricas de dos especies distintas presenten mayor identidad que cuando se comparan cada una con unidades de la misma especie (Adegoke *et al.*, 1993). Dado que la vida media de un ADN satélite supera la vida media de una especie (Harding *et al.*, 1992), puede ocurrir que la variabilidad exista ya en la especie ancestral de las especies que se analizan. En este caso, si el tiempo que hace que divergieron las especies que se comparan es relativamente reciente, o la homogenización y fijación de las variantes es un proceso relativamente lento, puede darse la paradoja mencionada.

Los estudios de ADN satélite en mejillón están restringidos exclusivamente a *M. edulis* (Ruíz-Lara *et al.*, 1992; Ruíz-Lara, 1993). Estos autores caracterizaron un ADN satélite (ADN satélite I), que, obtenido tras la digestión del ADN genómico con la endonucleasa de restricción *Apa I*, tiene una longitud de repetición del monómero de 173pb. Este ADN satélite constituye un 0.63 % del total del ADN, presentando aproximadamente 6.3×10^4 copias por célula haploide. Asimismo, también han caracterizado otros dos satélites *Apa I* de mejillón. El ADN satélite II tiene un monómero de 161pb; representa un 3.34% del total del genoma y 3.34×10^5 copias por célula haploide. El ADN satélite III presenta una longitud de monómero de 166pb, constituyendo 6.96×10^3 copias por célula haploide y una proporción del 0.0696% del total del genoma (Ruiz-Lara, 1993).

El estudio del **ADN mitocondrial** (ADNmt) en mejillón ha permitido observar y describir un patrón de herencia denominado “herencia doble uniparental” (DUI) (Skibinski *et al.*, 1994a; Zouros *et al.*, 1994a). En los mejillones existen dos genomas de ADNmt altamente divergentes, uno que se encuentra en todos los individuos y es transmitido por las hembras (tipo F) y otro que se encuentra en los machos (tipo M), quienes lo transmiten a sus hijos (FIGURA 2). Este fenómeno se ha descrito en varios taxones del género *Mytilus*; *M. edulis* (Skibinski *et al.*, 1994a, b; Zouros *et al.*, 1994a, b), *M. trossulus* (Geller, 1994; Zouros *et al.*, 1994b; Rawson & Hilbish, 1995; Stewart *et al.*, 1995) y *M. galloprovincialis* (Rawson & Hilbish, 1995; Quesada *et al.*, 1996; Saavedra *et al.*, 1997).

El análisis de las secuencias parciales mitocondriales de ADNr 16S permitió a Geller *et al.* (1993) observar que dichas secuencias eran idénticas en *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, pero ambas diferían de la de *M. trossulus*. Dentro de esta última especie, la variabilidad existente era mayor que la detectada entre las especies de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*; coincidiendo con la hipótesis sugerida por Vermeij (1991, 1992) a partir de datos paleontológicos.

FIGURA 2. Herencia doble uniparental del ADN mitocondrial



En los mejillones, los machos poseen dos clases distintas de ADNmt: un tipo M, denominado así porque se transmite de padres a hijos, y un tipo F que se transmite de generación en generación a través de las hembras. Aunque los hijos reciben de sus madres el ADNmt tipo F, no lo transmiten a su descendencia (Zouros *et al.*, 1994a).

La filogenia del género *Mytilus* no se ha resuelto, divergiendo los *taxa* unos de otros y formando, algunos de ellos, lo que se conoce como “complejo *M. edulis*”. En este trabajo, se tratará de estudiar las relaciones filogenéticas entre diferentes especies y/o taxones de mejillones mediante el análisis de regiones de copia única y de ADN satélite.

2. OBJETIVOS

La existencia en Galicia de las Rías como abrigo natural y la riqueza en nutrientes de sus aguas, permiten que más de 3200 parques de cultivo estén dedicados a la producción de mejillón. La gran importancia económica que esto supone para la Comunidad Gallega, junto con el hecho del escaso conocimiento genético de estas especies ha planteado la necesidad de llevar a cabo estudios más exhaustivos. Por este motivo, este trabajo pretende contribuir al conocimiento de la filogenia del mejillón mediante el estudio de secuencias de copia única y de la familia ADN satélite *Apa I*.

Los objetivos planteados han sido:

En primer lugar, estudiar la variabilidad genética de cinco *loci* nucleares (PLII, PHI-1, CaM1, Glu-5' y NRPP), con el fin de establecer las relaciones filogenéticas entre poblaciones de diferentes especies del género *Mytilus*.

En segundo lugar, analizar tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I* en las especies de la familia Mytilidae, *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. e. chilensis*, *M. trossulus*, *M. californianus* y *Perna canaliculus*. El estudio de dichas secuencias se realizará con respecto a su abundancia, organización y localización cromosómica. Se realizará un análisis de las secuencias nucleotídicas con el objetivo de estudiar los posibles procesos mutacionales y evolutivos que actúan sobre las mismas. Así mismo, se analizarán las relaciones filogenéticas empleando las secuencias consenso de los tres tipos de ADN satélite para cada especie.

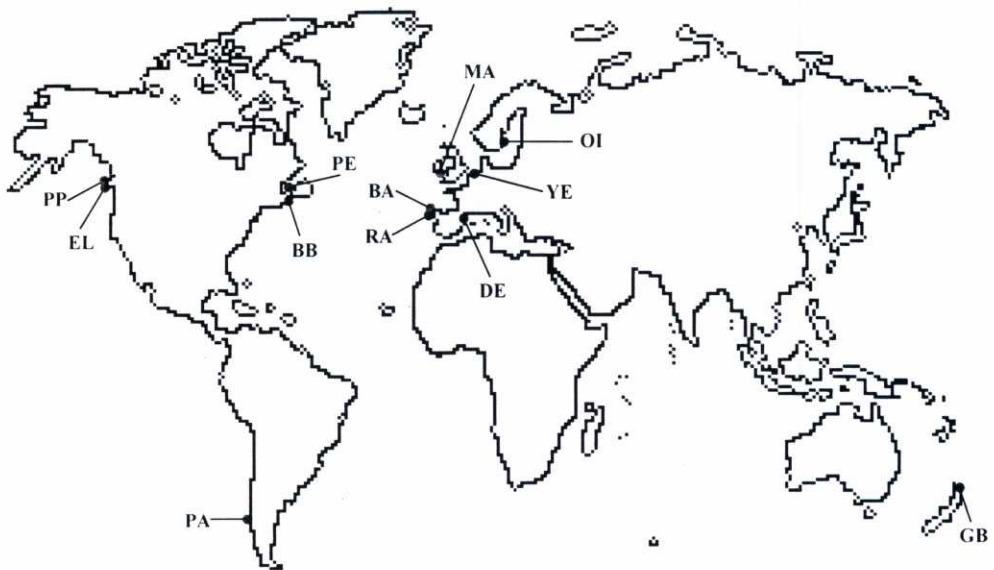
Por último, evaluar el uso de los *loci* nucleares y de las secuencias ADN satélite como marcadores moleculares para caracterizar individuos y/o poblaciones de mejillón, así como comprobar la fiabilidad de dichos marcadores en cuanto a la identificación de especies que puedan ser comercializadas con el nombre común de mejillón en productos manufacturados.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL DE ESTUDIO

En el presente trabajo se han analizado 12 poblaciones de mejillón de la familia Mytilidae, de las cuales una pertenece al género *Perna* y las once restantes al género *Mytilus*. La localización geográfica de las mismas se muestra en la FIGURA 3.

FIGURA 3. Localización geográfica de las poblaciones analizadas



BA: Balcobo, costa Noroeste de España, 43°19'N 8°31'O; **RA:** Ría de Arosa, costa Noroeste de España, 42°35'N 8°50'O; **DE:** Delta del Ebro, costa Este de España, 40°38'N 0°47'E; **YE:** Yerseke, Holanda, 51°29'N 4°01'E; **MA:** Isle of Man, Mar de Irlanda, Reino Unido, 54°05'N 4°45'O; **PE:** Prince Edward Island, Nueva Escocia, Canadá, 46°18'N 63°14'O; **PA:** Puerto Aguirre, Chile, 45°04'S 73°21'O; **EL:** Esquimalt Lagoon, Isla de Vancouver, Canadá, 48°25'N 123°27'O; **BB:** Bedford Basin, Nueva Escocia, Canadá, 44°40'N 63°37'O; **OI:** Öland Island, Mar Báltico, Suecia, 56°38'N 16°27'E; **PP:** Point no point, Isla de Vancouver, Canadá, 48°26'N 124°08'O; **GB:** Golden Bay, Nueva Zelanda, 40°40'S 172°44'E.

La identificación de las especies de las diferentes poblaciones se realizó basándose en la distribución geográfica, los caracteres morfológicos de la concha, datos alozímicos y/o marcadores moleculares, según los casos. Así, en base a los datos alozímicos publicados por Sanjuan *et al.* (1994) y Quesada *et al.* (1995) las poblaciones de Balcobo (costa Noroeste de España), Ría de Arosa (R. Arosa, costa Noroeste de España) y Delta del Ebro (D. Ebro, costa Este de España) se identificaron como *M. galloprovincialis*, y la población de Yerseke (Holanda) como *M. edulis*. La población de Isle of Man (I. Man, Mar de Irlanda, Reino Unido) se asumió como *M. edulis* en base a la distribución geográfica de Gosling (1992a). La población de Esquimalt Lagoon (Esquimalt L., Isla de Vancouver, Canadá) se determinó 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 coexiste en dicha localización. Los individuos de Öland Island (Öland I., Mar Báltico, Suecia) se identificaron como *M. trossulus* en base a los datos alozímicos publicados por Bulnheim & Gosling (1988) y Varvio *et al.* (1988). La población de Point no point (Isla de Vancouver, Canadá) se determinó como *M. californianus* por la presencia de nervios radiales en la concha, característicos de esta especie. Las poblaciones de la costa Atlántica canadiense, Prince Edward Island (Prince Edward I., Nueva Escocia, Canadá) y Bedford Basin (Bedford B., Nueva Escocia, Canadá), se identificaron como *M. edulis* y *M. trossulus* respectivamente, mediante la amplificación de la región ITS descrita por Heath *et al.* (1995) (apartado 3.7). Las poblaciones de Puerto Aguirre (P. Aguirre, Chile) y Golden Bay (Golden B., Nueva Zelanda), fueron suministradas por ANFACO CECOPESCA, quienes las clasificaron como *M. chilensis* y *Perna canaliculus*, respectivamente. En este estudio, la población de *M. chilensis* se incluyó con el resto de poblaciones de *M. edulis* de acuerdo a McDonald *et al.* (1991) quienes la clasificaron como subespecie de esta (*M. edulis chilensis*).

3.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Los individuos muestreados proceden de poblaciones naturales, excepto R. Arosa, D. Ebro, Yerseke, Prince Edward I., P. Aguirre y Golden B. 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 I. Man, Esquimalt L., Öland I. y Point no point; congeladas, como en P. Aguirre y Golden B., y de tejido fresco como en las poblaciones de Balcobo, R. Arosa, D. Ebro, Prince

Edward I. y Bedford B. En este último caso, tras extraer el ADN, el resto del individuo se conservó en etanol 95%.

La obtención del ADN genómico 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. Aproximadamente 25-30mg de tejido se homogeneizaron en 600µL de tampón de lisis con proteinasa K (0.1mg/mL) y se incubaron en un baño a 55-60°C, durante toda la noche. Tras la incubación se extrajo el ADN con una solución NaCl saturado y con cloroformo. El ADN extraído se precipitó añadiendo etanol absoluto y acetato sódico 0.3M. Posteriormente, se lavó en etanol al 70% y, tras secar el precipitado, se resuspendió en 1xTE.

3.3. EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO

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 5mL de medio LB estéril conteniendo 100µg/µL de ampicilina, se dejaron crecer las bacterias a 37°C toda la noche con agitación vigorosa. El botón celular se resuspendió en 100µL de tampón glucosa frío y la lisis se llevó a cabo durante 5min en hielo con 200µL de tampón de lisis. El ADN bacteriano se precipitó por neutralización con 150µL de una solución fría de acetato potásico a pH 4.8; la incubación en hielo durante 5min y la posterior centrifugación a 4°C durante 10min 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 50µL de 1xTE con 20µg/µL de ARNasa libre de ADNasa.

Para determinar la calidad y la concentración del ADN plasmídico, se linearizó el plásmido digiriendo una alícuota de 2µL con la endonucleasa *Eco RI*. Tras incubar toda la noche a 37°C, se realizó la correspondiente electroforesis.

3.4. ELECTROFORESIS Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

La calidad del ADN se valoró mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa en tampón 1xTAE. El progreso de la electroforesis se siguió a través de la migración de los colorantes incluidos en el tampón de carga, el cual contiene glicerol al 30% como agente para aumentar la densidad. Se utilizaron varios controles de peso molecular (Roche) de los cuales el ADN marcador III se empleó para estimar concentraciones y los ADN marcadores XIII (50pb) y XIV (100pb) para estimar pesos moleculares. Los geles se tiñen por inmersión en una solución de 0.5µg/mL de bromuro de etidio durante 30min, se visualizan en un transiluminador y se captan con una cámara de video UVP (Ultra-Violet Products, Gel Documentation System ImageStore 5000, version 7.12).

La concentración del ADN y los pesos moleculares de los productos de PCR y de los RFLPs se estimaron con el programa Gelworks (Gelwld 2.51).

3.5. DIGESTIONES CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las endonucleasas de restricción (Roche) utilizadas en este trabajo y sus correspondientes temperaturas de incubación, se detallan en la TABLA IV. Todas las digestiones se realizaron teniendo en cuenta que 1µg de ADN se digiere con dos unidades de enzima y que el volumen de la reacción debe ser, al menos, 10 veces superior al del enzima, al estar presente el glicerol en los tampones de almacenamiento de estas. Tras incubar toda la noche las reacciones a la temperatura correspondiente, se detienen incubándolas en hielo y se realiza una electroforesis control con una alícuota para comprobar la eficacia de la digestión.

TABLA IV
Endonucleasas de Restricción

ENDONUCLEASA	DIANA DE RESTRICCIÓN	TEMPERATURA
<i>Apa I</i>	GGGCC↓C	30°C
<i>Dra I</i>	TTT↓AAA	37°C
<i>Eco RI</i>	G↓AATTC	37°C
<i>Hae III</i>	GG↓CC	37°C
<i>Hha I</i>	GCG↓C	37°C
<i>Hinf I</i>	G↓ANTC	37°C
<i>Msp I</i>	C↓CGG	37°C
<i>Taq I</i>	T↓CGA	65°C

3.6. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE COPIA ÚNICA

Todas las reacciones de amplificación se realizaron con PCR Supermix (Life Technologies), en un volumen de 25µL, utilizando una concentración final de 1ng/µL de ADN genómico, 20mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200µM dNTPs, 0.44U de Taq ADN polimerasa y 0.2mM de cada *primer*.

Los *primers* utilizados para amplificar las diferentes secuencias codificantes, son los siguientes:

- *Protamine-like* esperma-específica PHI-1(φ1) de mejillón (Heath *et al.*, 1996): 5'-CAA CAA GAA GGA TGC CAA GCC-3' y 5'-TTA CCC TCT CCC TCT TTC CCA GGA G-3'
- Intrón 3 del gen de la calmodulina, CaM1 (Côrte-Real *et al.*, 1994a): CAD6: 5'-CGA GGT CGA TGC TGA TGG TAA G-3' y CAD7: 5'-GGA ATG AGA ATG TGT TGG TTT G-3'
- Extremo 5' del exón gigante de la proteína polifenólica adhesiva del biso, Glu-5' (Rawson *et al.*, 1996): JH-5: 5'-GTA GGA ACA AAG CAT GAA CCA-3' y JH-54: 5'-GGG GGG ATA AGT TTT CTT AGG-3'

- Región no repetitiva de la proteína polifenólica adhesiva del pie 1, NRPP (Inoue *et al.*, 1995c): Me 15: 5'- CCA GTA TAC AAA CCT GTG AAG A-3' y Me 16: 5'- TGT TGT CTT AAT AGG TTT GTA AGA-3'

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador PTC-100TM (M.J. Research, Inc.) y las condiciones empleadas varían en función de la temperatura de hibridación para cada par de *primers*:

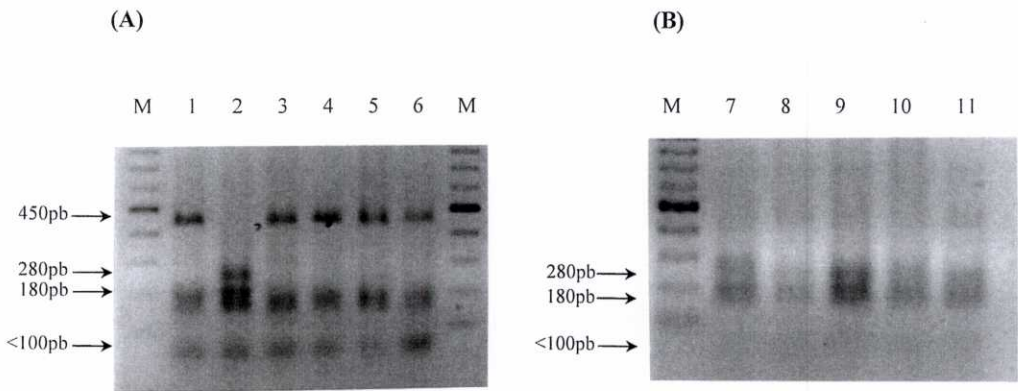
- PHI-1: 3min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 20s, 50°C durante 20s y 72°C durante 30s.
- CaM1: 2.5min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 45s, 61°C durante 1min y 72°C durante 1.5min, con un paso final de elongación de 72°C durante 5min.
- Glu-5': 3min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 20s, 53°C durante 20s y 72°C durante 45s.
- NRPP: 3min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 30s, 56°C durante 30s y 72°C durante 60s.

3.7. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS Y DE LA FRACCIÓN PLIIa

En la costa Atlántica canadiense conviven dos especies de mejillón, *M. edulis* y *M. trossulus*. Por ello, para identificar los individuos de las poblaciones de Prince Edward I. y Bedford B. se realizó la amplificación, descrita por Heath *et al.* (1995), de las regiones ITS-1, 5.8S e ITS-2 (región ITS) situadas entre los genes de ADNr 18S y 28S.. Las reacciones de PCR se realizaron con PCR Supermix, tal y como se indicó en el apartado 3.6, y las secuencias de los *primers* son 5'-GTT TCC GTA GGT GAA CCT G-3' y 5'-CTC GTC TGA TCT GAG GTC G-3'. El protocolo de amplificación consiste en una desnaturalización inicial de 3min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 20s, 55°C durante 20s y 72°C durante 45s. La digestión de 5µL del producto de PCR (~1250pb) con *Hha I* produce RFLPs especie-específicos: *M. edulis* y *M. galloprovincialis* se cortan en dos fragmentos de ~450pb y dos fragmentos de ~180pb y *M. trossulus* da lugar a dos fragmentos de ~280pb, dos de ~180 y varios fragmentos de < 100pb. En nuestros análisis se han detectado híbridos *M. edulis*-*M. trossulus* ya que presentan las bandas de

~450pb y ~280pb, características de ambas especies. En la población de Prince Edward I., se analizaron 46 individuos de los cuales el 73.9% resultó ser *M. edulis*, el 23.9% *M. trossulus* y el 2.2% híbridos de ambas especies (FIGURA 4A). En la población de Bedford B., se analizaron 47 individuos, de los cuales el 80.9% eran *M. trossulus*, el 8.5% *M. edulis* y el 10.6% híbridos *M. edulis-M. trossulus* (FIGURA 4B).

FIGURA 4. Productos de PCR de la región ITS



M, ADN marcador XIV de 100pb; (A) los individuos 1, 3, 4, 5 y 6 de la población de Prince Edward I. pertenecen a la especie *M. edulis*, mientras que el individuo 2 es *M. trossulus*; (B) todos los individuos (7-11) de la población de Bedford B. pertenecen a la especie *M. trossulus*.

La amplificación de la fracción PLIIa de la proteína *protamine-like* esperma-específica PLII de mejillón se realizó en las condiciones citadas en el apartado 3.6 y las secuencias de los *primers* son: 5'-GAG CCC AAG TAG GAA ATC CCG-3' y 5'-CCT TCG CAT TGT TAG ATT TAT T-3'. El protocolo de amplificación consiste en una desnaturalización inicial de 3min a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C durante 20s, 50°C durante 20s y 72°C durante 45s (Heath *et al.*, 1995). La digestión de 5µL del producto de PCR (~475pb) con la endonucleasa *Hinf I* corta el producto de *M. edulis* y de *M. galloprovincialis* en dos fragmentos de ~200pb y uno de <100pb. En el caso del producto de *M. trossulus* algunos fragmentos son digeridos y otros no, observándose dos bandas de ~475pb y ~200pb.

3.8. MARCAJE DE SONDAS

Las sondas de ADN satélite utilizadas en este trabajo han sido cedidas por el Dr. Cornudella del Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CID-CSIC). El ADN a marcar es un inserto que está unido al plásmido Bluescript SK⁺ y se parte de ADN plasmídico purificado.

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. Los *primers* utilizados en el marcaje de las sondas son oligonucleótidos análogos a los promotores de los fagos T3 y T7, que flanquean el inserto a amplificar y sus secuencias son T3: 5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3' y T7: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'. El volumen final de la reacción fue de 100µL y las concentraciones finales de los componentes de esta fueron: 10mM Tris-HCl, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl pH 8.3, 4U Taq ADN polimerasa (tampón y enzima de Roche), 0.2mM de dATP, dGTP y dCTP, 0.19mM de dTTP, 0.01mM de Digoxigenina 11-dUTP (dNTPs y digoxigenina de Roche), 2ng de la sonda a marcar y 0.2µM de los *primers* T3/T7 (Stratagene). La reacción se sometió a los siguientes ciclos de temperatura: 1 ciclo de desnaturalización de 5min a 94°C, 1 ciclo de 5min de hibridación a 55°C, 35 ciclos de 2min a 72°C, 45s a 94°C y 45s a 55°C, 1 ciclo de 10min a 72°C y, finalmente, se mantuvo a 4°C.

3.9. ANÁLISIS DEL ADN SATÉLITE *Apa I* MEDIANTE HIBRIDACIÓN SOUTHERN BLOT

El ADN genómico fue digerido con distintas enzimas de restricción, se separó mediante electroforesis en geles de agarosa y se transfirió a membranas de nylon. El ADN fijado a la membrana se hibridó posteriormente con tres sondas de ADN repetido.

3.9.1. Electroforesis y transferencia a membrana

Para el análisis mediante Southern blot, 10µg de ADN genómico fueron digeridos con cuatro enzimas de restricción (*Hae III*, *Msp I*, *Dra I* y *Taq I*) en las condiciones recomendadas por el fabricante. Los fragmentos de restricción resultantes se separaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa de 25cm de longitud y al 1.5% en 1xTAE, en los que se

incluyen: ADN marcador VIII marcado con digoxigenina (Roche) y un control positivo, que consiste en una mezcla de los insertos de los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I*. La electroforesis se realizó a 40 voltios durante 6h.

Tras la electroforesis, se procedió a la desnaturalización y neutralización del gel, mediante dos lavados de 15min con agitación suave en las soluciones correspondientes. Posteriormente, los fragmentos de restricción 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 los factores citados, permitió establecer las condiciones óptimas de transferencia para nuestros fragmentos. La transferencia se realizó en 10xSSC durante 1h a 127-178mm de Hg y, posteriormente, para fijar el ADN a la membrana se expuso durante 5min a U.V. en un CL-1000 Ultraviolet Crosslinker (UVP), estando aún húmeda.

3.9.2. Prehibridación e hibridación de la membrana

Una vez introducidas las membranas en botellas de cristal (HybaidTM), se prehibridaron durante 30min a 50°C 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 25ng/mL de solución de hibridación. Las membranas se incubaron en un horno HybaidTM a 50°C durante 16h aproximadamente, en rotación constante.

3.9.3. 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 477nm, la cual es recogida en películas Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech). La señal quimiluminiscente 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 5min en tampón de lavado 1 a temperatura ambiente, seguido de dos lavados de 5min a 50°C en los tampones de lavado 2 y 3, respectivamente, y a continuación un lavado de 5min, a temperatura ambiente, en tampón de lavado 4. Posteriormente, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo, incubando la membrana durante 30min en 100mL de tampón bloqueante.

El conjugado anti-Dig-AP (Roche) se diluyó a 75mU/mL en tampón bloqueante y la membrana se incubó durante 30min en 20mL de dicha solución. El anticuerpo no unido al ADN se elimina mediante dos lavados de 15min en 100mL 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 5min en 10mL de dicha solución. Para incrementar la reacción de quimiluminiscencia, se incubó la membrana durante 15min a 37°C y, posteriormente, se expuso durante 15min a temperatura ambiente con la película autorradiográfica.

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

3.10. HIBRIDACIÓN DOT BLOT

El número de copia de los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I*, se determinó mediante hibridaciones con el ADN transferido a membranas de nylon. Se depositaron cantidades crecientes de insertos de ADN monoméricos (0.2 a 0.8ng) de los tres tipos de secuencias y de ADN genómico de mejillón (25 a 200ng) en puntos discretos de membranas de nylon. Para ello, se utilizó el aparato de transferencia de punto Bio-Dot (Bio-Rad), siendo las condiciones de transferencia las recomendadas por el fabricante. Las membranas con el ADN fijado se hibridaron independientemente con los tres tipos de secuencias marcadas con dígoxigenina (apartado 3.8). Los lavados posthibridación y la detección de la hibridación se realizaron como se ha descrito en el apartado 3.9.3 del Southern blot.

Tras la exposición de la membrana a la película autorradiográfica, la densidad óptica de cada punto se determinó mediante el programa Leica Q-WIN versión 2.2 (Leica Imaging

Systems Ltd.). La actividad específica del ADN de cada tipo de monómero se calculó relacionando su masa con la densidad óptica en cada punto. El número de copia de los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I* de cada población se determinó posteriormente a partir de la densidad óptica de cada punto del ADN genómico y mediante análisis de regresión lineal, tomando como recta patrón la proporcionada por los valores de densidad óptica de las unidades monoméricas. El número de copia de estos tres tipos de secuencias satélite en las diferentes poblaciones se expresó como contenido de ADN por célula haploide, considerando el valor C o complemento genómico haploide de ADN obtenido por Rodríguez-Juiz *et al.* (1996) y González-Tizón *et al.* (2000). Dicho contenido está estimado en: $1.71 \pm 0.01\text{pg}$ para *M. edulis*, $1.92 \pm 0.02\text{pg}$ para *M. galloprovincialis*, $1.51 \pm 0.03\text{pg}$ para *M. trossulus* y $1.61 \pm 0.04\text{pg}$ para *M. californianus*.

3.11. DISEÑO DE *PRIMERS* PARA EL ADN SATÉLITE *Apa I*

Se diseñaron *primers* específicos para amplificar los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I* a partir de las secuencias consenso ADN satélite *Apa I* de *M. edulis* publicadas en el GenBank, cuyos códigos de acceso son: X61120, X61119 y AJ249690 para las secuencias tipo I, tipo II y tipo III, respectivamente (Ruiz-Lara *et al.*, 1992; Ruiz-Lara, 1993).

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados en las reacciones de PCR se diseñaron mediante el programa informático OLIGO (Rychlik & Rhoads, 1989). Los *primers* (Life Technologies) fueron suministrados liofilizados con una pureza estándar y, para su utilización, se resuspendieron en 1xTE con una concentración final de $100\mu\text{M}$.

Las reacciones de PCR se realizaron en las condiciones citadas en el apartado 3.6. El protocolo de amplificación para las secuencias ADN satélite tipo I consiste en una desnaturalización inicial de 3min a 94°C , seguida de 35 ciclos de 94°C durante 1min, 45°C durante 30s y 72°C durante 45s, con un paso final de elongación de 72°C durante 5min y, finalmente, se mantiene a 4°C . Las condiciones para las secuencias ADN satélite tipo II y tipo III varían en la temperatura de hibridación, siendo de 55°C y 58°C , respectivamente. Los fragmentos resultantes se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.5% y su tamaño se determinó en función de marcadores de peso molecular como se describe en el apartado 3.4.

3.12. SECUENCIACIÓN DEL ADN SATÉLITE *Apa I*

3.12.1. Clonación de los tres tipos de secuencias ADN satélite

La amplificación de los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I* por PCR mediante *primers* específicos a partir de ADN genómico ha permitido llevar a cabo la clonación de estos fragmentos en vectores plasmídicos. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM[®]-T Easy, mediante el sistema pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega), utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. El vector pGEM[®]-T Easy tiene un tamaño de 3015pb con una región *polylinker* que es amplificada mediante los *primers* específicos de los fagos T7 y SP6. Para calcular la cantidad apropiada de producto de PCR (inserto) en la reacción de ligación, se utilizó la siguiente ecuación:

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

Las reacciones de ligación se realizaron considerando la relación molar vector:inserto de 3:1 y el enzima utilizado fue la ADN ligasa T4. El volumen final de reacción fue de 10µL y la incubación se llevó a cabo durante 10h 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 *shock* térmico y se introdujeron en medio LB líquido conteniendo 100µg/µL de ampicilina, creciendo durante 1.5h a 37°C con agitación. Tras la incubación, se procedió al cultivo en medio LB sólido conteniendo 100µg/µL de ampicilina y suplementado con 0.5mM IPTG y 80µg/mL X-Gal.

3.12.2. 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 sobre el gen β-galactosidasa, presente en el vector plasmídico. Una vez seleccionados los transformantes (colonias blancas), se sembraron en

medio LB sólido, conteniendo 100µg/µL de ampicilina, y se incubaron durante 24h a 37°C, conservándose una alícuota en glicerol 40% (1:1) a -80°C. Posteriormente, se realizaron mini-preparaciones de ADN plasmídico, como se describe en el apartado 3.3, detectándose la presencia de los insertos mediante digestión con la endonucleasa *Eco RI*. Los resultados de la digestión se observaron en geles de agarosa al 1%.

3.12.3. 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 ALFexpressTM (Amersham Pharmacia Biotech) y los *primers* fluorescentes de los promotores de los fagos SP6 (universal) y T7 (reverso), según las instrucciones del fabricante.

3.13. HIBRIDACIÓN *IN SITU* SOBRE CROMOSOMAS

La técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) utilizada en este trabajo es semejante a la descrita en Heslop-Harrison *et al.* (1991), con ligeras modificaciones.

3.13.1. Obtención de metafases de individuos adultos

Individuos de talla inferior a 25mm se mantuvieron durante 10 días (para activarles el crecimiento) en una cámara de fotoperíodo, en recipientes con agua de mar y aireación. Durante ese tiempo se alimentaron con una mezcla de las algas *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis suecica*. Con el fin de bloquear las células mitóticas en metafase, los mejillones fueron sometidos a tratamiento con colchicina, a una concentración final de 0.005%, durante 7-10h.

Para la obtención de las metafases, se diseccionó el tejido branquial y se realizaron dos choques hipotónicos con KCl al 0.56% durante 15min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron dos fijaciones iniciales de 10min a 4°C con carnoy (etanol: ácido acético, 3:1), seguidas de otras dos fijaciones con carnoy a la misma temperatura durante 20min. La disociación del tejido se realizó en agua acetilada al 45% y la extensión de la suspensión celular sobre portaobjetos precalentados a $43 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.13.2. Pretratamiento de las preparaciones citológicas

Para eliminar el ARN que pudiera hibridar con las sondas empleadas y dar lugar a falsas señales de hibridación, se incubaron las preparaciones a 37°C durante 1h con 100µL de una solución 100µg/µL de ARNasa libre de ADNasa en 2xSSC. Transcurrida la incubación se realizaron dos lavados de 5min en 2xSSC a temperatura ambiente.

A continuación, las preparaciones se incubaron en solución de pepsina durante 10min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces durante 5min en PBS. Posteriormente, se fijaron durante 10min en solución de formaldehído, seguido de dos lavados de 5min en PBS. Finalmente, se realizó la deshidratación de las preparaciones mediante baños sucesivos de 5min en etanol al 70%, 90% y 100% y se dejaron secar a temperatura ambiente.

3.13.3. Hibridación

La hibridación se llevó a cabo, generalmente, en presencia de formamida, dextrano de sulfato y NaCl en las concentraciones apropiadas en función de la astringencia requerida. En este caso, la hibridación se realizó a 37°C en cámara húmeda durante toda la noche, utilizando para ello una mezcla de 30µL de solución de hibridación que contiene: 50% de formamida desionizada en 2xSSC, 10% de dextrano de sulfato, 0.33% SDS, 0.3mg/mL de ADN de salmón, desnaturalizado y fragmentado, y ADN marcado (100ng por preparación). La mezcla de hibridación se desnaturalizó previamente a 75°C durante 15min y, posteriormente, se colocaron las preparaciones en el termociclador (PTC-100 de M.J. Research Inc.) con el siguiente ciclo: 7min a 75°C, 2min a 55°C, 30s a 50 °C, 1min a 45°C, 2min a 42°C, 5min a 40°C, 5min a 38°C.

3.13.4. Lavados posthibridación y bloqueo

Los lavados son necesarios para la eliminación de exceso de sonda marcada y permiten disociar los híbridos o uniones inespecíficas. La eficacia de los lavados reduce la señal de fondo, incrementándose la proporción señal/fondo. Las condiciones de astringencia utilizadas son las siguientes: 5min a 42°C en 2xSSC, 10min a 42°C en solución de formamida, 5min a 42°C en 0.1xSSC, 5min a 42°C en 2xSSC y 5min en TNT. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon mediante una incubación de 30min en TNB a 37°C y una incubación posterior de 5min en TNT.

3.13.5. Detección de la hibridación

Las sondas marcadas con digoxigenina-11-dUTP se detectan por métodos inmunocitoquímicos, por medio de los anticuerpos (1) Ig G Anti-Digoxigenina de ratón (Roche) diluido 1:200 en TNB, (2) Ig G Anti-ratón de conejo marcada con FITC (SIGMA), diluido 1:1000 en TNB y (3) Ig G Anti-conejo de cabra marcada con FITC (SIGMA), diluido 1:1000 en TNB. Tras incubar 30min a 37°C con cada anticuerpo, se realizaron tres lavados de 5min en TNT con agitación y en oscuridad. Finalmente, se realizó la deshidratación de las preparaciones mediante baños sucesivos de 5min en etanol al 70%, 90% y 100% y se dejan secar a temperatura ambiente y en oscuridad. La contratinción se realizó con Ioduro de propidio (50ng/mL antifade).

3.13.6. Microscopía y Fotografía

Para realizar el análisis de la hibridación *in situ* con fluorescencia se ha utilizado un microscopio Microphot-FXA de Nikon, dotado de un equipo de epifluorescencia con lámpara de mercurio de 100W y objetivo 100x. La combinación de filtros de Nikon empleada fue B-2A para la fluoresceína (FITC) y G-2A para el Ioduro de propidio. Para la obtención de las diapositivas, se ha utilizado la película color de Kodak Ektachrome Elite de 400 ASA.

3.14. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

3.14.1. Análisis de secuencias de copia única

Las frecuencias genotípicas y alélicas para cada una de las poblaciones analizadas se calcularon a partir de sus correspondientes genotipos. La desviación significativa del equilibrio Hardy-Weinberg se analizó según el algoritmo descrito en Guo & Thompson (1992), utilizando un test análogo al test exacto de Fisher en tablas de contingencia dos a dos, pero extendidas a tablas de contingencia triangular de tamaño arbitrario en un algoritmo al azar de cadenas de Markov. El déficit de heterocigotos (D) se calculó utilizando el Índice de Selander (1970), $D = (H_0 - H_e) / H_e$, donde H_0 es el número de heterocigotos observados y H_e el número de heterocigotos esperados. En ambos casos, se realizó la corrección de Dunn-Sidák, $\alpha' = \alpha / n$, para múltiples hipótesis como se describe en Sokal & Rohlf (1995). La estimación de la distancia genética de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) se llevó a cabo entre pares de

poblaciones, aplicándose los métodos UPGMA (Sneath & Sokal, 1973) y Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) sobre la matriz resultante. El análisis genético de las poblaciones se realizó utilizando los programas informáticos PHYLIP versión 3.5c (Felsenstein, 1993), Biosys-2 (Swofford & Selander, 1997) y Arlequin versión 2000 (Schneider *et al.*, 2000).

3.14.2. Análisis de las secuencias ADN satélite *Apa I*

El contenido de A+T y la búsqueda de repeticiones directas e inversas (tamaño mínimo de la repetición 5pb, 2 *mismatches* permitidos) en las secuencias se llevó a cabo utilizando el programa informático DNATools versión 5.1-revisión 644 (Rasmussen, 1999). La búsqueda de homología de las secuencias obtenidas en este trabajo con otras presentes en las bases de datos de la EMBL y del GenBank se realizó con el programa BLASTN 2.1.1 (Altschul *et al.*, 1997).

Para el análisis comparativo de las distintas secuencias monoméricas clonadas de los diferentes tipos de ADN satélite *Apa I*, se realizó el alineamiento múltiple de todas ellas con el programa informático CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997). El número de sitios polimórficos, la relación entre el número de cambios transicionales y transversionales, la homología entre secuencias y la divergencia nucleotídica entre pares de secuencias se calcularon utilizando el programa MEGA versión 2.0 (Kumar *et al.*, 2000).

Las distancias genéticas entre pares de secuencias se estimaron según el modelo de Kimura dos parámetros (Kimura, 1980) y las filogenias mediante los métodos Neighbor-Joining y máxima parsimonia se realizaron con el programa informático MEGA. La fiabilidad de los clados filogenéticos reconstruidos se analizó mediante *bootstrap* (Felsenstein, 1985) con 1000 réplicas (Hedges, 1992), considerando que las ramas con valores de *bootstrap* mayores de 700 están apoyadas significativamente con una probabilidad $\geq 95\%$ (Hillis & Bull, 1993).

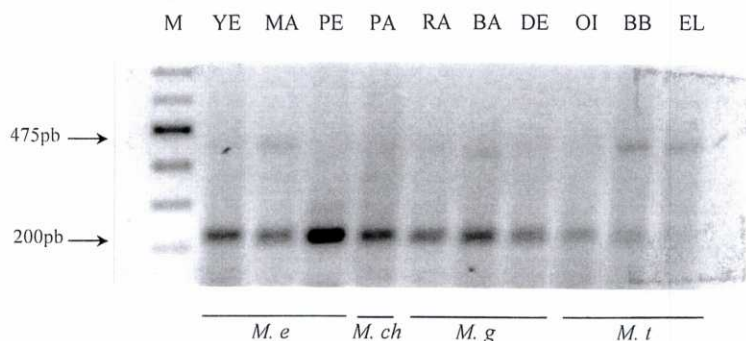
4. RESULTADOS

4.1. SECUENCIAS DE COPIA ÚNICA

4.1.1. Amplificación de la fracción PLIIa de la proteína *protamine-like* espermática específica PLII

La amplificación de la fracción PLIIa produce un fragmento de ~475pb en cada uno de los individuos analizados. Los RFLPs obtenidos tras la digestión con la endonucleasa *Hinf I* producen dos patrones diferentes. En el primero, todos los fragmentos amplificados son digeridos totalmente detectándose una única banda de ~200pb y en el segundo, algunos fragmentos son digeridos y otros no, observándose una banda de ~475pb y una de ~200pb (FIGURA 5). En este último caso, con el fin de evitar que el patrón obtenido sea debido a un error en las condiciones de digestión, éstas se realizaron por duplicado.

FIGURA 5. Digestión de los productos de PCR de la fracción PLIIa



M, ADN marcador XIV de 100pb; **YE**, Yerseke; **MA**, Isle of Man; **PE**, Prince Edward Island; **PA**, Puerto Aguirre; **RA**, Ría de Arosa; **BA**, Balcobo; **DE**, Delta del Ebro; **OI**, Öland Island; **BB**, Bedford Basin; **EL**, Esquimalt Lagoon; *M. e.*, *M. edulis*; *M. ch.*, *M. e. chilensis*; *M. g.*, *M. galloprovincialis*; *M. t.*, *M. trossulus*. Los individuos de las poblaciones de Isle of Man, Balcobo, Bedford B. y Esquimalt L. presentan digestión parcial, mientras que los del resto de poblaciones presentan digestión total.

Las muestras de las poblaciones de Yerseke, I. Man y Prince Edward I., pertenecientes a la especie *M. edulis*, muestran una digestión total de los productos de la amplificación de la PLIIa; aunque en algunos individuos de I. Man (14%) y Prince Edward I. (3%) se observa una digestión

parcial (TABLA V). Este patrón de digestión total también se observa en todos los individuos de la población de P. Aguirre, *M. e. chilensis*, y en las poblaciones de la especie *M. galloprovincialis* (Balcobo, R. Arosa y D. Ebro) es el patrón más frecuente. En el caso de la especie *M. trossulus*, los individuos de Esquimalt L. y Bedford B. producen digestiones parciales, pero en algunos individuos (2) de la población de Öland I. se observa una digestión total de los fragmentos amplificados.

TABLA V

Frecuencias de los fragmentos total y parcialmente digeridos de la amplificación de la fracción PLIIa

	Poblaciones									
	<i>M. edulis</i>				<i>M. galloprovincialis</i>			<i>M. trossulus</i>		
	YE	MA	PE	PA	RA	BA	DE	OI	BB	EL
200	30	30	29	27	34	26	20	2	0	0
475/200	0	5	1	0	22	4	9	30	30	30
n	30	35	30	27	56	30	29	32	30	30

YE, Yerseke; **MA**, Isle of Man; **PE**, Prince Edward Island; **PA**, Puerto Aguirre; **RA**, Ría de Arosa; **BA**, Balcobo; **DE**, Delta del Ebro; **OI**, Öland Island; **BB**, Bedford Basin; **EL**, Esquimalt Lagoon; **n**, número de individuos analizados.

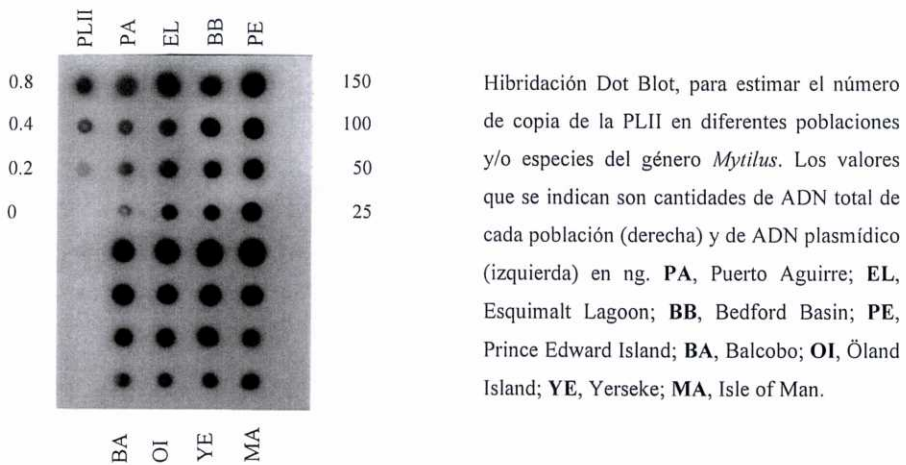
Para estimar el número de copia de la proteína *protamine-like* PLII en el genoma de diferentes especies y/o poblaciones del género *Mytilus* se realizó una hibridación Dot blot (FIGURA 6). Dicha estimación se calculó a partir de la señal de hibridación con PLII sobre membranas, conteniendo distintas concentraciones de ADN genómico de individuos de diferentes poblaciones, mediante la comparación entre la lectura realizada por un densitómetro de dicha señal en las distintas diluciones de ADN genómico y la lectura de la señal de hibridación en las diluciones del ADN plasmídico. Los resultados se muestran en la TABLA VI, en la que se observa que el número de copia de la PLII en las poblaciones analizadas varía entre ~7 y ~13 copias por célula haploide.

TABLA VI

Número de copia de la proteína *protamine-like* PLII en diferentes poblaciones de mejillón

Población	copias/célula haploide
YE	~ 10
MA	~ 13
PE	~ 7
PA	~ 10
BA	~ 13
OI	~ 13
BB	~ 7
EL	~ 10

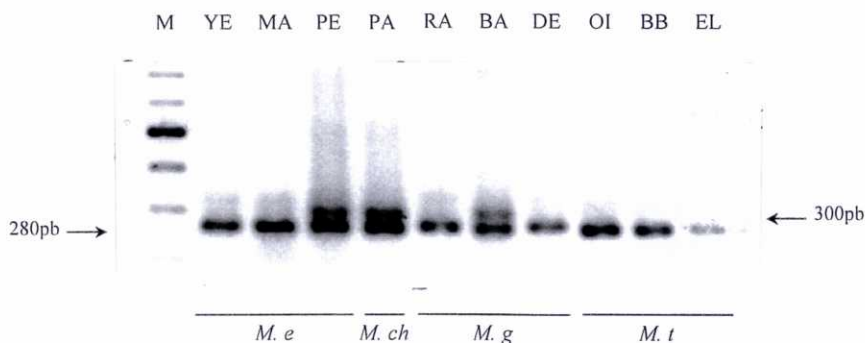
YE, Yerseke; MA, Isle of Man; PE, Prince Edward Island; PA, Puerto Aguirre; BA, Balcobo; OI, Öland Island; BB, Bedford Basin; EL, Esquimalt Lagoon.

FIGURA 6. Número de copia de la proteína *protamine-like* PLII

4.1.2. Amplificación de la proteína *protamine-like* esperma específica PHI-1

En la FIGURA 7, se observan los diferentes patrones obtenidos tras la amplificación por PCR de la *protamine-like* PHI-1, que puede dar lugar a tres tipos de fragmentos diferentes de ~280, ~300 y ~475pb. En la TABLA VII, se reflejan las frecuencias genotípicas y alélicas en todas las poblaciones analizadas, observándose que los individuos de D. Ebro y de las tres poblaciones de *M. trossulus* (Esquimalt L., Bedford B. y Öland I.) son homocigotos para el fragmento de ~280pb. Sin embargo, en los individuos de Yerseke, Prince Edward I., P. Aguirre, R. Arosa y Balcobo se observan frecuencias variables de homocigotos y heterocigotos para los fragmentos de ~280pb y ~300pb, aunque dichas frecuencias no se desvían del equilibrio Hardy-Weinberg. Por el contrario, en la población de I. Man existe una ligera desviación del equilibrio Hardy-Weinberg, debido a un exceso de heterocigotos, y se ha detectado la presencia de un fragmento adicional de ~475pb. Como se observa en dicha tabla, no se han detectado homocigotos para los fragmentos de ~300 y ~475pb en ninguna de las poblaciones analizadas, detectándose un exceso de heterocigotos significativo en el Índice de Selander (D) de las poblaciones de I. Man y P. Aguirre.

FIGURA 7. Productos de PCR de la *protamine-like* PHI-1



M, ADN marcador XIV de 100pb; **YE**, Yerseke; **MA**, Isle of Man; **PE**, Prince Edward Island; **PA**, Puerto Aguirre; **RA**, Ría de Arosa; **BA**, Balcobo; **DE**, Delta del Ebro; **OI**, Öland Island; **BB**, Bedford Basin; **EL**, Esquimalt Lagoon; **M. e**, *M. edulis*; **M. ch**, *M. e. chilensis*; **M. g**, *M. galloprovincialis*; **M. t**, *M. trossulus*. Los individuos de Prince Edward I., P. Aguirre y Balcobo presentan los fragmentos de 280 y 300pb y los individuos del resto de las poblaciones únicamente amplifican el fragmento de 280pb.

TABLA VII

Frecuencias genotípicas y alélicas de la amplificación de la *protamine-like* esperma-específica PHI-1

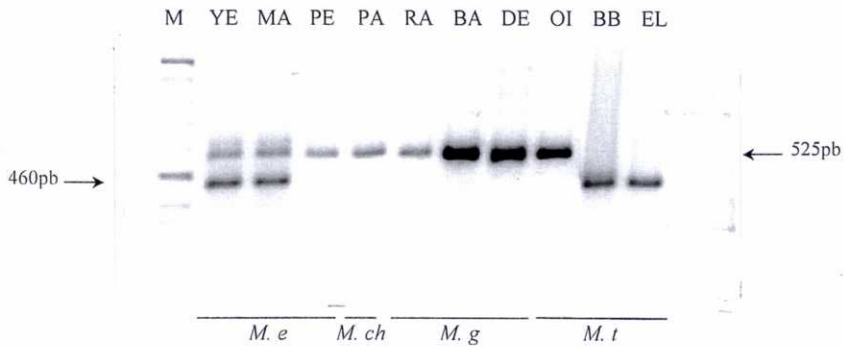
	Poblaciones									
	<i>M. edulis</i>				<i>M. galloprovincialis</i>			<i>M. trossulus</i>		
	YE	MA	PE	PA	RA	BA	DE	OI	BB	EL
280	26	13	17	12	53	24	29	32	30	30
280/300	4	10	13	15	3	6	-	-	-	-
280/475	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-
n	30	35	30	27	56	30	29	32	30	30
280(p)	0.933	0.686	0.783	0.722	0.973	0.900	1	1	1	1
300(q)	0.067	0.143	0.217	0.278	0.027	0.100	0	0	0	0
475(r)	0	0.171	0	0	0	0	0	0	0	0
P	1	0.014*	0.291	0.138	1	1	-	-	-	-
D	0.071	0.310*	0.277	0.385*	0.028	0.111	-	-	-	-

YE, Yerseke; **MA**, Isle of Man; **PE**, Prince Edward Island; **PA**, Puerto Aguirre; **RA**, Ría de Arosa; **BA**, Balcobo; **DE**, Delta del Ebro; **OI**, Öland Island; **BB**, Bedford Basin; **EL**, Esquimalt Lagoon; **n**, número de individuos analizados; **P**, probabilidad de las frecuencias alélicas y equilibrio Hardy-Weinberg según el algoritmo descrito por Guo & Thompson (1992); **D**, Índice de Selander; correcciones Dunn-Sidák, * $\alpha < 0.05$ ** $\alpha < 0.01$.

4.1.3. Amplificación del intrón 3 del gen de la calmodulina (CaM1)

La electroforesis en geles de agarosa de los productos de PCR revelan polimorfismos de longitud del intron 3 del gen de la calmodulina (CaM1), observándose dos fragmentos de ~525 y ~460pb (FIGURA 8), semejantes a los dos alelos descritos por Côté-Real *et al.* (1994a).

FIGURA 8. Productos de PCR del intrón 3 de la calmodulina



M, ADN marcador XIV de 100pb; YE, Yerseke; MA, Isle of Man; PE, Prince Edward Island; PA, Puerto Aguirre; RA, Ría de Arosa; BA, Balcobo; DE, Delta del Ebro; OI, Öland Island; BB, Bedford Basin; EL, Esquimalt Lagoon; *M. e.*, *M. edulis*; *M. ch.*, *M. e. chilensis*; *M. g.*, *M. galloprovincialis*; *M. t.*, *M. trossulus*. Los individuos de las poblaciones de Yerseke e Isle of Man son heterocigotos para los alelos de 525 y 460pb, los de las poblaciones de Prince Edward I., P. Aguirre, R. Arosa, Balcobo, D. Ebro y Öland I. son homocigotos para el alelo de 525pb y los de Bedford B. y Esquimalt L. son homocigotos para el alelo de 460pb.

En las poblaciones de *M. edulis*, todos los individuos de Prince Edward I. y P. Aguirre únicamente amplifican el alelo de ~525pb y los individuos de Yerseke e I. Man presentan mayoritariamente el alelo de ~525pb, aunque también producen el alelo de ~460pb. En las poblaciones de *M. galloprovincialis*, todos los individuos analizados son homocigotos para el alelo de ~525pb. Por el contrario, los mejillones de las poblaciones de Esquimalt L. y Bedford B. son homocigotos para el alelo de ~460pb, mientras que los de la población de Öland I. lo son para el alelo de ~525pb (TABLA VIII). Así, de las diez poblaciones analizadas únicamente se ha detectado polimorfismo en las poblaciones de Yerseke e I. Man, aunque estas no se desvían significativamente del equilibrio Hardy-Weinberg.

TABLA VIII

Frecuencias genotípicas y alélicas de la amplificación del intrón 3 de la calmodulina (CaM1)

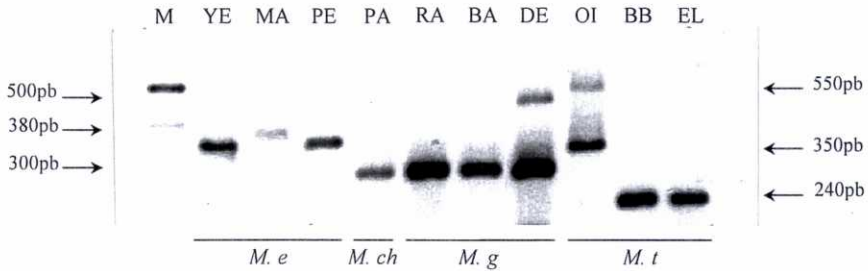
	Poblaciones									
	<i>M. edulis</i>				<i>M. galloprovincialis</i>			<i>M. trossulus</i>		
	YE	MA	PE	PA	RA	BA	DE	OI	BB	EL
525	26	23	30	27	56	30	29	32	-	-
525/460	3	11	-	-	-	-	-	-	-	-
460	1	1	-	-	-	-	-	-	30	30
n	30	35	30	27	56	30	29	32	30	30
525(p)	0.917	0.814	1	1	1	1	1	1	0	0
460(q)	0.083	0.186	0	0	0	0	0	0	1	1
P	0.161	1	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-0.345	0.039	-	-	-	-	-	-	-	-

YE, Yerseke; MA, Isle of Man; PE, Prince Edward Island; PA, Puerto Aguirre; RA, Ría de Arosa; BA, Balcobo; DE, Delta del Ebro; OI, Öland Island; BB, Bedford Basin; EL, Esquimalt Lagoon; n, número de individuos analizados; P, probabilidad de las frecuencias alélicas y equilibrio Hardy-Weinberg según el algoritmo descrito por Guo & Thompson (1992); D, Índice de Selander; correcciones Dunn-Sidak, * $\alpha < 0.05$ ** $\alpha < 0.01$.

4.1.4. Amplificación del extremo 5' del exón gigante de la proteína polifenólica adhesiva del biso (Glu-5')

La amplificación de Glu-5' puede producir seis fragmentos diferentes de, aproximadamente, 240, 300, 350, 380, 500 y 550pb (FIGURA 9). En la TABLA IX, se puede observar que las poblaciones de Balcobo y Esquimalt L. son monomórficas para los alelos de ~300 y ~240pb, respectivamente; las poblaciones de Yerseke, P. Aguirre, R. Arosa y D. Ebro presentan dos alelos diferentes; las poblaciones de Prince Edward I., Öland I. y Bedford B. presentan tres alelos; y, finalmente, en la I. Man se detectan cinco alelos diferentes.

FIGURA 9. Productos de PCR del gen Glu-5'



M, ADN marcador XIV de 100pb; YE, Yerseke; MA, Isle of Man; PE, Prince Edward Island; PA, Puerto Aguirre; RA, Ría de Arosa; BA, Balcobo; DE, Delta del Ebro; OI, Öland Island; BB, Bedford Basin; EL, Esquimalt Lagoon; *M. e.*, *M. edulis*; *M. ch.*, *M. e. chilensis*; *M. g.*, *M. galloprovincialis*; *M. t.*, *M. trossulus*. Los individuos de las poblaciones de Yerseke y Prince Edward I. son homocigotos para el alelo de 350pb y el individuo de Isle of Man es homocigoto para el alelo de 380pb. Los individuos de las poblaciones de P. Aguirre, R. Arosa y Balcobo son homocigotos para el alelo de 300pb y el individuo de D. Ebro es heterocigoto para los alelos de 300 y 500pb. El individuo de Öland I. es heterocigoto para los alelos de 350 y 550pb y los individuos de las poblaciones de Bedford B. y Esquimalt L. son homocigotos para el alelo de 240pb.

Cabe destacar que el alelo de ~240pb únicamente se ha detectado en las poblaciones de *M. trossulus* y que el alelo de ~300pb es el más frecuente en las poblaciones de *M. galloprovincialis*. De todas las poblaciones analizadas sólo Bedford B. no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, detectándose también valores significativos del índice de Selander (D) en las poblaciones de I. Man y D. Ebro.

TABLA IX
Frecuencias genotípicas y alélicas de la amplificación del extremo 5' del gen de la proteína polifenólica adhesiva del biso (Glu-5')

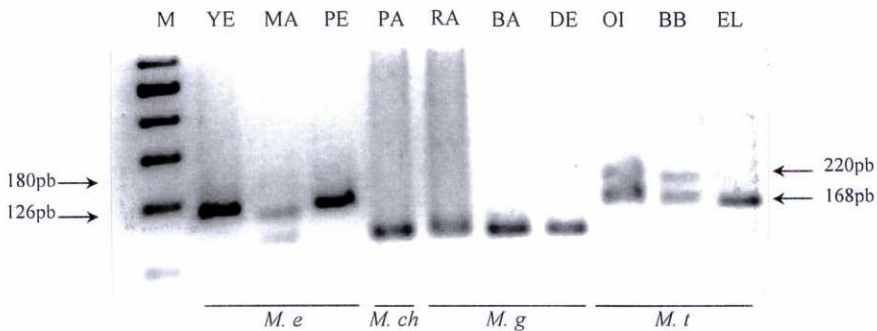
	Poblaciones									
	<i>M. edulis</i>				<i>M. galloprovincialis</i>			<i>M. trossulus</i>		
	YE	MA	PE	PA	RA	BA	DE	OI	BB	EL
240	-	-	-	-	-	-	-	-	9	30
240/550	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
300	-	-	-	22	52	30	12	-	-	-
300/350	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-
300/380	-	2	-	-	4	-	-	-	-	-
300/500	-	3	-	-	-	-	17	-	-	-
350	21	5	19	-	-	-	-	4	4	-
350/380	-	3	6	-	-	-	-	5	-	-
350/500	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
350/550	9	2	5	-	-	-	-	17	1	-
380	-	10	-	-	-	-	-	5	-	-
380/550	-	5	-	-	-	-	-	1	-	-
550	-	2	-	-	-	-	-	-	14	-
n	30	35	30	27	56	30	29	32	30	30
p (240)	0	0	0	0	0	0	0	0	0.333	1
q (300)	0	0.071	0	0.907	0.964	1	0.707	0	0	0
r (350)	0.850	0.257	0.817	0.093	0	0	0	0.469	0.150	0
s (380)	0	0.429	0.100	0	0.036	0	0	0.250	0	0
t (500)	0	0.086	0	0	0	0	0.293	0	0	0
u (550)	0.150	0.157	0.083	0	0	0	0	0.281	0.517	0
P	1	0.16	0.551	1	1	-	0.064	0.073	0**	-
D	0.176	0.279**	0.160	0.102	0.037	-	0.415*	0.125	0.833**	-

YE, Yerseke; MA, Isle of Man; PE, Prince Edward Island; PA, Puerto Aguirre; RA, Ría de Arosa; BA, Balcobo; DE, Delta del Ebro; OI, Öland Island; BB, Bedford Basin; EL, Esquimalt Lagoon; n, número de individuos analizados; P, probabilidad de las frecuencias alélicas y equilibrio Hardy-Weinberg según el algoritmo descrito por Guo & Thompson (1992); D, Índice de Selander; correcciones Dunn-Sidák, * $\alpha < 0.05$ ** $\alpha < 0.01$

4.1.5. Amplificación de la región no repetitiva de la proteína del pie 1 (NRPP)

La amplificación de la región NRPP produce cuatro fragmentos de ~126, ~168, ~180 y ~220pb (FIGURA 10). En la TABLA X, se observa que las poblaciones de Yerseke y Prince Edward I. presentan únicamente el alelo de ~180pb característico de *M. edulis*, mientras que la población de I. Man presenta con mayor frecuencia el alelo de ~168pb, detectándose también los alelos de ~126pb y de ~180pb. La población de P. Aguirre es homocigótica para el alelo de ~126pb, al igual que las tres poblaciones de *M. galloprovincialis* (R. Arosa, Balcobo y D. Ebro). Al analizar las poblaciones de *M. trossulus*, se observa que, mientras que la población de Esquimalt L. es homocigótica para el alelo de ~168pb, las poblaciones de Öland I. y Bedford B. son polimórficas, detectándose un nuevo alelo de ~220pb.

FIGURA 10. Productos de PCR de la región NRPP



M, ADN marcador XIV de 100pb; YE, Yerseke; MA, Isle of Man; PE, Prince Edward Island; PA, Puerto Aguirre; RA, Ría de Arosa; BA, Balcobo; DE, Delta del Ebro; OI, Öland Island; BB, Bedford Basin; EL, Esquimalt Lagoon; *M. e*, *M. edulis*; *M. ch*, *M. e. chilensis*; *M. g*, *M. galloprovincialis*; *M. t*, *M. trossulus*. Los individuos de las poblaciones de Yerseke y Prince Edward I. son homocigotos para el alelo de 180pb, el individuo de Isle of Man es heterocigoto para los alelos de 168 y 126pb, los individuos de las poblaciones de P. Aguirre, R. Arosa, Balcobo y D. Ebro son homocigotos para el alelo de 126pb, el individuo de Öland I. es heterocigoto para los alelos de 180 y 220pb, el individuo de Bedford B. es heterocigoto para los alelos de 168 y 220pb y el individuo de Esquimalt L. es homocigoto para el alelo de 168pb.

La población de I. Man es la única que no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg, aunque también se han detectado valores significativos del Índice de Selander (D), debido a un déficit de heterocigotos, en las poblaciones de Öland I. y Bedford B.

TABLA X

Frecuencias genotípicas y alélicas de la amplificación de la región no repetitiva del gen de la proteína polifenólica adhesiva del biso (NRPP)

	Poblaciones									
	<i>M. edulis</i>				<i>M. galloprovincialis</i>			<i>M. trossulus</i>		
	YE	MA	PE	PA	RA	BA	DE	OI	BB	EL
220	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
220/180	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-
220/168	-	-	-	-	-	-	-	1	2	-
180	30	9	30	-	-	-	-	14	-	-
180/168	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
180/126	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
168	-	16	-	-	-	-	-	7	27	30
168/126	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
126	-	6	-	27	56	30	29	-	-	-
n	30	35	30	27	56	30	29	32	30	30
220(p)	-	-	-	-	-	-	-	0.172	0.067	-
180(q)	1	0.300	1	-	-	-	-	0.594	-	-
168(r)	-	0.471	-	-	-	-	-	0.234	0.933	1
126(s)	-	0.229	-	1	1	1	1	-	-	-
P	-	0**	-	-	-	-	-	0.063	0.101	-
D	-	-0.820**	-	-	-	-	-	-0.389**	-0.464*	-

YE, Yerseke; MA, Isle of Man; PE, Prince Edward Island; PA, Puerto Aguirre; RA, Ría de Arosa; BA, Balcobo; DE, Delta del Ebro; OI, Öland Island; BB, Bedford Basin; EL, Esquimalt Lagoon; n, número de individuos analizados; P, probabilidad de las frecuencias alélicas y equilibrio Hardy-Weinberg según el algoritmo descrito por Guo & Thompson (1992); D, Índice de Selander; correcciones Dunn-Sidák, * $\alpha < 0.05$ ** $\alpha < 0.01$

4.1.6. Análisis filogenético del género *Mytilus* mediante secuencias de copia única

Se ha realizado un análisis filogenético de las diez poblaciones del género *Mytilus* analizadas mediante los marcadores de ADN nuclear, basados en PCR, PHI-1, CaM1, Glu-5' y NRPP. Para ello, se aplicaron los métodos de inferencia basados en matrices de distancias, UPGMA y Neighbor-Joining. Las distancias entre pares de poblaciones para los polimorfismos de dichos marcadores, se calcularon según el método de la distancia genética de Cavalli-Sforza (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) y la estimación de las filogenias se realizó con el programa informático de análisis filogenético PHYLIP. Para comprobar la fiabilidad de cada árbol, se realizó un remuestreo por el método *bootstrap*.

La TABLA XI representa la distancia genética de Cavalli-Sforza, para los polimorfismos de PHI-1, CaM1, Glu-5' y NRPP, entre pares de poblaciones. A nivel intraespecífico, se observa que entre las poblaciones de *M. edulis* las más próximas son Yerseke y Prince Edward I. y las más alejadas Yerseke y P. Aguirre. Entre las poblaciones de *M. galloprovincialis*, la distancia más corta se observa entre las poblaciones de Balcobo y R. Arosa y las poblaciones más distantes son Balcobo y D. Ebro. Las poblaciones más próximas de *M. trossulus* son las de Esquimalt L. y Bedford B. y las más alejadas Esquimalt L. y Öland I.

En general, las poblaciones que presentan las distancias más cortas son las poblaciones de Balcobo y R. Arosa, ambas de la costa Noroeste española, y las distancias más grandes se observan entre las poblaciones de P. Aguirre y Esquimalt L., localizadas en el Océano Pacífico.

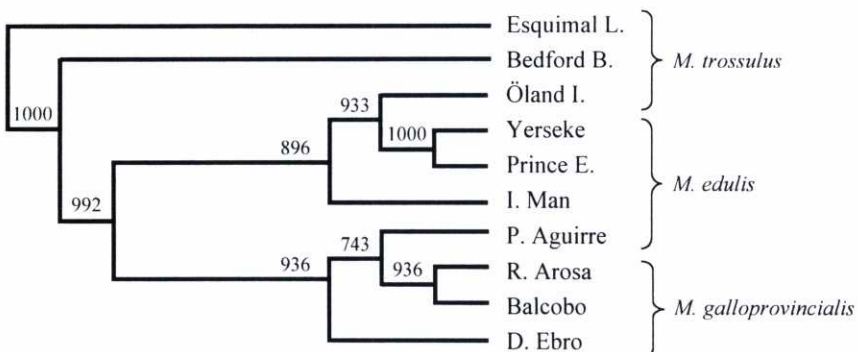
En la FIGURA 11 se muestra el árbol filogenético generado por el método UPGMA, observándose que las poblaciones pertenecientes a la especie *M. galloprovincialis* se agrupan en un *cluster* junto con la población de P. Aguirre (*M. e. chilensis*); la población de Öland Island se agrupa con las poblaciones pertenecientes a *M. edulis* y el resto de poblaciones de *M. trossulus* están juntas en otro *cluster*. Por otro lado, se puede observar que los *clusters* de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* están más próximos entre sí, que cualquiera de ellos con respecto al *cluster* de *M. trossulus*.

TABLA XI
Matriz de distancias genéticas de Cavalli-Sforza*

Poblaciones	<i>M. edulis</i>				<i>M. galloprovincialis</i>			<i>M. trossulus</i>		
	YE	MA	PE	PA	RA	BA	DE	OI	BB	EL
YE	-									
MA	0.344	-								
PE	0.044	0.313	-							
PA	0.656	0.476	0.628	-						
RA	0.744	0.492	0.724	0.051	-					
BA	0.743	0.526	0.732	0.027	0.011	-				
DE	0.755	0.512	0.769	0.127	0.068	0.077	-			
OI	0.171	0.229	0.151	0.706	0.698	0.746	0.727	-		
BB	0.767	0.581	0.930	1.103	1.096	1.110	1.091	0.647	-	
EL	0.999	0.747	1.133	1.146	1.096	1.110	1.091	0.915	0.166	-

*Cavalli-Sforza & Edwards, 1967. **YE**, Yerseke; **MA**, Isle of Man; **PE**, Prince Edward Island; **PA**, Puerto Aguirre; **RA**, Ria de Arosa; **BA**, Balcobo; **DE**, Delta del Ebro; **OI**, Öland Island; **BB**, Bedford Basin; **EL**, Esquimalt Lagoon.

FIGURA 11. Árbol UPGMA obtenido a partir del polimorfismo generado por las amplificaciones de PHI-1, CaM1, Glu-5' y NRPP. Los valores de *bootstrap* mayores de 500 se han señalado sobre los nodos.



4.2. SECUENCIACIÓN DEL ADN SATÉLITE *Apa I*

La estrategia seguida en el diseño de *primers* para amplificar los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I*, consistió en buscar pares de *primers* que, solapándose en los extremos, amplifiquen unidades monoméricas lo más perfectas posibles. Así, en el caso del satélite tipo I las secuencias de los *primers* son S1F: 5'-TTC CAT ATC AAC CAC ACA TT-3', que se une desde las posiciones nucleotídicas 44 hasta 63, y S1B: 5'-AAT ACG TAA ATG GGC AAC TT-3', que se une desde las posiciones nucleotídicas 24 hasta 43 (FIGURA 12A). Para el satélite tipo II, las secuencias de los *primers* son S2F: 5'-ACC AAA ACT CCC AAA ATC AA-3', que se une desde las posiciones nucleotídicas 32 hasta 51, y S2B: 5'-CCC AAC AGT TTA GGA ATT AG-3', que se une desde las posiciones nucleotídicas 12 hasta 31 (FIGURA 12B). Por último, las secuencias de los *primers* del satélite tipo III son S3F: 5'-GTC ACC CTA CCG CTA CTT TG-3', que se une desde las posiciones nucleotídicas 98 hasta 117, y S3B: 5'-CAT CCA CCT TCT TTC GTT CA-3', que se une desde las posiciones nucleotídicas 73 hasta 92 (FIGURA 12C). Así, mientras en el caso de las secuencias tipo I y tipo II el solapamiento de los *primers* y las amplificaciones de las unidades monoméricas son perfectas, en el caso de las secuencias tipo III las unidades monoméricas amplificadas por PCR tendrán una longitud de ~161pb.

De acuerdo a las condiciones de PCR citadas en Material y Métodos (apartado 3.11), se amplificó ADN genómico de diferentes especies del género *Mytilus* y de la especie *Perna canaliculus* con los *primers* diseñados para los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I*. Las poblaciones utilizadas fueron las siguientes: (1) Yerseke para la especie *M. edulis*, (2) P. Aguirre para *M. e. chilensis*, (3) Balcobo para *M. galloprovincialis*, (4) Esquimalt L. para *M. trossulus*, (5) Point no point para *M. californianus* y (6) Golden Bay para *P. canaliculus*. Los productos de PCR correspondientes al dímero para cada tipo de secuencias satélite se ligaron al plásmido pGEM[®]-T Easy y los plásmidos recombinantes fueron introducidos en cepas JM109 de *E. coli*.

La selección de los clones recombinantes se realizó entre aquellos que presentaban el dímero tras digerir el ADN plasmídico con *Eco RI*, la cual libera el inserto, y observar los resultados en geles de agarosa al 1%, para evitar la lectura y posterior análisis de las secuencias de los *primers*. De esta forma, en la secuenciación de los correspondientes insertos únicamente se tienen en cuenta las unidades de repetición tal como aparecen en las FIGURAS 12 a 17.

Se seleccionaron 20 clones para las **secuencias ADN satélite tipo I**: tres para *M. edulis* (pEYE101, pEYE110 y pEYE112), tres para *M. e. chilensis* (pChPA107, pChPA108 y

pChPA109), cinco para *M. galloprovincialis* (pGBA102, pGBA110, pGBA111, pGBA112 y pGBA113), tres para *M. trossulus* (pTEL101, pTEL110 y pTEL112), tres para *M. californianus* (pCaP104, pCaP105 y pCaP106) y tres para *P. canaliculus* (pPcGB102, pPcGB107 y pPcGB108). Las secuencias nucleotídicas de estos clones tienen una longitud de 346pb, excepto pChPA108, pChPA109 y pCaP105 que son de 348pb y pCaP104 y pCaP106 que tienen una longitud de 340 y 350pb, respectivamente.

Para las **secuencias ADN satélite tipo II**, se secuenciaron 16 clones: tres para *M. edulis* (pEYE206, pEYE207 y pEYE208), tres para *M. e. chilensis* (pChPA214, pChPA215 y pChPA216), tres para *M. galloprovincialis* (pGBA201, pGBA202 y pGBA203), tres para *M. trossulus* (pTEL207, pTEL208 y pTEL209), uno para *M. californianus* (pCaP213) y tres para *P. canaliculus* (pPcGB231, pPcGB232 y pPcGB234), cuyas secuencias nucleotídicas tienen una longitud de 322pb, excepto el clon pTEL209 que es de 320pb.

En el caso de las **secuencias ADN satélite tipo III**, fueron seleccionados 16 clones: dos para *M. edulis* (pEYE312 y pEYE313), tres para *M. e. chilensis* (pChPA301, pChPA302 y pChPA303), tres para *M. galloprovincialis* (pGBA314, pGBA315 y pGBA316), tres para *M. trossulus* (pTEL305, pTEL306 y pTEL307), tres para *M. californianus* (pCaP301, pCaP302 y pCaP303) y dos para *P. canaliculus* (pPcGB305 y pPcGB316). Las secuencias nucleotídicas de los mismos tienen una longitud de 329pb, excepto pGBA314 y pGBA316 que son de 323pb y pGBA315 de 325pb.

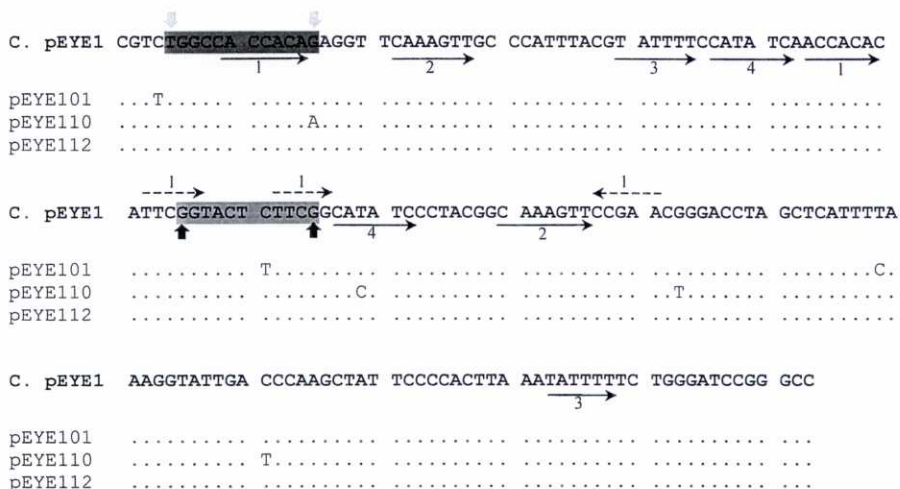
4.2.1. Análisis de la variabilidad intraespecífica

La FIGURA 12 muestra las secuencias nucleotídicas de *M. edulis* para los tres tipos de ADN satélite *Apa I*, así como las correspondientes consenso derivadas de las mismas. Estas secuencias presentan un elevado grado de homología interna, alrededor del 97% para el satélite tipo I, del 96% para el tipo II y del 100% para el tipo III. Entre ellas difieren entre 3 y 7 nucleótidos en el caso de las tipo I y entre 4 y 9 nucleótidos en las de tipo II, no encontrándose agrupados los sitios variables en ninguna región específica. Las secuencias tipo I y tipo II presentan una divergencia promedio del 1.3% y del 2.0% con sus respectivas consensos y las desviaciones están restringidas a la sustitución de nucleótidos, al no observarse inserciones y/o deleciones. Los tres tipos de secuencias son ricas en AT (53.8% las tipo I, 66.9% las tipo II y 55.0% las tipo III) y presentan repeticiones directas perfectas y repeticiones inversas. En las tipo I se observan cuatro

repeticiones directas perfectas de 6 ó 7 nucleótidos y una repetición inversa de 5 nucleótidos que se encuentra tres veces en la secuencia consenso (FIGURA 12A). En las tipo II, las cuatro repeticiones directas y las tres invertidas son secuencias de 5-7 nucleótidos y las repeticiones invertidas 1 y 2 se encuentran tres veces en la secuencia consenso (FIGURA 12B). Las tipo III también contienen cuatro repeticiones directas e inversas de 6 y 7 nucleótidos y de las cuatro repeticiones inversas observadas, sólo una de ellas (inversión 1) se encuentra tres veces en la secuencia consenso (FIGURA 12C).

FIGURA 12. Secuencias consenso y monoméricas del ADN satélite *Apa I* de *M. edulis*.

(A) Unidades monoméricas del satélite tipo I



(B) Unidades monoméricas del satélite tipo II

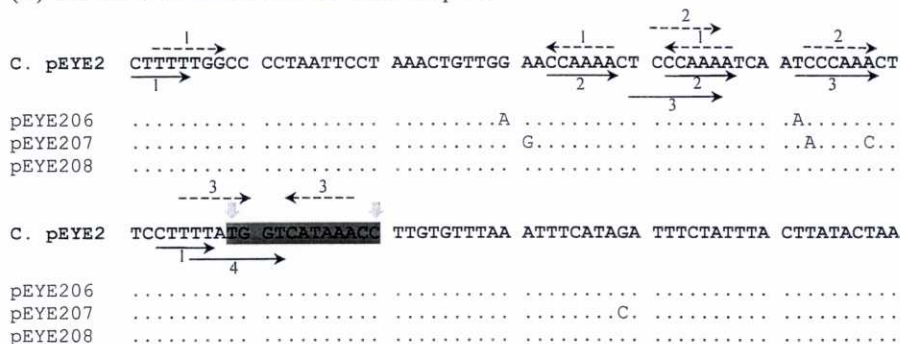
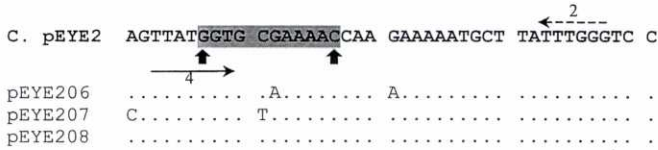
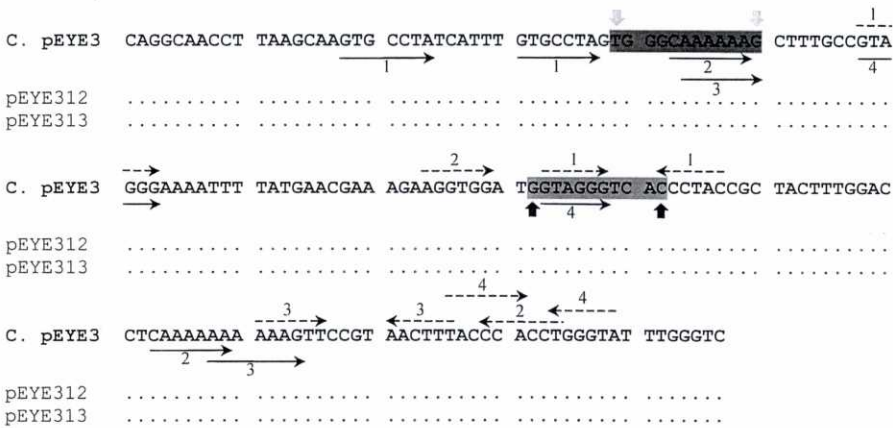


FIGURA 12 (continuación)



(C) Unidades monoméricas del satélite tipo III



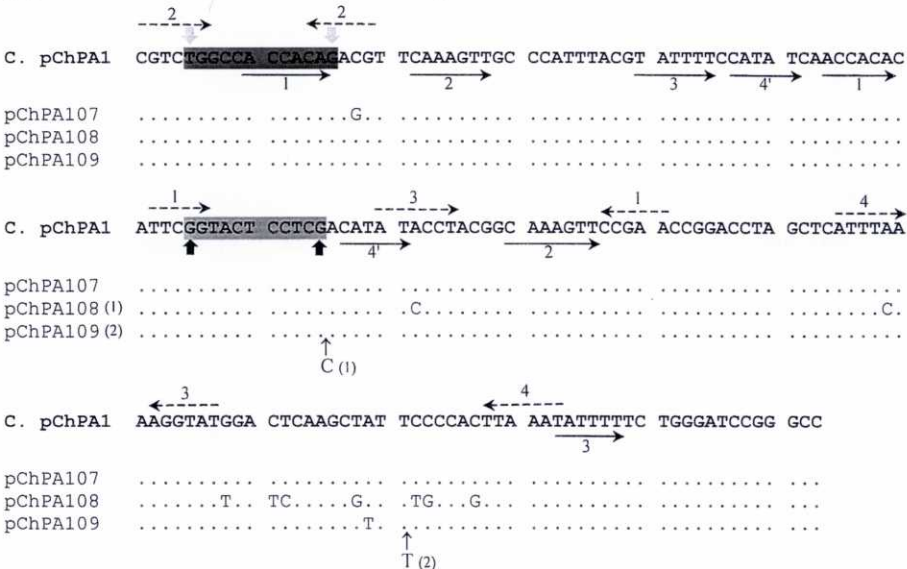
Se han señalado las distintas repeticiones directas e inversas con flechas continuas y flechas discontinuas, respectivamente. Las secuencias homólogas a las secuencias consenso de las cajas A (5'-TGGCANNAGT-GG) y B (5'-GGTTCGANNCC) de los promotores internos de los genes ARNt se han sombreado en gris oscuro y gris claro, respectivamente. La numeración de las repeticiones directas e inversas es la misma para todas las secuencias de un tipo determinado en todas las especies analizadas; así, la secuencia nucleotídica de la repetición directa 1 es la misma en todas las especies analizadas.

Las secuencias nucleotídicas de los clones de *M. e. chilensis* para los tres tipos de ADN satélite *Apa I*, así como las consenso estimadas a partir de las mismas se observan en la FIGURA 13. Cuando las secuencias de los tres clones del satélite tipo I son comparadas entre sí, la homología interna es de alrededor del 96% y el número de sitios polimórficos varía entre 2 y 10, no apareciendo agrupados en ninguna región específica. El clon que tiene una menor divergencia con la secuencia consenso es el pChPA107 (0.6%), ya que las desviaciones de la misma están restringidas a una sustitución nucleotídica. Los clones pChPA108 y pChPA109 tienen una longitud de 174pb, debido a la inserción de 1pb en la posición 76 y 142 respectivamente, y presentan una divergencia del 5.8% y del 1.2% con respecto a la consenso. Los clones

secuenciados para el satélite tipo II tienen una longitud de 161pb y presentan una homología interna del 95% entre ellas, siendo el número de sitios polimórficos entre 5 y 12, y una divergencia promedio del 2.5% con su consenso. Los clones secuenciados para el satélite tipo III tienen una longitud de 167pb y presentan una homología interna del 92% entre ellas, siendo el número de sitios polimórficos entre 13 y 16, y una divergencia promedio del 4.2% con la consenso. En las secuencias tipo II y tipo III, no se han observado inserciones y/o deleciones, estando las desviaciones de las consenso restringidas a sustituciones de nucleótidos. Los tres tipos de secuencias son ricas en AT (53.6% las tipo I, 65.2% las tipo II y 54.3% las tipo III) y presentan repeticiones directas perfectas y repeticiones inversas. En las secuencias tipo I, se observan cuatro repeticiones directas perfectas de 5-7 nucleótidos y cuatro repeticiones inversas de 5 ó 6 nucleótidos. En este caso, la repetición inversa 1 sólo se encuentra dos veces en la consenso (FIGURA 13A). Las secuencias tipo II contienen cinco repeticiones directas perfectas de 5-7 nucleótidos y cuatro repeticiones inversas de 6 y 7 nucleótidos, de las cuales la repetición directa 2 y la inversión 1 se encuentra tres y cuatro veces, respectivamente, en la consenso (FIGURA 13B). En las secuencias tipo III, se observan cuatro repeticiones directas perfectas de 6 ó 7 nucleótidos y de las cuatro repeticiones inversas de 6 nucleótidos, sólo una de ellas (inversión 1) se encuentra tres veces en la consenso (FIGURA 13C).

FIGURA 13. Secuencias consenso y monoméricas del ADN satélite *Apa I* de *M. e. chilensis*.

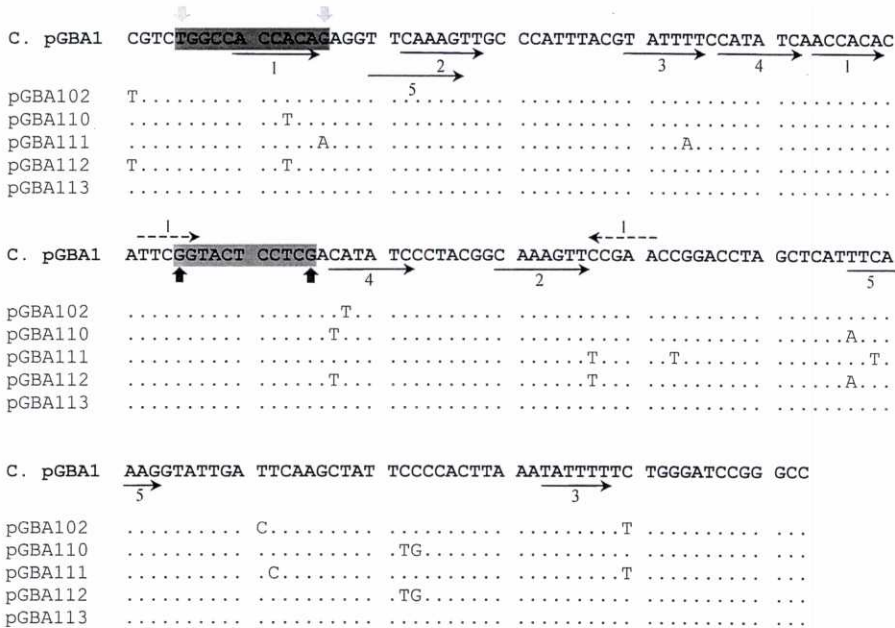
(A) Unidades monoméricas del satélite tipo I



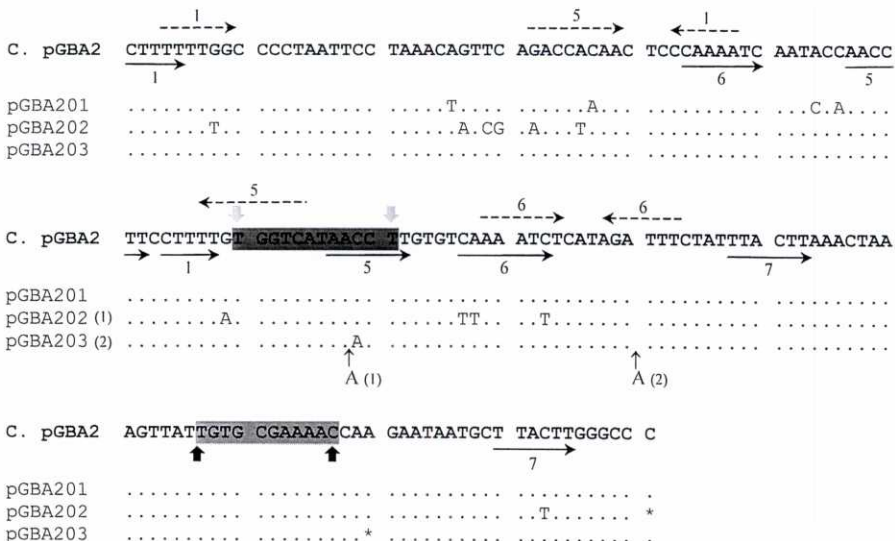
En la FIGURA 14 se observan las secuencias nucleotídicas de los tres tipos de ADN satélite *Apal* para los clones de *M. galloprovincialis* y las correspondientes consenso derivadas. Las secuencias tipo I presentan un elevado grado de homología interna, alrededor del 96%, y entre 2 y 12 sitios variables que no aparecen agrupados en ninguna región específica. La divergencia promedio de estas secuencias con respecto a su consenso es del 2.7% y no se han observado inserciones y/o deleciones. Los clones secuenciados para el satélite tipo II presentan una homología interna del 93% entre ellos y una divergencia promedio del 4.0% con la consenso. El número de sitios polimórficos entre los tres clones varía entre 5 y 11. El clon pGBA202 muestra una mayor divergencia con la secuencia consenso (8.1%), debido a la presencia de 10 sitios variables, una inserción de 1pb en la posición 79 y una deleción de 1pb en la posición 161. Así mismo, el clon pGBA203 presenta una inserción de 1pb en la posición 101 y una deleción de 1pb en la posición 140, aunque presenta una menor divergencia con la consenso (1.2%). Las secuencias tipo III también presentan una homología interna del 93% y el número de sitios polimórficos varía entre 9 y 13. El clon que tiene una menor divergencia con la consenso es el pGBA315 (2.4%), ya que las desviaciones de la misma están restringidas a sustituciones nucleotídicas. Los clones pGBA314 y pGBA316 tienen una longitud de 164pb, debido a una deleción de 1pb en las posiciones 122 y 8 respectivamente. Estos tres tipos de secuencias son ricas en AT (55.0% las tipo I, 65.3% las tipo II y 53.8% las tipo III) y presentan repeticiones directas perfectas y repeticiones inversas. En las secuencias tipo I, se observan cinco repeticiones directas perfectas de 6 y 7 nucleótidos y una repetición inversa de 5 nucleótidos (FIGURA 14A). Las secuencias tipo II contienen cuatro repeticiones directas de 5-7 nucleótidos y tres invertidas de 6 y 8 nucleótidos (FIGURA 14B). En las secuencias tipo III también se observan tres repeticiones directas y cuatro inversas de 6 y 7 nucleótidos, de las cuales sólo la inversión 1 se encuentra tres veces en la secuencia consenso (FIGURA 14C).

FIGURA 14. Secuencias consenso y monoméricas del ADN satélite *Apa I* de *M. galloprovincialis*.

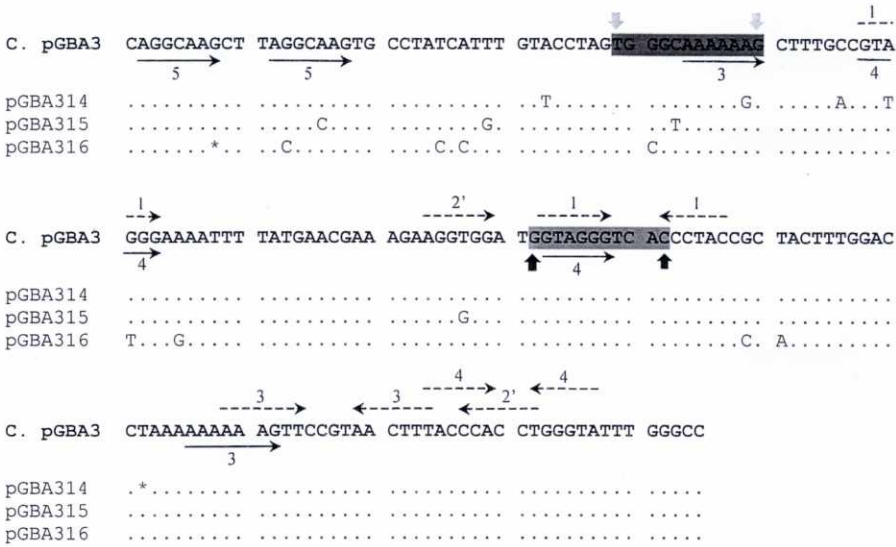
(A) Unidades monoméricas del satélite tipo I



(B) Unidades monoméricas del satélite tipo II



(C) Unidades monoméricas del satélite tipo III



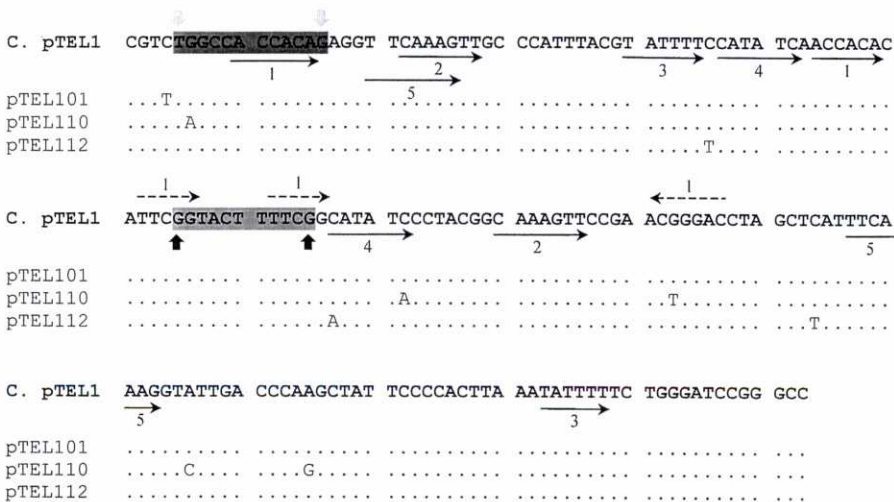
Se han señalado las distintas repeticiones directas e inversas con flechas continuas y flechas discontinuas, respectivamente. Los asteriscos (*) representan deleciones. Las secuencias homólogas a las secuencias consenso de las cajas A (5'-TGGCANNAGT-GG) y B (5'-GGTTCGANNCC) de los promotores internos de los genes ARNt se han sombreado en gris oscuro y gris claro, respectivamente.

La FIGURA 15 muestra las secuencias nucleotídicas de *M. trossulus* para los tres tipos de ADN satélite *Apa I*, así como las correspondientes consenso derivadas de las mismas. Las secuencias tipo I muestran una homología interna de alrededor del 96% y entre ellas difieren entre 4 y 8 nucleótidos. Los tres clones secuenciados tienen una longitud de 173pb, presentan una divergencia promedio del 1.7% con su consenso y las desviaciones están restringidas a sustituciones de nucleótidos. Las secuencias tipo II muestran una homología interna de alrededor del 97% y el número de sitios polimórficos entre ellas varía entre 2 y 7 nucleótidos. La divergencia promedio de estas tres secuencias con su consenso es del 1.9%. En este caso, los clones pTEL207 y pTEL208 presentan una inserción de 1pb en las posiciones 131 y 115 respectivamente, siendo el clon pTEL208 el más divergente de la consenso (3.7%). Las secuencias tipo III presentan una homología interna de alrededor del 98% y entre ellas difieren entre 2 y 5 nucleótidos. La divergencia promedio de este tipo de secuencias con su consenso es del 1% y, al igual que en las tipo I, las desviaciones están restringidas a sustituciones de

nucleótidos al no observarse inserciones y/o deleciones. Al igual que en los casos anteriores, estos tres tipos de secuencias son ricas en AT (54.2% las tipo I, 64.8% las tipo II y 54.6% las tipo III) y presentan repeticiones directas perfectas y repeticiones inversas. Las secuencias tipo I contienen cinco repeticiones directas perfectas de 6 ó 7 nucleótidos y una repetición inversa de 5 nucleótidos que se encuentra tres veces en la consenso (FIGURA 15A). En las tipo II, las cinco repeticiones directas y las cuatro invertidas son secuencias de 5-7 nucleótidos y las repeticiones invertidas 1 y 7 se encuentran tres veces en la consenso (FIGURA 15B). En las secuencias tipo III también se observan cuatro repeticiones directas y tres inversas de 6 y 7 nucleótidos, de las cuales sólo la inversión 1 se encuentra cuatro veces en la consenso (FIGURA 15C).

FIGURA 15. Secuencias consenso y monoméricas del ADN satélite *Apa I* de *M. trossulus*.

(A) Unidades monoméricas del satélite tipo I



(B) Unidades monoméricas del satélite tipo II

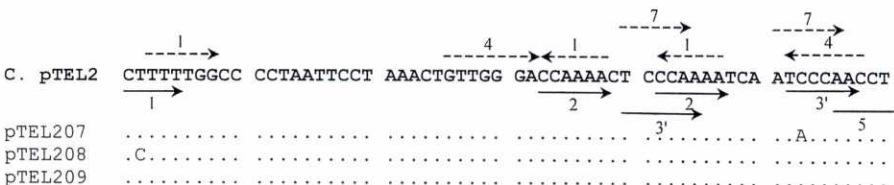
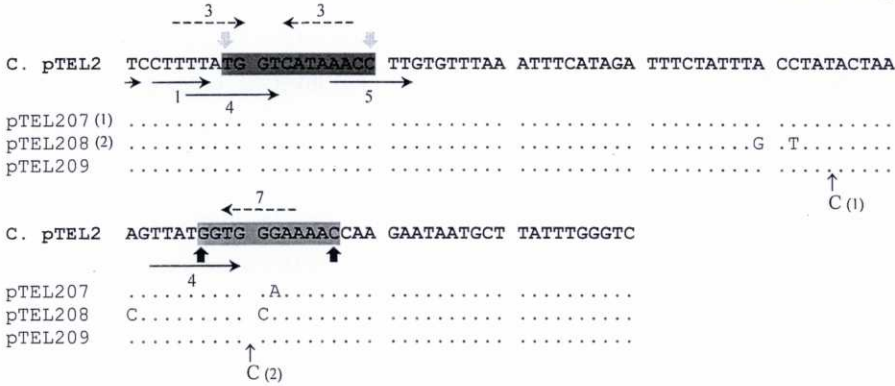
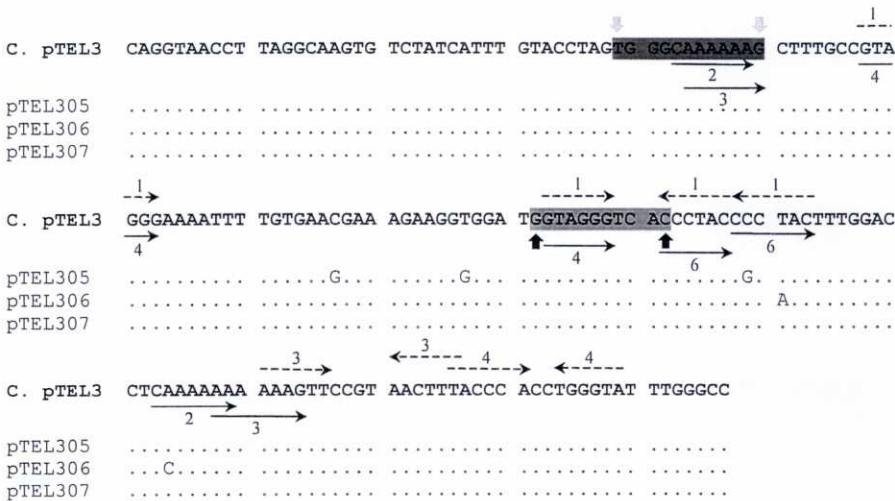


FIGURA 15 (continuación)



(C) Unidades monoméricas del satélite tipo III



Se han señalado las distintas repeticiones directas e inversas con flechas continuas y flechas discontinuas, respectivamente. Las secuencias homólogas a las secuencias consenso de las cajas A (5'-TGGCNNAGT-GG) y B (5'-GGTTCGANNCC) de los promotores internos de los genes ARNt se han sombreado en gris oscuro y gris claro, respectivamente.

Las secuencias nucleotídicas de los clones analizados de *M. californianus* para los tres tipos de ADN satélite *Apa I*, así como las consenso estimadas a partir de las mismas se observan en la FIGURA 16. Las tipo I presentan una homología interna del 95% y entre ellas difieren entre 5 y 13 nucleótidos. Estas secuencias presentan una divergencia promedio del 4% con la consenso y las desviaciones de la misma se deben a sustituciones nucleotídicas, inserciones y/o deleciones. Así, el clon pCaP104 tiene una longitud de 171pb y presenta sustituciones en 8 nucleótidos y 5

deleciones de 1pb situadas en las posiciones 55, 75, 119, 136 y 153. El pCaP105 tiene una longitud de 173pb y presenta sustituciones en 4 nucleótidos, una inserción de 1pb en la posición 40 y una deleción de 2pb en las posiciones 16 y 17. Ambas presentan una homología del 92% entre ellas y una divergencia del 7.4% y 4.6% con la consenso, respectivamente. Las secuencias tipo III presentan una homología interna del 91% y entre ellas difieren entre 1 y 22 nucleótidos. La divergencia promedio de estas secuencias con la consenso es del 4.4%. El clon pCaP302 exhibe una desviación importante con respecto a la consenso (12.6%), ya que presenta sustituciones en 21 nucleótidos, no observándose inserciones y/o deleciones. Al igual que en los casos anteriores, estos tres tipos de secuencias son ricas en AT (56.8% las tipo I, 59.6% la tipo II y 56.7% las tipo III) y presentan repeticiones directas perfectas y repeticiones inversas. En las secuencias tipo I, se observan cuatro repeticiones directas perfectas de 5-8 nucleótidos, de las cuales la inversión 9 se encuentra tres veces en la consenso, y tres repeticiones inversas de 5 y 6 nucleótidos (FIGURA 16A). Las secuencias tipo II contienen cuatro repeticiones directas de 5 y 6 nucleótidos y cinco repeticiones inversas de 5 y 7 nucleótidos, de las cuales sólo la inversión 8 se encuentra tres veces en la consenso (FIGURA 16B). En las secuencias tipo III, sólo se han observado dos repeticiones directas perfectas y cuatro inversas de 6 y 7 nucleótidos, de las cuales la repetición directa 4 y la inversa 1 se encuentran tres y cuatro veces, respectivamente, en la consenso (FIGURA 16C).

FIGURA 16. Secuencias consenso y monoméricas del ADN satélite *Apa I* de *M. californianus*.

(A) Unidades monoméricas del satélite tipo I

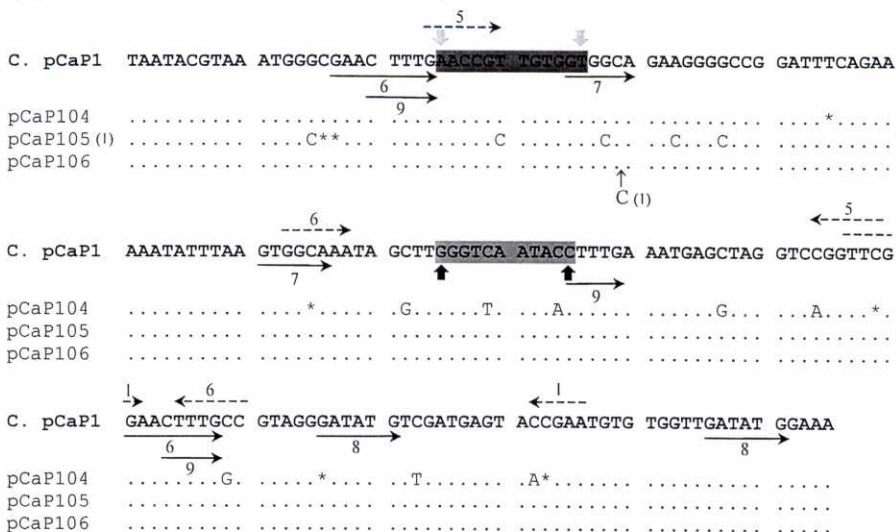
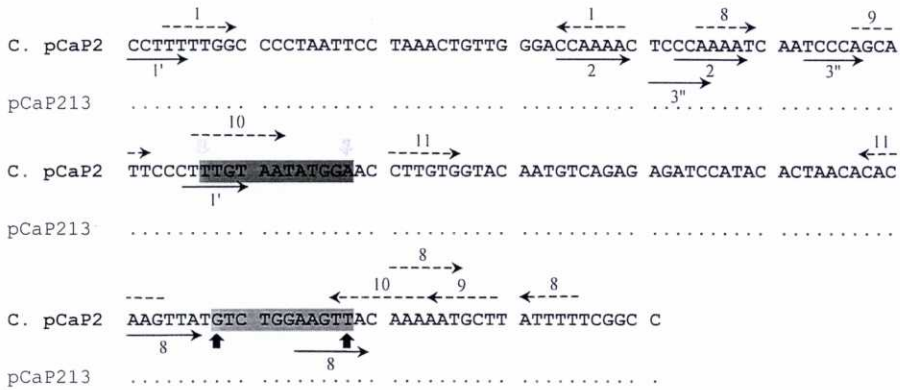
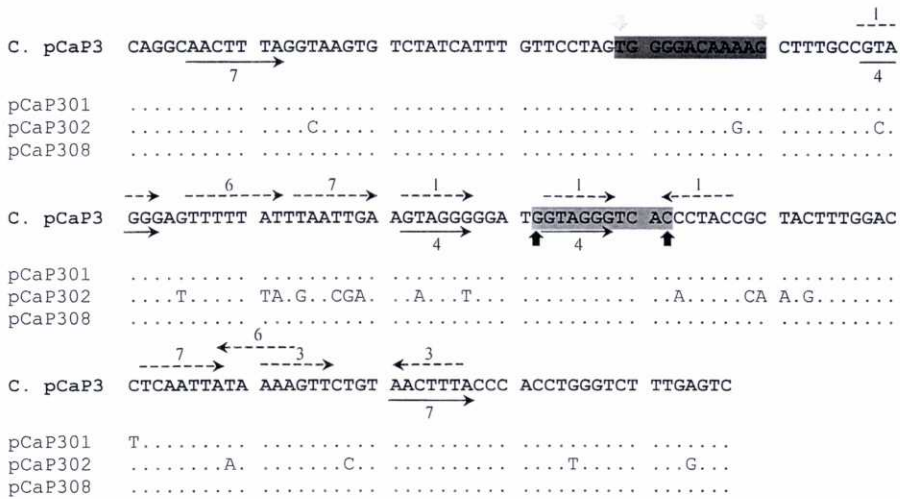


FIGURA 16 (continuación)

(B) Unidades monoméricas del satélite tipo II



(C) Unidades monoméricas del satélite tipo III



Se han señalado las distintas repeticiones directas e inversas con flechas continuas y flechas discontinuas, respectivamente. Los asteriscos (*) representan deleciones. Las secuencias homólogas a las secuencias consenso de las cajas A (5'-TGGCANNAGT-GG) y B (5'-GGTTCGANNCC) de los promotores internos de los genes ARNt se han sombreado en gris oscuro y gris claro, respectivamente.

Al amplificar ADN genómico de *P. canaliculus* con los *primers* diseñados para amplificar los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I*, se obtuvieron fragmentos cuyo peso molecular era similar al obtenido en las especies del género *Mytilus*. Por ello se clonaron y secuenciaron, obteniéndose las secuencias que se muestran en la FIGURA 17. Los clones secuenciados presentan una elevada homología interna, siendo del 96% para las tipo I, del 98% para las tipo II y del 100% para las tipo III. Los sitios variables no aparecen agrupados en ninguna región específica y no se han observado inserciones y/o deleciones. Al igual que en casos anteriores, estos tres tipos de secuencias son ricas en AT (53.6% las tipo I, 65.6% las tipo II y 56.3% las tipo III) y presentan repeticiones directas perfectas y repeticiones inversas. En las secuencias tipo I, se observan cinco repeticiones directas perfectas de 6 y 7 nucleótidos, observadas en las especies del G. *Mytilus*, y tres repeticiones inversas de 5 y 6 nucleótidos, de las cuales la inversión 7 se encuentra tres veces en la consenso (FIGURA 17A). Las secuencias tipo II contienen cuatro repeticiones directas de entre 5 y 7 nucleótidos y tres invertidas de 6 nucleótidos. Dichas repeticiones están presentes en las especies del G. *Mytilus*, y la inversión 1 se encuentra tres veces en la consenso (FIGURA 17B). En las secuencias tipo III se observan dos repeticiones directas de 7 nucleótidos y cuatro repeticiones inversas de entre 6 y 7 nucleótidos, de las cuales la inversión 1 se encuentra tres veces en la consenso (FIGURA 17C). Por otro lado, hemos obtenido una secuencia de 220pb al secuenciar el producto de PCR resultante de la amplificación con los *primers* diseñados para las secuencias satélite tipo II de *Mytilus*. Las posiciones 1 a 130 corresponden a los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 32 a 161 de la unidad monomérica tipo II obtenida para esta especie. Dicha secuencia es rica en AT (65.8%) y contiene seis repeticiones directas perfectas de 6 nucleótidos, de las cuales la repetición 11 esta presente cuatro veces, y tres repeticiones inversas de 5-8 nucleótidos, de las cuales la inversión 2' se encuentra cuatro veces en la secuencia (FIGURA 17D).

FIGURA 17. Secuencias consenso y monoméricas de *Perna canaliculus*.

(A) Unidades monoméricas tipo I

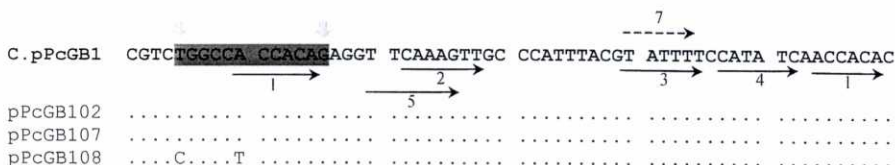


FIGURA 17 (continuación)

$\xrightarrow{8}$ $\xrightarrow{3}$ $\xleftarrow{3}$ $\xleftarrow{2}$
 C. pPcGB3 CTCAATTAAA AAAGTTCTGT AACTTTACCC ACCTGGGTCT TTGGGTC
 pPcGB305
 pPcGB316

(D) secuencia de 220pb

$\xrightarrow{2'}$ $\xrightarrow{2'}$
 ACCAAAATC CCAAATCAA TCCCAACCTT CCTTTTGTGG TCATAAACCT TGTGTCAAAA
 $\xrightarrow{9}$ $\xrightarrow{3'}$ $\xrightarrow{3'}$ $\xrightarrow{5}$ $\xrightarrow{5}$ $\xrightarrow{11}$
 $\xrightarrow{2}$ $\xrightarrow{2}$ $\xrightarrow{2'}$
 TTTCATTGAT TTCTATTCAC TTTTACCAAA GTTAGAGTGC GAAAACATAA AGTATTTCGGA
 $\xrightarrow{9}$ $\xrightarrow{10}$
 CGACGACAAC AACGACGCCA ACGTGATAGC AATATACGAC GAAAAATTAA AATTTTTCGA
 $\xrightarrow{8}$ $\xrightarrow{9}$ $\xleftarrow{9}$
 $\xrightarrow{10}$ $\xrightarrow{11}$
 $\xleftarrow{8}$ $\xleftarrow{2'}$
 GTCGTATAAA AATTTGGCCC CTAATTCCTA AACTGTTGGG
 $\xrightarrow{11}$

Se han señalado las distintas repeticiones directas e inversas con flechas continuas y flechas discontinuas, respectivamente. Las secuencias homólogas a las secuencias consenso de las cajas A (5'-TGGCNNAGT-GG) y B (5'-GGTTCGANNCC) de los promotores internos de los genes ARNt se han sombreado en gris oscuro y gris claro, respectivamente.

El análisis de estos tres tipos de secuencias repetitivas de *Mytilus* y *Perna* también reveló que contenían regiones de gran semejanza con las secuencias consenso de las cajas A (5'-TGGCNNAGT-GG) y B (5'-GGTTCGANNCC) del promotor interno de los genes ARNt y 5S (FIGURAS de la 12 a la 17). El grado de homología encontrado entre los tres tipos de secuencias y las cajas A y B es el siguiente: (1) para las secuencias consenso tipo I de todas las especies analizadas, la homología con la secuencia de la caja A es del 63.6%, excepto para *M. californianus* que es del 54.6% y con la secuencia de la caja B es del 63.6%, excepto para *M. californianus* que es del 81.8%; (2) para las secuencias consenso tipo II, la secuencia de la caja A en todas las especies analizadas presenta una homología del 45.5%, excepto *M. californianus* que es del 54.6%, y la homología con la secuencia de la caja B es del 81.8%, excepto *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* que es del 72.7% y *M. californianus* que es del 54.6%; y (3) para las secuencias consenso tipo III de *M. edulis*, *M. e. chilensis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* la homología con la secuencia de la caja A es del 63.6% y para *M. californianus* y *P.*

canaliculus es del 54.6% y la homología con la secuencia de la caja B es del 63.6% en todas las especies analizadas. La separación entre los tramos de secuencias homólogas a las cajas A y B es de 48 nucleótidos en las secuencias tipo I, de 46 nucleótidos en las tipo II, excepto en *M. galloprovincialis* y *M. californianus* que es de 45 y 49 nucleótidos respectivamente, y de 41 nucleótidos en las secuencias tipo III.

Por último, se realizó una búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos del GenBank y de la EMBL con el programa BLASTN 2.1.1 (Altschul *et al.*, 1997). Las secuencias consenso tipo I de las especies analizadas presentan una homología superior al 50% con la secuencia de ADN altamente repetitivo *Apa I* de *M. edulis* (X61120), las tipo II con la secuencia de ADN altamente repetitivo *Apa I* de *M. edulis* (X61119) y las tipo III con la secuencia de ADN repetitivo *Apa I* de *M. edulis* (AJ249690.1| MED249690). No se encontraron otras secuencias de ADN que superasen el 50% de homología con las secuencias consenso para los tres tipos de secuencias repetitivas.

4.2.2. Análisis de la variabilidad interespecífica entre clones de ADN satélite

Para comparar los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I* entre las cinco especies del *G. Mytilus* estudiadas, se realizó el alineamiento múltiple de todos los clones para cada tipo de secuencias ADN satélite. La divergencia interespecífica se ha calculado midiendo la variabilidad media por posición nucleotídica utilizando todas las comparaciones posibles entre los distintos clones de las especies que se comparan para cada tipo de secuencias ADN satélite. Por otro lado, se calcularon las distancias entre pares de clones mediante el método de Kimura dos parámetros y finalmente se realizaron los árboles de secuencias aplicando los métodos Neighbor-Joining y principio de máxima parsimonia.

En la FIGURA 18 se puede observar que las unidades monoméricas de las **satélite tipo I** de las cinco especies de *Mytilus* tienen una longitud de monómero de 173pb, excepto en el caso de los clones pChPA108, pChPA109 y pCaP105 que es de 174pb y los clones pCaP104 y pCaP106 que es de 170 y 175pb respectivamente. Así mismo, las secuencias de los clones pEYE101 y pTEL101 son iguales y el menor número de sitios polimórficos, a nivel interespecífico, lo muestran las secuencias de los clones pEYE112 y pTEL101 que únicamente varían en 3 nucleótidos. El análisis de estas secuencias, revela un elevado grado de homología interna,

alrededor del 95% entre todos los clones, excepto los pertenecientes a *M. californianus* los cuales presentan una homología promedio con el resto de los clones del 37%. La menor divergencia interespecifica (0.02) la presentan las secuencias de los clones de *M. edulis* y *M. trossulus* y la mayor divergencia (0.63) las secuencias de los clones de *M. californianus* con el resto de especies. Estas secuencias son ricas en AT, con un contenido medio del 52.60%. De las repeticiones directas perfectas e inversas descritas anteriormente, las directas 1 a 4 se encuentran en todas las especies, excepto en *M. californianus*; aunque, únicamente la “repetición 2” (CAAAGTT) está presente en todos los clones (FIGURA 18). La “inversión 1” se encuentra en todas las especies analizadas.

FIGURA 18. Alineamiento de las diferentes unidades monoméricas clonadas de las secuencias tipo I.

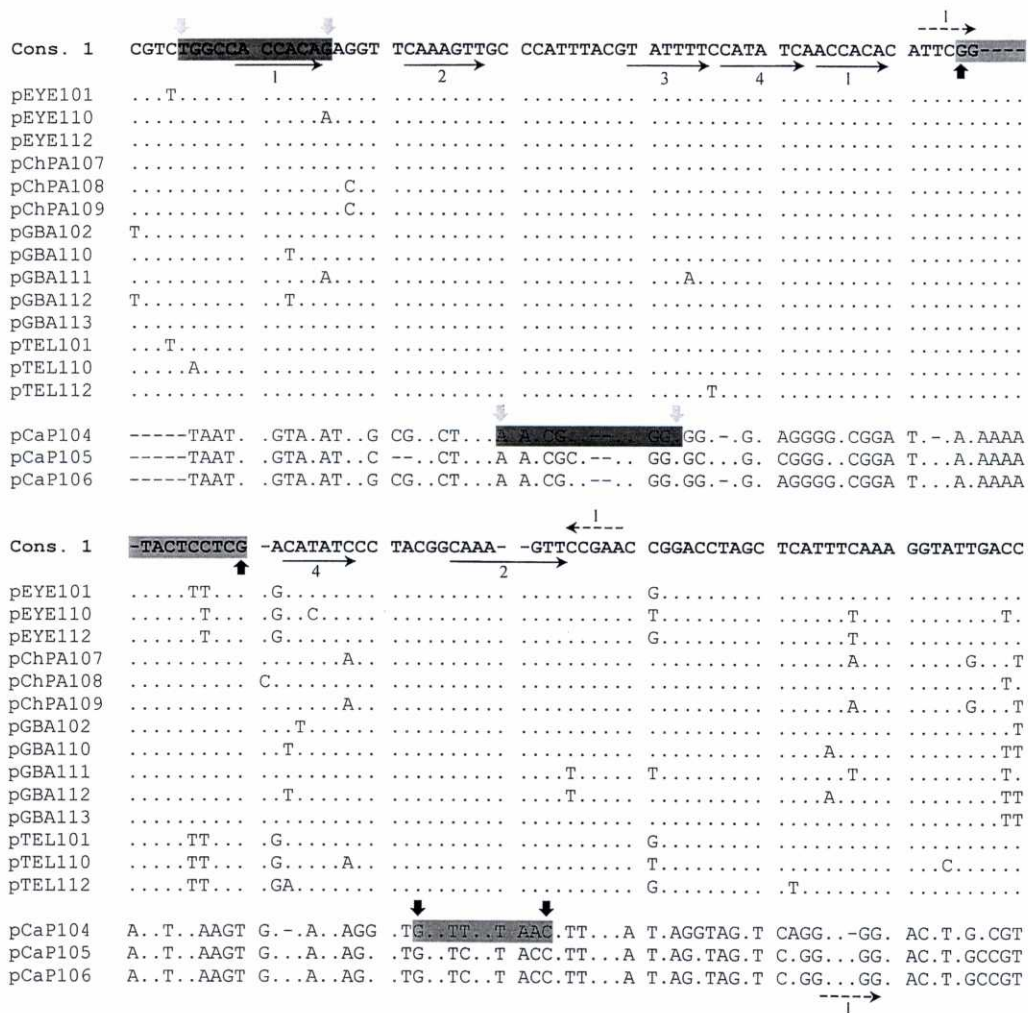


FIGURA 18 (continuación)

Cons. 1	CAAGCTATT-	CCCCACTTA-	--AAATATTT	TCTGGGATCC	GGGCC	
			↓ 3			
pEYE101	: 173
pEYE110	: 173
pEYE112	: 173
pChPA107	: 173
pChPA108G.....	TG.....G.....	: 174
pChPA109T..T	: 174
pGBA102T.....	: 173
pGBA110	TG.....	: 173
pGBA111T.....	: 173
pGBA112	TG.....	: 173
pGBA113	: 173
pTEL101	: 173
pTEL110	..G.....	: 173
pTEL112	: 173
pCaP104	AGG-A...GT	TGATGAG..A	.G...G.G.G	GT..AT..GG	AAA--	: 170
pCaP105	AGG.A...GT	.GATGAG..C	CG...G.G.G	GT..AT..GG	AAA--	: 174
pCaP106	AGG.A...GT	.GATGAG..C	CG...G.G.G	GT..AT..GG	AAA--	: 175
			← 1			

Los puntos (.) son sitios que no varían con respecto a la secuencia consenso estimada a partir de todos los clones, excepto los de *M. californianus*; mientras que las posiciones variables, tanto a nivel intra- como interespecífico se han indicado en la figura. Los guiones (-) representan *gaps*. Las repeticiones directas e inversas se han señalado con flechas continuas y flechas discontinuas, respectivamente. Las secuencias homólogas a las secuencias consenso de las cajas A (5'-TGGCNNAGT-GG) y B (5'-GGTTCGANNCC) de los promotores internos de los genes ARNt se han sombreado en gris oscuro y gris claro, respectivamente.

En la TABLA XII, se muestran los valores de la relación transiciones/transversiones (ns/nt) y el número de sitios polimórficos de los 17 clones de este tipo de secuencias satélite. Por otro lado, se puede observar que las diferencias entre todos los clones son relativamente homogéneas oscilando el número de sitios polimórficos generalmente entre 5 y 15, exceptuando los pertenecientes a *M. californianus* los cuales presentan la mayor divergencia siendo ésta de alrededor de 100 sitios variables con el resto de los clones. En cuanto a la relación ns/nt, en general se observan valores mayores que 1, excepto en el caso de *M. californianus* respecto al resto de clones, los cuales varían entre 0.80 y 0.92.

En la TABLA XIII se muestran las distancias de Kimura dos parámetros de las secuencias tipo I, observándose que las distancias entre los clones pertenecientes a una misma especie son generalmente menores que las observadas entre clones de distintas especies, siendo las secuencias más próximas las pertenecientes a las especies *M. edulis* y *M. trossulus* y las más alejadas las de *M. californianus* con respecto al resto de especies.

TABLA XII
 Valores de la relación transiciones/transversiones (ns/nt) y número de sitios polimórficos (P_i) de las secuencias monoméricas tipo I

P _i	ns/nt	pEYE101	pEYE110	pEYE112	pChPA107	pChPA108	pChPA109	pChPA110	pChPA111	pChPA112	pGBA113	pTEL101	pTEL110	pTEL112	pCaP104	pCaP105	pCaP106
-	6.00	∞	1.25	1.20	0.83	3.50	2.00	4.50	2.50	6.00	*	1.00	3.00	0.84	0.83	0.80	
3	-	3.00	2.33	1.75	1.40	10.00	3.00	5.00	3.67	∞	6.00	6.00	3.50	3.50	0.87	0.85	
7	4	-	0.75	1.00	0.50	3.00	1.75	3.00	2.25	5.00	∞	1.33	4.00	0.86	0.87	0.84	
9	10	7	-	0.43	0.00	0.50	0.50	1.50	0.83	0.33	1.25	2.33	1.20	0.92	0.90	0.87	
11	11	10	10	-	0.43	1.00	0.40	1.20	0.80	0.50	1.20	1.33	1.17	0.87	0.91	0.87	
11	12	9	2	10	-	0.33	0.38	1.00	0.63	0.20	0.83	1.40	0.86	0.87	0.85	0.82	
9	11	8	6	10	8	-	1.25	3.50	1.25	3.00	3.50	3.00	2.67	0.86	0.85	0.82	
12	12	11	9	7	11	9	-	2.00	∞	0.67	2.00	2.00	1.60	0.85	0.91	0.87	
11	6	8	10	11	12	9	12	-	2.00	6.00	4.50	3.33	3.33	0.89	0.90	0.87	
14	14	13	11	9	13	9	2	12	-	1.33	2.50	2.40	2.00	0.84	0.89	0.86	
7	7	6	4	6	6	4	5	7	7	-	6.00	4.00	3.50	0.89	0.89	0.85	
0	7	3	9	11	11	9	12	11	14	7	-	1.00	3.00	0.84	0.83	0.80	
6	9	7	10	14	10	12	15	13	17	10	6	-	1.00	0.89	0.88	0.85	
4	9	5	11	13	13	11	13	13	15	9	4	8	-	0.86	0.85	0.82	
101	101	102	100	103	101	102	102	100	101	102	101	102	98	102	-	0.30	0.33
97	98	99	97	105	98	98	101	97	100	98	97	94	100	13	-	0.25	
99	100	101	99	103	100	100	103	99	102	100	99	96	102	8	5	-	

* = indeterminación

TABLA XIII

Distancias de Kimura dos parámetros (Kimura, 1980) de las secuencias monoméricas tipo I

pEYE101	-	0.042	0.018	0.054	0.067	0.067	0.054	0.073	0.067	0.087	0.042	0	0.036	0.024	1.630	1.287	1.356	pCaP106
pEYE110	-	0.024	0.061	0.067	0.073	0.067	0.068	0.074	0.036	0.087	0.042	0.042	0.054	0.054	1.668	1.355	1.432	pCaP105
pEYE112	-	0.042	0.060	0.054	0.048	0.067	0.048	0.080	0.048	0.080	0.036	0.018	0.042	0.030	1.731	1.393	1.474	pCaP104
pChPA107	-	0.060	0.060	0.012	0.036	0.054	0.060	0.060	0.067	0.067	0.024	0.054	0.061	0.067	1.648	1.320	1.393	pTEL112
pChPA108	-	0.060	0.060	0.060	0.042	0.067	0.054	0.060	0.067	0.054	0.036	0.067	0.086	0.079	1.789	1.490	1.585	pTEL110
pChPA109	-	0.048	0.067	0.073	0.079	0.079	0.079	0.036	0.067	0.073	0.036	0.067	0.073	0.079	1.620	1.312	1.383	pTEL101
pGBA102	-	0.054	0.054	0.054	0.054	0.054	0.024	0.054	0.024	0.054	0.024	0.054	0.074	0.067	1.731	1.338	1.411	pGBA113
pGBA110	-	0.073	0.012	0.030	0.073	0.092	0.030	0.073	0.092	0.080	0.073	0.092	0.080	0.080	1.731	1.527	1.629	pGBA112
pGBA111	-	0.073	0.042	0.067	0.080	0.080	0.042	0.067	0.080	0.080	0.042	0.087	0.107	0.091	1.630	1.455	1.545	pGBA110
pGBA112	-	0.042	0.087	0.107	0.091	1.630	1.455	1.545	1.432	1.432	1.432	1.432	1.432	1.432	1.432	1.432	1.432	pGBA111
pGBA113	-	0.042	0.061	0.054	1.779	1.355	1.432	1.432	1.432	1.432	1.432	1.432	1.432	1.432	1.432	1.432	1.432	pGBA112
pTEL101	-	0.036	0.024	1.630	1.287	1.356	1.356	1.356	1.356	1.356	1.356	1.356	1.356	1.356	1.356	1.356	1.356	pTEL101
pTEL110	-	0.048	1.480	1.195	1.255	1.255	1.255	1.255	1.255	1.255	1.255	1.255	1.255	1.255	1.255	1.255	1.255	pTEL110
pTEL112	-	1.731	1.432	1.518	1.518	1.518	1.518	1.518	1.518	1.518	1.518	1.518	1.518	1.518	1.518	1.518	1.518	pTEL112
pCaP104	-	0.082	0.049	0.049	0.049	0.049	0.049	0.049	0.049	0.049	0.049	0.049	0.049	0.049	0.049	0.049	0.049	pCaP104
pCaP105	-	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	0.030	pCaP105
pCaP106	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	pCaP106

En la FIGURA 19 se muestra el árbol obtenido para las secuencias tipo I, tras aplicar el método Neighbor-Joining. En dicha figura, se observa un *cluster* que agrupa las tres secuencias monoméricas de *M. californianus* soportado por un valor de *bootstrap* muy elevado. En general, las secuencias monoméricas de una misma especie aparecen más íntimamente relacionadas entre ellas que con respecto a las demás especies, aunque éstas no se encuentran localizadas en un único *cluster*. Así mismo, se comprueba que existe una relación más directa entre los clones de *M. galloprovincialis* y los de *M. e. chilensis* por un lado y los de *M. edulis* y *M. trossulus* por otro. El árbol que resulta aplicando el método de máxima parsimonia (FIGURA 20) muestra una topología bastante similar al de Neighbor-Joining, localizándose los tres clones de *M. californianus* en un *cluster* soportado por valores de *bootstrap* muy elevado. En este caso, los clones de *M. e. chilensis* y *M. galloprovincialis* están en único *cluster*, aunque el valor de *bootstrap* es menor del 50%.

FIGURA 19. Árbol de secuencias monoméricas del ADN satélite tipo I, mediante el método Neighbor-Joining. Los valores de las proporciones de *bootstrap* mayores del 50% se han señalado sobre los nodos.

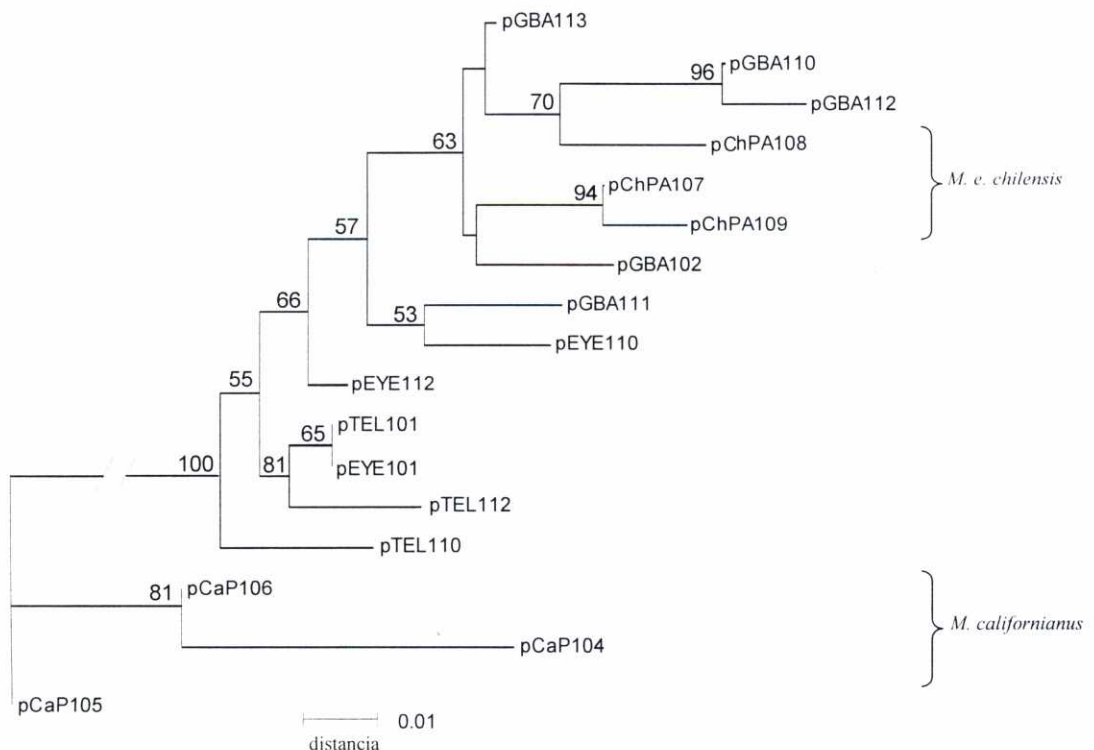
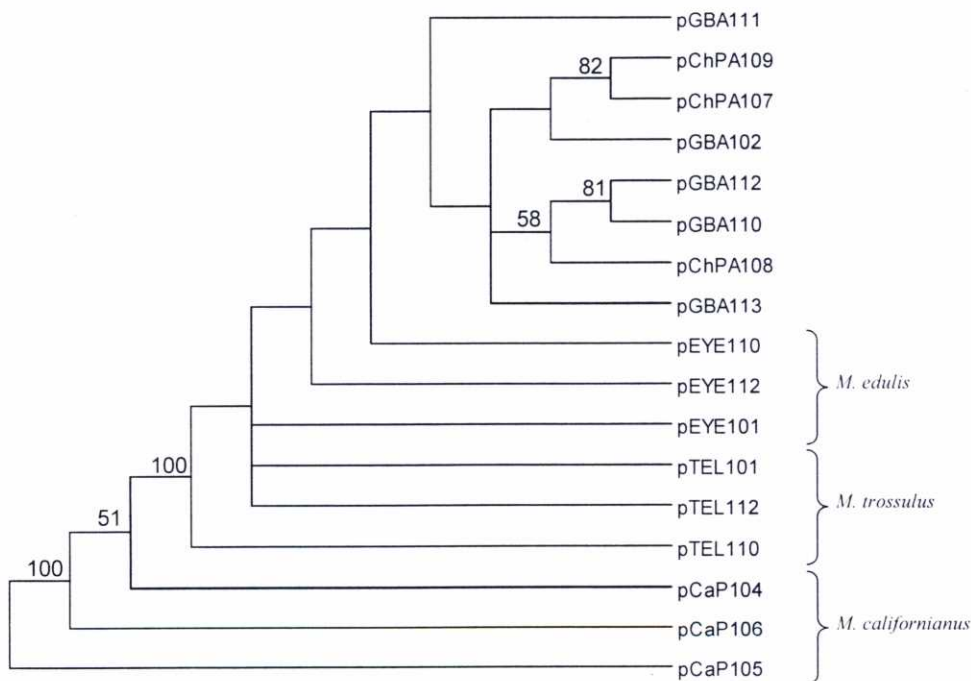


FIGURA 20. Árbol *bootstrap* consenso de máxima parsimonia según el método de ramificar y acotar (*branch and bound*) de las secuencias monoméricas del ADN satélite tipo I, con un Índice de Consistencia CI=0.872 y un Índice de Retención RI=0.921. Los valores de las proporciones de *bootstrap* mayores del 50% se han señalado sobre los nodos.



Los 13 clones secuenciados para el **satélite tipo II** (FIGURA 21) tienen una longitud de monómero de 161pb, excepto el clon pTEL209 que tiene 160pb. El análisis de estas secuencias revela una homología interna promedio de alrededor del 91% entre todos los clones y del 93%, excluyendo la secuencia de pCaP213, la cual presenta una homología promedio del 76% con el resto de los clones. La menor divergencia interespecífica (0.04) la presentan los clones de *M. edulis* y *M. trossulus* y la mayor divergencia la secuencia de *M. californianus* con el resto de especies, y en particular con los clones de *M. e. chilensis* y *M. galloprovincialis* (0.16). Todas estas secuencias son ricas en AT (65.22%) y de las repeticiones directas perfectas e inversas descritas anteriormente la directa 1 y la inversión 1 están presentes en todas las especies analizadas, aunque ninguna de ellas se encuentra en todos los clones.

En la TABLA XIV, se muestran los valores de la relación transiciones/transversiones (ns/nt) y el número de sitios polimórficos de los 13 clones de las secuencias satélite tipo II. A nivel interespecífico, las que presentan menor número de sitios polimórficos son las de los clones pEYE208 y pChPA216 y, al igual que en las secuencias tipo I, el mayor número de sitios variables lo presenta la secuencia de *M. californianus* (pCaP213) respecto al resto y, en particular, con el clon pGBA202. Por otro lado, las secuencias tipo II de *M. galloprovincialis* presentan un mayor número de sitios polimórficos con respecto al resto de los clones, a diferencia de lo observado en las tipo I. La relación entre el número de transiciones y transversiones (ns/nt) es, en general, menor que en el caso del satélite anterior, siendo de aproximadamente 1 entre todos los clones, exceptuando de nuevo el clon de *M. californianus* cuya relación varía entre 0.64 y 0.86.

TABLA XIV

Valores de la relación transiciones/transversiones (ns/nt) y número de sitios polimórficos de las secuencias monoméricas tipo II

P _i \ ns/nt	pEYE206	pEYE207	pEYE208	pChPA214	pChPA215	pChPA216	pGBA201	pGBA202	pGBA203	pTEL207	pTEL208	pTEL209	pCaP213
pEYE206	-	1.00	3.00	1.17	0.25	2.00	1.00	0.60	0.90	0.80	1.50	1.25	0.86
pEYE207	9	-	0.50	0.57	1.33	1.00	0.80	1.14	0.89	0.50	1.00	0.20	0.68
pEYE208	4	6	-	0.80	0.67	3.00	1.00	0.56	0.89	0.75	1.00	0.67	0.80
pChPA214	13	10	9	-	1.00	0.75	0.73	0.58	0.67	0.71	0.83	0.67	0.65
pChPA215	5	7	5	12	-	1.50	1.11	0.88	1.25	1.00	1.25	1.00	0.76
pChPA216	6	6	4	7	5	-	1.00	0.75	0.88	1.33	2.00	1.50	0.74
pGBA201	18	17	16	19	19	14	-	0.78	0.00	1.13	1.29	1.14	0.67
pGBA202	16	16	14	19	15	14	16	-	1.75	1.14	1.00	0.88	0.67
pGBA203	19	17	17	20	18	15	5	11	-	1.29	1.13	1.00	0.64
pTEL207	9	6	7	12	6	7	17	15	16	-	1.33	1.00	0.81
pTEL208	10	6	6	11	9	6	16	16	17	7	-	1.50	0.81
pTEL209	9	6	5	10	8	5	15	15	16	2	5	-	0.80
pCaP213	39	37	36	38	37	33	40	45	41	38	38	36	-

En la TABLA XV se muestran las distancias de Kimura dos parámetros de las secuencias tipo II, observándose que generalmente los clones pertenecientes a cada una de las especies están bastante próximos entre sí. A nivel interespecífico, las distancias más pequeñas se observan entre los clones de *M. edulis* y *M. trossulus* y las distancias más grandes entre los clones de *M. californianus* y los de *M. galloprovincialis*. Sin embargo, se puede observar que las distancias entre el clon de *M. californianus* con el resto de clones son menores que las obtenidas previamente para las secuencias tipo I.

TABLA XV

Distancias de Kimura dos parámetros (Kimura, 1980) de las secuencias monoméricas tipo II

	pEYE206	pEYE207	pEYE208	pChPA214	pChPA215	pChPA216	pGBA201	pGBA202	pGBA203	pTEL207	pTEL208	pTEL209	pCaP213
pEYE206	-	0.065	0.025	0.086	0.032	0.039	0.122	0.107	0.131	0.059	0.066	0.059	0.301
pEYE207		-	0.038	0.072	0.045	0.039	0.122	0.107	0.116	0.039	0.039	0.039	0.281
pEYE208			-	0.059	0.032	0.026	0.108	0.093	0.116	0.045	0.039	0.032	0.273
pChPA214				-	0.079	0.045	0.129	0.128	0.138	0.079	0.072	0.065	0.288
pChPA215					-	0.032	0.130	0.100	0.123	0.039	0.059	0.052	0.279
pChPA216						-	0.093	0.093	0.101	0.045	0.039	0.032	0.244
pGBA201							-	0.107	0.032	0.116	0.109	0.101	0.309
pGBA202								-	0.073	0.101	0.108	0.100	0.356
pGBA203									-	0.109	0.117	0.109	0.319
pTEL207										-	0.045	0.013	0.291
pTEL208											-	0.032	0.291
pTEL209												-	0.273
pCaP213													-

En la FIGURA 22 se muestra el árbol obtenido para las secuencias tipo II, aplicando el algoritmo Neighbor-Joining. De nuevo, se observa un *cluster* que agrupa todos los clones excepto el de *M. californianus* y las secuencias de una misma especie están más relacionadas que

en el caso de las secuencias tipo I. Así, los clones de *M. galloprovincialis* están agrupados en un *cluster* soportado por un valor de *bootstrap* muy elevado y los clones de *M. edulis* y *M. trossulus* en otro, si bien el valor de *bootstrap* para este es menor del 50%. El árbol de máxima parsimonia (FIGURA 23) muestra que los clones de *M. galloprovincialis* están agrupados en *cluster* soportado por un nivel de confianza elevado; sin embargo, los clones de *M. edulis*, *M. e chilensis* y *M. trossulus* no se agrupan en *clusters* perfectamente definidos.

FIGURA 22. Árbol de secuencias monoméricas del ADN satélite tipo II, mediante el método Neighbor-Joining. Los valores de las proporciones de *bootstrap* mayores del 50% se han señalado sobre los nodos.

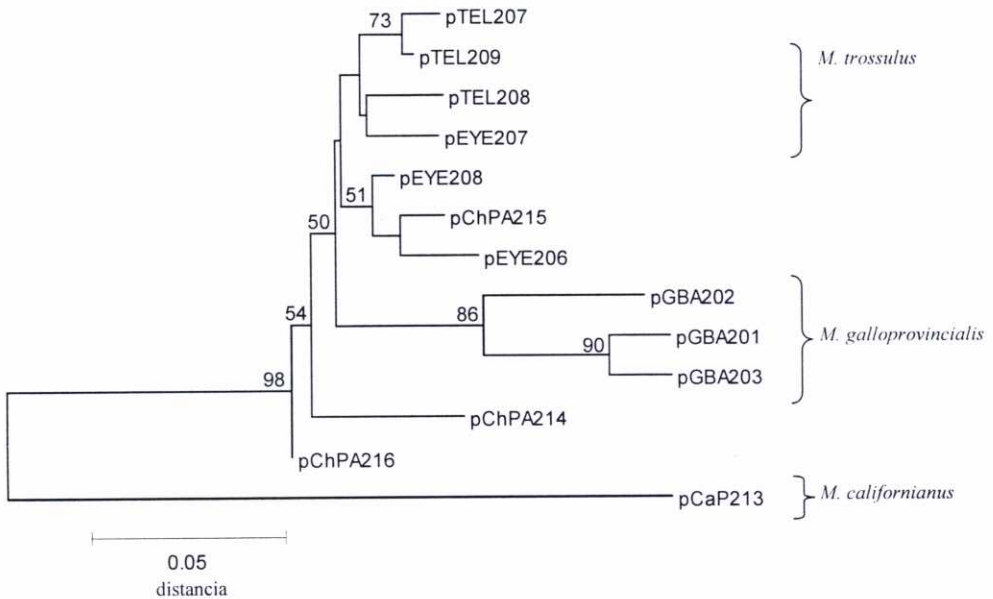
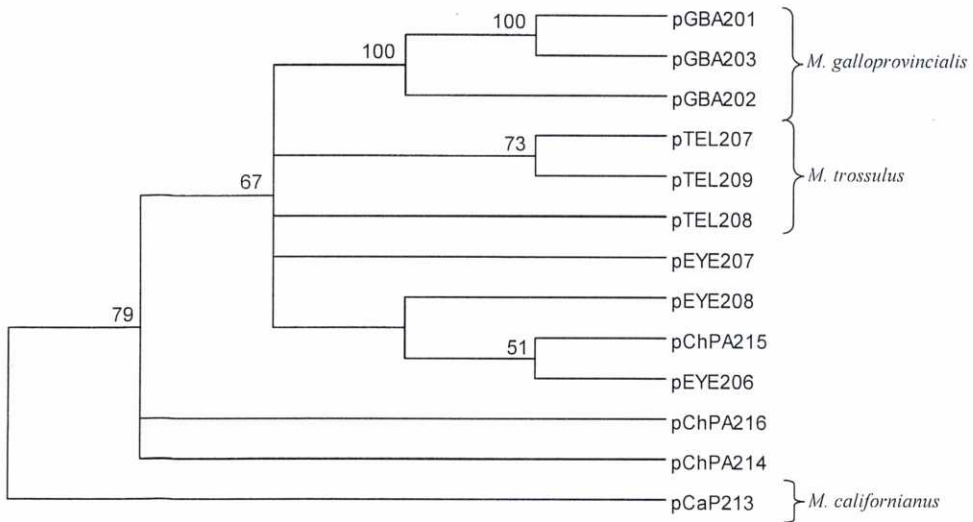
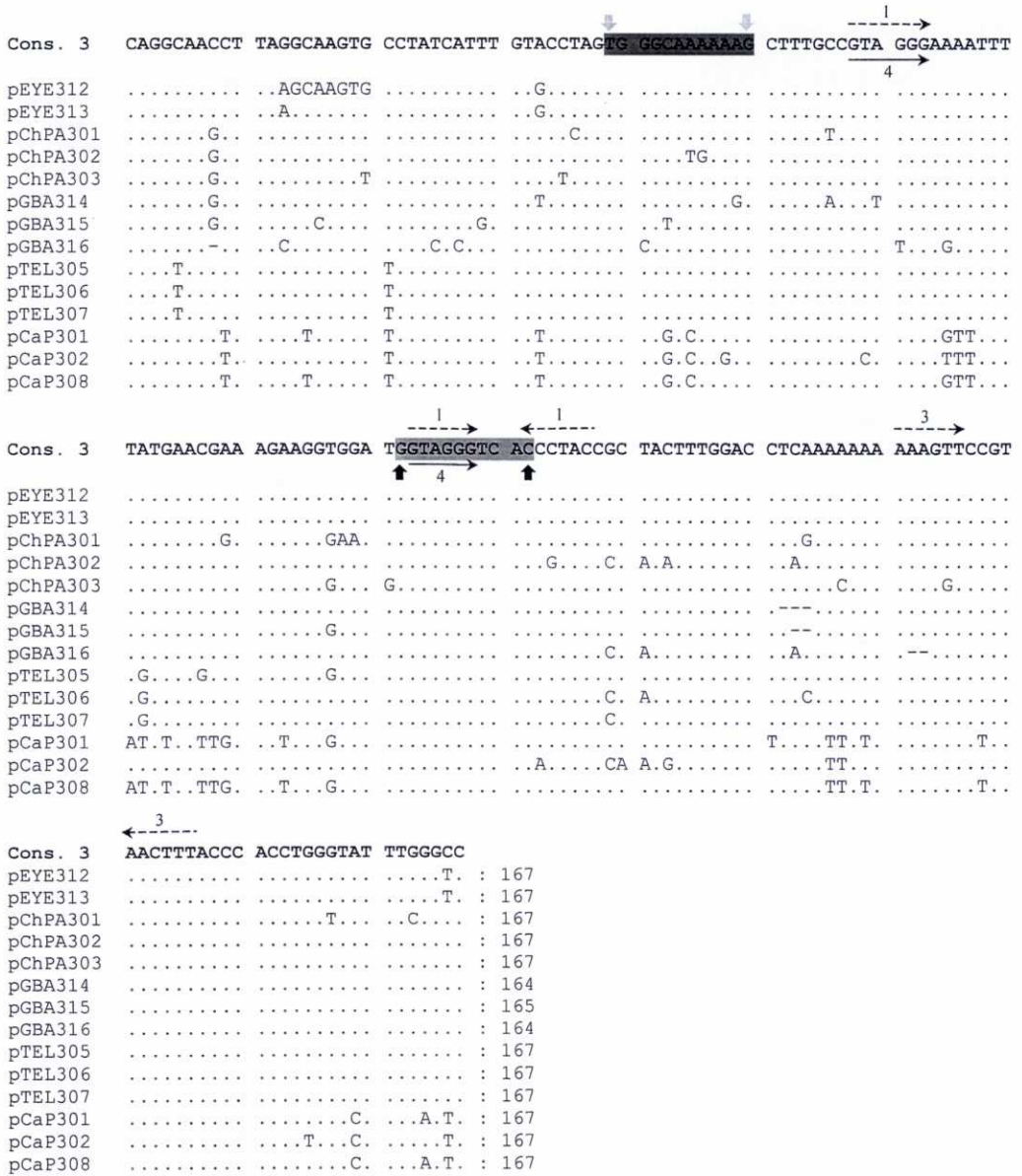


FIGURA 23. Árbol *bootstrap* consenso de máxima parsimonia según el método de ramificar y acotar (*branch and bound*) de las secuencias monoméricas del ADN satélite tipo II, con un Índice de Consistencia CI=0.826 y un Índice de Retención RI=0.659. Los valores de las proporciones de *bootstrap* mayores del 50% se han señalado sobre los nodos.



La FIGURA 24 muestra las unidades monoméricas del **satélite tipo III** de las cinco especies de *Mytilus* analizadas, cuya longitud de monómero es de 167pb, excepto en el caso de los clones pGBA314 y pGBA315 que es de 164 y 165pb, respectivamente. El análisis de estas secuencias, revela una homología interna de alrededor del 91% entre todos los clones. En este caso, los valores de divergencia interespecífica observados entre todos los clones son menores, siendo los clones pertenecientes a *M. edulis* los menos divergentes y, como en los casos anteriores, los clones de *M. californianus* los más divergentes con respecto al resto de especies. La menor divergencia interespecífica (0.05) la presentan las secuencias de *M. edulis* y *M. trossulus* y la mayor divergencia (0.16) las secuencias de *M. e. chilensis* y *M. galloprovincialis* con *M. californianus*. Estas secuencias son ricas en AT (54.49%) y de las repeticiones directas perfectas e inversas observadas anteriormente en este tipo de secuencias, la directa 4 y las inversiones 1 y 3 están presentes en todas las especies analizadas, aunque no en todos los clones.

FIGURA 24. Alineamiento de las diferentes unidades monoméricas clonadas de las secuencias tipo III.



Los puntos (.) son sitios que no varían con respecto a la secuencia consenso estimada a partir de todos los clones, mientras que las posiciones variables, tanto a nivel intra- como interespecifico se han indicado en la figura. Los guiones (-) representan *gaps*. Las repeticiones directas e inversas se han señalado con flechas continuas y flechas discontinuas, respectivamente. Las secuencias homólogas a las secuencias consenso de las cajas A (5'-TGGCANNAGT-GG) y B (5'-GGTTCCANNCC) de los promotores internos de los genes ARNt se han sombreado en gris oscuro y gris claro, respectivamente.

En la TABLA XVI, se muestran los valores de la relación transiciones/transversiones (ns/nt) y el número de sitios polimórficos de los 14 clones de este tipo de secuencias ADN satélite. A nivel interespecífico, las secuencias que presentan menor número de sitios polimórficos son las de los clones de *M. edulis* y el clon pTEL307 y el mayor número de sitios variables se observa entre pCaP301 y los clones pChPA302 y pGBA316. La relación ns/nt es en general menor que 1 entre todos los clones y, a diferencia de los análisis anteriores, no existen diferencias entre los coeficientes de los clones de *M. californianus* con respecto al resto de clones.

TABLA XVI

Valores de la relación transiciones/transversiones (ns/nt) y número de sitios polimórficos de las secuencias monoméricas tipo III

P _i	ns/nt													
	pEYE312	pEYE313	pChPA301	pChPA302	pChPA303	pGBA314	pGBA315	pGBA316	pTEL305	pTEL306	pTEL307	pCaP301	pCaP302	pCaP308
pEYE312	-	*	2.25	0.57	0.67	0.50	0.80	0.57	3.00	2.00	6.00	0.67	0.33	0.60
pEYE313	0	-	2.25	0.57	0.67	0.50	0.80	0.57	3.00	2.00	6.00	0.67	0.33	0.60
pChPA301	13	13	-	0.78	1.17	0.75	1.14	0.80	2.25	1.14	1.80	0.82	0.58	0.77
pChPA302	11	11	16	-	0.18	0.22	0.25	0.43	0.44	0.67	0.67	0.60	0.57	0.55
pChPA303	10	10	13	13	-	0.22	0.33	0.25	0.67	0.44	0.57	0.71	0.37	0.65
pGBA314	9	9	14	11	11	-	0.29	0.30	0.50	0.44	0.57	0.65	0.33	0.59
pGBA315	9	9	12	10	8	9	-	0.33	0.80	0.50	0.67	0.59	0.26	0.53
pGBA316	11	11	18	10	15	13	12	-	0.56	0.83	0.83	0.46	0.33	0.41
pTEL305	8	8	13	13	10	12	9	14	-	0.00	0.00	0.60	0.35	0.53
pTEL306	9	9	15	10	13	13	12	11	5	-	0.00	0.56	0.43	0.50
pTEL307	7	7	14	10	11	11	10	11	3	2	-	0.63	0.43	0.56
pCaP301	25	23	31	32	29	28	27	32	24	28	26	-	0.57	∞
pCaP302	20	20	30	22	26	24	24	24	23	20	20	22	-	0.50
pCaP308	24	24	30	31	28	27	26	31	23	27	25	1	21	-

* = indeterminación

En la TABLA XVII se muestran las distancias de Kimura dos parámetros de las secuencias tipo III. En este caso, las distancias entre clones de una misma especie, en general, no son inferiores a las observadas a nivel interespecífico. Así, las distancias más pequeñas se observan entre los clones de *M. edulis* y *M. trossulus* y las distancias más grandes entre los clones de *M. californianus* y el resto de especies, si bien estas distancias son menores que las observadas previamente tanto para las secuencias tipo I como para las secuencias tipo II.

TABLA XVII

Distancias de Kimura dos parámetros (Kimura, 1980) de las secuencias monoméricas tipo III

	pEYE312	pEYE313	pChPA301	pChPA302	pChPA303	pGBA314	pGBA315	pGBA316	pTEL305	pTEL306	pTEL307	pCaP301	pCaP302	pCaP308
pEYE312	-	0	0.083	0.069	0.062	0.057	0.057	0.070	0.050	0.056	0.044	0.167	0.131	0.160
pEYE313		-	0.083	0.069	0.062	0.057	0.057	0.070	0.050	0.056	0.044	0.167	0.131	0.160
pChPA301			-	0.103	0.082	0.091	0.077	0.119	0.083	0.096	0.090	0.214	0.205	0.206
pChPA302				-	0.082	0.070	0.063	0.064	0.082	0.062	0.062	0.221	0.145	0.213
pChPA303					-	0.070	0.050	0.098	0.062	0.082	0.069	0.198	0.175	0.190
pGBA314						-	0.057	0.086	0.077	0.084	0.070	0.194	0.163	0.186
pGBA315							-	0.078	0.057	0.077	0.063	0.185	0.162	0.177
pGBA316								-	0.091	0.070	0.070	0.226	0.163	0.218
pTEL305									-	0.031	0.018	0.160	0.152	0.152
pTEL306										-	0.012	0.190	0.131	0.182
pTEL307											-	0.175	0.131	0.167
pCaP301												-	0.145	0.006
pCaP302													-	0.138
pCaP308														-

En la FIGURA 25 se muestra el árbol obtenido para las secuencias tipo III, que resulta aplicando el método Neighbor-Joining. Como en los casos anteriores, se observa un *cluster* que define perfectamente a los clones de *M. californianus*. Para este tipo de secuencias, los clones de

M. trossulus están agrupados en un *cluster* soportado por un valor de *bootstrap* menor que en el caso anterior. El resto de clones pertenecientes a *M. edulis*, *M. e. chilensis* y *M. galloprovincialis* están agrupados en un *clusters* cuyos niveles de confianza, aunque elevados, son menores que en los casos anteriores. La FIGURA 26 muestra el árbol generado por el principio de máxima parsimonia, en la que se puede observar unos coeficientes de confianza elevados en los nodos que soportan los *clusters* de los clones de *M. californianus*, *M. edulis* y *M. trossulus*.

FIGURA 25. Árbol de secuencias monoméricas del ADN satélite tipo III, mediante el método Neighbor-Joining. Los valores de las proporciones de *bootstrap* mayores del 50% se han señalado sobre los nodos.

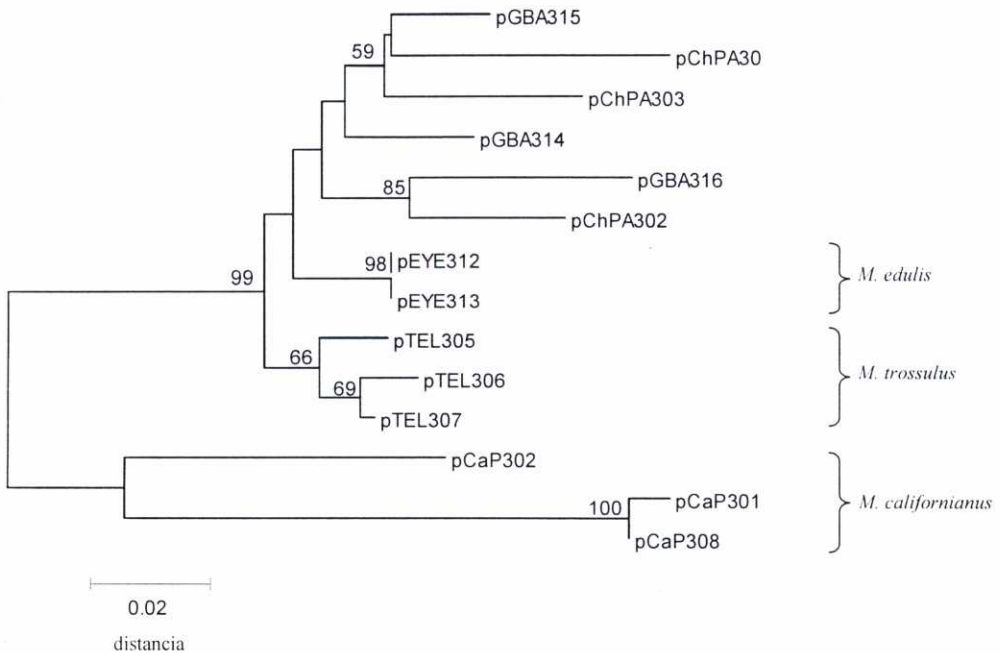
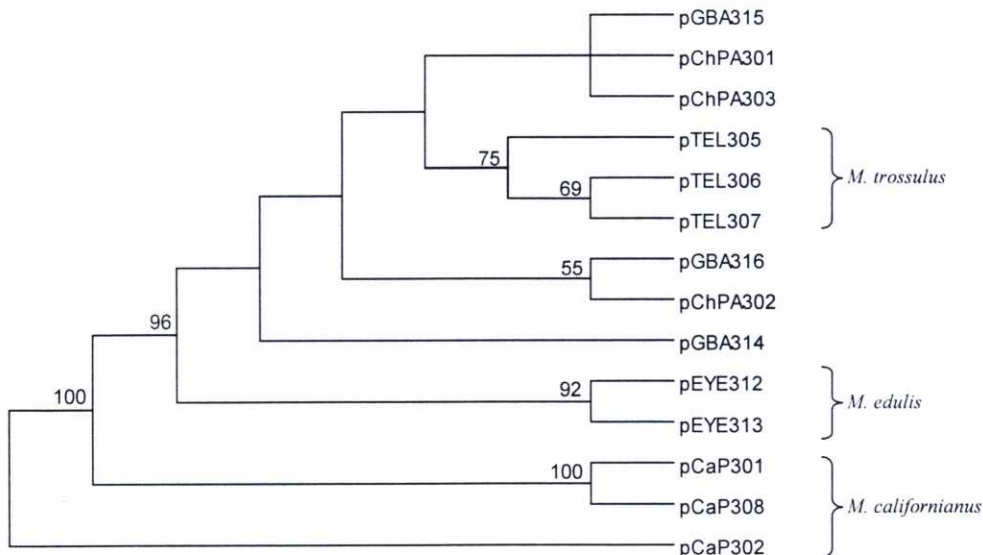


FIGURA 26. Árbol *bootstrap* consenso de máxima parsimonia según el método de ramificar y acotar (*branch and bound*) de las secuencias monoméricas del ADN satélite tipo I, con un Índice de Consistencia CI=0.873 y un Índice de Retención RI=0.846. Los valores de las proporciones de *bootstrap* mayores del 50% se han señalado sobre los nodos.



4.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS CONSENSO DEL ADN SATÉLITE *Apa I*

Se estudiaron las relaciones de parentesco entre las secuencias consenso obtenidas para las cinco especies de *Mytilus* y las obtenidas para *P. canaliculus*; incluyéndose, en este análisis las secuencias consenso ADN satélite *Apa I* de *M. edulis* descritas por Ruíz-Lara *et al.* (1992) y Ruíz-Lara (1993), denominadas como “*M. edulis**”. Al igual que en los análisis anteriores, la fuente de datos de la que se parte en todos los métodos empleados fue el alineamiento múltiple de las secuencias consenso realizado mediante el CLUSTAL X. Posteriormente, se calculó la matriz de distancias según el método de Kimura dos parámetros y se analizaron las relaciones filogenéticas mediante los métodos de Neighbor-Joining y principio de máxima parsimonia.

En la FIGURA 27 se muestra el alineamiento de las siete secuencias consenso para el satélite tipo I, observándose que la secuencia de *M. californianus* presenta una divergencia

resto de secuencias debido a la presencia de alrededor de 100 sitios variables. La variación entre las restantes secuencias consenso se localiza principalmente entre las posiciones nucleotídicas 75 a 87 y entre las posiciones 126 a 139.

FIGURA 27. Alineamiento múltiple de las secuencias consenso tipo I

<i>M. edulis</i> *	CGTCTGGCCA	CCACAGAGGT	TCAAAGTTGC	CCATTACGT	ATTTCCATA	TCAACCACAC
<i>M. edulis</i>
<i>M. e. chilensis</i>C..
<i>M. galloprovincialis</i>
<i>M. trossulus</i>
<i>M. californianus</i>	-----TAAT.	.GTA.AT..G	CG..CT...A	A.CG..GT.-	G.GGC-AGA.	GGGG..GG.T
<i>P. canaliculus</i>
<i>M. edulis</i> *	ATTCGG----	TACTCTTCG-	GCATATCCCT	ACGGCAAAG-	-TTCCGAACC	GGACCTAGCT
<i>M. edulis</i>G
<i>M. e. chilensis</i>C....	A.....A...
<i>M. galloprovincialis</i>C....	A.....
<i>M. trossulus</i>T....G
<i>M. californianus</i>	T.CA.AAAAA	..T.TAAGTG	..A..AG..	TG..TC..TA	CC.TT...AT	.AG.TAG.TC
<i>P. canaliculus</i>C....	A.....
<i>M. edulis</i> *	CATTTTAAAG	GTATTGACCC	AAGCTATT-C	CCCACTTA--	-AATATTTTT	CTGGGATCCG
<i>M. edulis</i>
<i>M. e. chilensis</i>A....G...T.
<i>M. galloprovincialis</i>C....TT.
<i>M. trossulus</i>C....
<i>M. californianus</i>	.GG..CGG.A	C.T.GCCGTA	GG.A...GT.	GATGAG..CC	G...G.G.GG	T..AT..GGA
<i>P. canaliculus</i>C....T..T	G.....
<i>M. edulis</i> *	GGCC					
<i>M. edulis</i>					
<i>M. e. chilensis</i>					
<i>M. galloprovincialis</i>					
<i>M. trossulus</i>					
<i>M. californianus</i>	AA--					
<i>P. canaliculus</i>					

Los puntos (.) son sitios que no varían con respecto a la secuencia de *M. edulis**, mientras que las posiciones variables se han indicado en la figura. Los guiones (-) representan *gaps*.

En la TABLA XVIII se observa que la menor distancia se produce entre las dos secuencias consenso de *M. edulis*. A nivel interespecífico, las distancias menores son entre las secuencias

consenso de *M. edulis* y *M. trossulus* y entre *M. galloprovincialis* y *P. canaliculus* y la mayor distancia se observa entre *M. californianus* y el resto de especies. Por otro lado, la secuencia consenso de *M. e. chilensis* se encuentra a una menor distancia de *M. galloprovincialis*.

TABLA XVIII

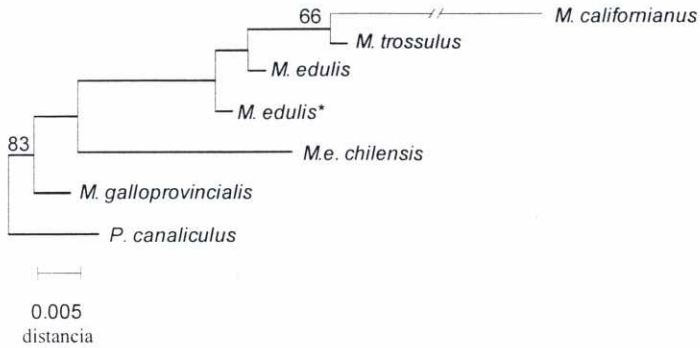
Distancias de Kimura dos parámetros (Kimura, 1980) de las secuencias consenso tipo I

	<i>M. edulis</i> *	<i>M. edulis</i>	<i>M. e. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. trossulus</i>	<i>M. californianus</i>	<i>P. canaliculus</i>
<i>M. edulis</i> *	-	0.006	0.050	0.031	0.018	1.315	0.038
<i>M. edulis</i>		-	0.057	0.038	0.012	1.301	0.044
<i>M. e. chilensis</i>			-	0.037	0.063	1.227	0.044
<i>M. galloprovincialis</i>				-	0.038	1.269	0.018
<i>M. trossulus</i>					-	1.217	0.044
<i>M. californianus</i>						-	1.301
<i>P. canaliculus</i>							-

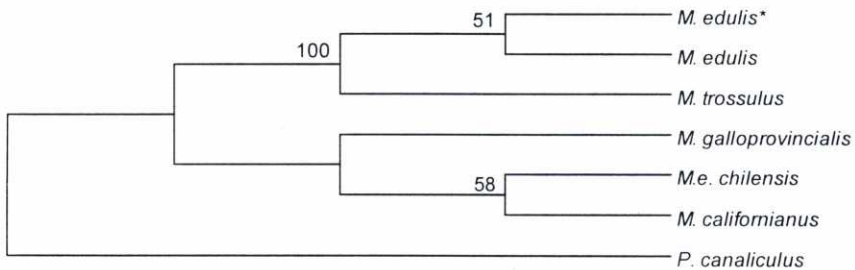
En la FIGURA 28 se observan los árboles generados por los métodos del vecino más próximo y el principio de máxima parsimonia para las secuencias consenso tipo I. Como se puede observar, de los dos árboles el generado por el método de máxima parsimonia es el que presenta mayores valores de *bootstrap*. En el árbol Neighbor-Joining se observa una mayor relación entre las secuencias de *M. californianus* y *M. trossulus* y entre las de *P. canaliculus* y *M. galloprovincialis* (FIGURA 28A). Sin embargo, el árbol generado por máxima parsimonia agrupa a *M. trossulus* con las dos especies de *M. edulis* y *M. e. chilensis* con *M. californianus* (FIGURA 28B).

FIGURA 28. Árboles filogenéticos de las secuencias consenso del satélite tipo I. **(A)** Árbol mediante el método Neighbor-Joining. **(B)** Árbol *bootstrap* consenso de máxima parsimonia según el método de ramificar y acotar (*branch and bound*) con un Índice de Consistencia CI=0.955 y un Índice de retención RI=0.615. Los valores de las proporciones de *bootstrap* mayores del 50% se han señalado sobre los nodos.

(A)



(B)



En el caso de las **secuencias consenso tipo II** (FIGURA 29), la divergencia de *M. californianus* con respecto al resto de especies también es elevada, aunque el número de sitios variables es menor que en el caso anterior (alrededor de 35). Por el contrario, el número de sitios variables entre las secuencias del resto de especies, es mayor que la observada para las secuencias tipo I y se localizan de forma aleatoria a lo largo de toda la secuencia. Así, en la TABLA XIX, se observa que las mayores distancias son entre *M. californianus* y las demás especies y que las distancias entre las especies restantes entre sí son generalmente mayores que las observadas para las secuencias tipo I.

FIGURA 29. Alineamiento múltiple de las secuencias consenso tipo II

<i>M. edulis*</i>	CTTTTTGGC	CCCTAATTC	TAACTGTTG	GGACCAAAAC	TCCCAAATC	AATCCCAACC
<i>M. edulis</i>	.C.....A.....A.
<i>M. e. chilensis</i>	.C.....
<i>M. galloprovincialis</i>A..C	A.....C..A.....
<i>M. trossulus</i>	-C.....
<i>M. californianus</i>	.C.....G.A
<i>P. canaliculus</i>	.C.....A.....

<i>M. edulis*</i>	TTCCTTTGT	GGTCATAAC	CTTGTGTTA	AATTCATAG	A-TTTCIATT	TACTTAT-AC
<i>M. edulis</i>A.
<i>M. e. chilensis</i>A.
<i>M. galloprovincialis</i>-CA.C.....A.....
<i>M. trossulus</i>A.C.....
<i>M. californianus</i>C.....	AA.ATGG...G.AC	..G..G..	..GA..C..A	C...A.C...
<i>P. canaliculus</i>A.

<i>M. edulis*</i>	TAAAGTTATG	GTGCG-AAAA	CCAAGAATAA	TGCTTATTTG	--GGCC-
<i>M. edulis</i>T..
<i>M. e. chilensis</i>A..A..
<i>M. galloprovincialis</i>TC...C
<i>M. trossulus</i>G.....T..
<i>M. californianus</i>	AC.....-	..CT..-G..	GTT.C..A..T	TC.....
<i>P. canaliculus</i>	...C.....A..T..

Los puntos (.) son sitios que no varían con respecto a la secuencia de *M. edulis**, mientras que las posiciones variables se han indicado en la figura. Los guiones (-) representan *gaps*.

TABLA XIX

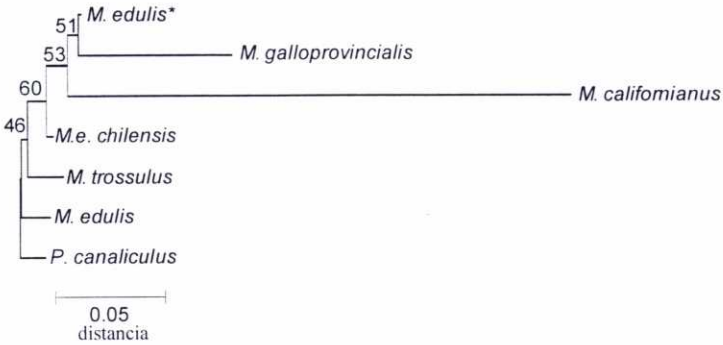
Distancias de Kimura dos parámetros (Kimura, 1980) de las secuencias consenso tipo II

	<i>M. edulis*</i>	<i>M. edulis</i>	<i>M. e. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. trossulus</i>	<i>M. californianus</i>	<i>P. canaliculus</i>
<i>M. edulis*</i>	-	0.033	0.019	0.067	0.033	0.248	0.033
<i>M. edulis</i>		-	0.026	0.103	0.026	0.275	0.026
<i>M. e. chilensis</i>			-	0.088	0.026	0.238	0.026
<i>M. galloprovincialis</i>				-	0.103	0.303	0.088
<i>M. trossulus</i>					-	0.266	0.026
<i>M. californianus</i>						-	0.275
<i>P. canaliculus</i>							-

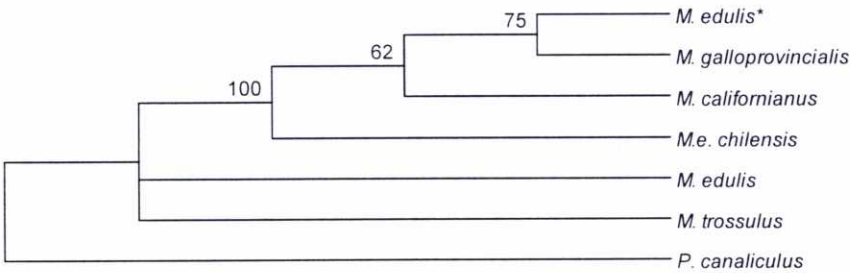
Los árboles Neighbor-Joining y máxima parsimonia obtenidos para las secuencias consenso tipo II se observan en la FIGURA 30. Ambos árboles presentan topologías bastante similares, si bien el generado por máxima parsimonia es más significativo (FIGURA 30B). En dicho árbol, se observa que *M. edulis** se localiza con *M. galloprovincialis* en un *cluster* que se unirá a *M. californianus* y, posteriormente, se agrupan en un *cluster* con *M. e. chilensis*.

FIGURA 30. Árboles filogenéticos de las secuencias consenso del satélite tipo II. **(A)** Árbol mediante el método Neighbor-Joining. **(B)** Árbol *bootstrap* consenso de máxima parsimonia según el método de ramificar y acotar (*branch and bound*) con un Índice de Consistencia CI=0.927 y un Índice de Retención RI=0.600. Los valores de las proporciones de *bootstrap* mayores del 50% se han señalado sobre los nodos.

(A)



(B)



La FIGURA 31 muestra el alineamiento de las siete secuencias consenso para el **satélite tipo III**, en la que se observa que la secuencia de *M. californianus* es la que presenta mayor divergencia, si bien en este caso el número de sitios variables con respecto al resto de especies es menor que en los dos casos anteriores, siendo de alrededor de 26. Sin embargo, el número de sitios variables entre las secuencias del resto de especies es menor y se localizan principalmente en los primeros 90 nucleótidos. En este caso, la secuencia de *M. edulis*, obtenida en este trabajo, y la secuencia de *M. edulis**, obtenida por Ruíz-Lara (1993), presentan una divergencia bastante alta, debido a la presencia de 10 sitios polimórficos entre ambas. En la TABLA XX se observa que las distancias de *M. californianus* con respecto al resto de especies son las menores de los tres tipos de secuencias analizadas y, por el contrario, las distancias entre el resto de especies son en general las mayores de estos tres tipos de secuencias.

FIGURA 31. Alineamiento múltiple de las secuencias consenso tipo III

<i>M. edulis*</i>	CAGGCAAGCT	TAGGCAACTG	CCTTTCATTT	GTACCTAGTG	AGCAAAACAG	CTTTGCCGTA
<i>M. edulis</i>C..	..A....G..	...A.....	..G.....	G.....A..
<i>M. e. chilensis</i>G..	...A.....	G.....A..
<i>M. galloprovincialis</i>G..	...A.....	G.....A..
<i>M. trossulus</i>	...T..C..G..	T..A.....	G.....A..
<i>M. californianus</i>CT.	...T..G..	T..A.....	..T.....	G.G.C..A..
<i>P. canaliculus</i>	T.....C..G..	T..A.....	G.G.C..A..AG...
<i>M. edulis*</i>	GGGTAAATTT	TATGAACGAA	AGAAGGTGGA	TGGTAGGGTC	ACCCTACCGC	TACTTTGGAC
<i>M. edulis</i>	..A.....
<i>M. e. chilensis</i>	..A.....G..
<i>M. galloprovincialis</i>	..A.....
<i>M. trossulus</i>	..A.....	..G.....C.
<i>M. californianus</i>	..AGTT...	AT..T..TTG.	..T...G..
<i>P. canaliculus</i>	..A..TT...
<i>M. edulis*</i>	CTCAAAAAA	AAAGTTCCAT	AACTTTACCC	ACCTGGG-AT	TTGGGCC	
<i>M. edulis</i>G.T.T.	
<i>M. e. chilensis</i>G.T.	
<i>M. galloprovincialis</i>	..--.....G.T.	
<i>M. trossulus</i>G.T.	
<i>M. californianus</i>TT.T.TG.TC.	...A.T.	
<i>P. canaliculus</i>TT...TG.TC.T.	

Los puntos (.) son sitios que no varían con respecto a la secuencia de *M. edulis**, mientras que las posiciones variables se han indicado en la figura. Los guiones (-) representan *gaps*.

TABLA XX

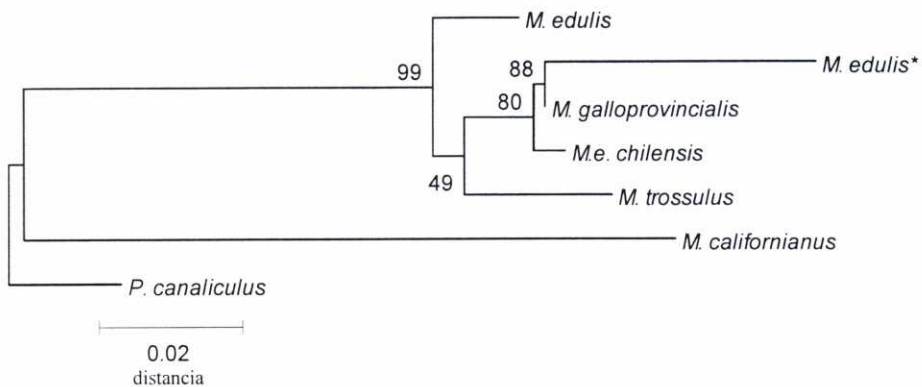
Distancias de Kimura dos parámetros (Kimura, 1980) de las secuencias consenso tipo III

	<i>M. edulis*</i>	<i>M. edulis</i>	<i>M. e. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. trossulus</i>	<i>M. californianus</i>	<i>P. canaliculus</i>
<i>M. edulis*</i>	-	0.064	0.044	0.038	0.070	0.218	0.133
<i>M. edulis</i>		-	0.031	0.025	0.044	0.163	0.091
<i>M. e. chilensis</i>			-	0.006	0.038	0.163	0.098
<i>M. galloprovincialis</i>				-	0.031	0.170	0.091
<i>M. trossulus</i>					-	0.170	0.098
<i>M. californianus</i>						-	0.112
<i>P. canaliculus</i>							-

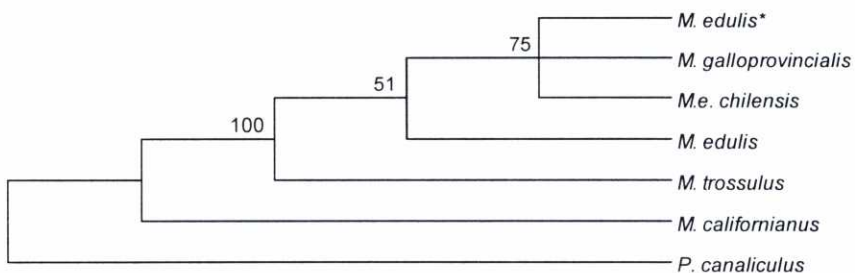
En la FIGURA 32 se observan los árboles generados por los métodos del vecino más próximo y el principio de máxima parsimonia para las secuencias consenso tipo III. Ambos métodos generan los árboles con mayores valores de confianza, observándose de nuevo una relación estrecha entre *M. edulis** y *M. galloprovincialis* y de estos con *M. e. chilensis* y, por otro lado, entre *M. californianus* y *P. canaliculus*.

FIGURA 32. Árboles filogenéticos de las secuencias consenso del satélite tipo III. **(A)** Árbol mediante el método Neighbor-Joining. **(B)** Árbol *bootstrap* consenso de máxima parsimonia según el método de ramificar y acotar (*branch and bound*) con un Índice de Consistencia CI=0.951 y un Índice de Retención RI=0.867. Los valores de las proporciones de *bootstrap* mayores del 50% se han señalado sobre los nodos.

(A)



(B)



4.4. AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS ADN SATÉLITE *Apa I*

Como ya se ha indicado en el apartado 3.11 de Material y Métodos, se diseñaron *primers* específicos para amplificar los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I* descritos en *M. edulis** (Ruíz-Lara, 1993). Las amplificaciones mediante PCR se realizaron en 16 individuos de nueve poblaciones diferentes, pertenecientes a cinco especies del G. *Mytilus*. Los productos de PCR de las secuencias tipo I fueron de ~173pb, los de las secuencias tipo II de ~161pb y los de las secuencias tipo III de ~166pb. Posteriormente, se digirieron 5µL de cada producto de PCR con cuatro endonucleasas de restricción (*Hae III*, *Msp I*, *Dra I* y *Taq I*) y se resolvieron en geles de agarosa al 2%. El cálculo aproximado de los pesos moleculares de los fragmentos resultantes se estimó mediante el programa GelWorks.

La **secuencia tipo I** de *M. edulis** presenta dianas de restricción para las cuatro endonucleasas utilizadas: (1) *Hae III*, dos dianas en las posiciones +127 y +136, por lo que la digestión total produce fragmentos de 128, 36 y 9pb; (2) *Msp I*, dos dianas en las posiciones +59 y +124, que dan lugar a fragmentos de 65, 59 y 49pb en la restricción total; (3) *Dra I*, una diana en la posición +74, cuya presencia en todas las unidades monoméricas da lugar a fragmentos de 97 y 76pb; y (4) *Taq I*, una diana en la posición +30, que genera fragmentos de 143 y 30pb.

La **secuencia tipo II** de *M. edulis** sólo presenta dianas para las endonucleasas *Hae III*, en las posiciones +126 y +137 que dan lugar a fragmentos de 127, 23 y 11pb en la restricción total, y *Dra I*, en la posición +55 cuya presencia en todas las unidades monoméricas produce fragmentos de 104 y 57pb.

La **secuencia tipo III** de *M. edulis** sólo presenta una diana para el enzima *Hae III*, en la posición +66, que produce fragmentos de 94 y 67pb en la digestión total.

Con el objetivo de diferenciar las poblaciones analizadas mediante los patrones de restricción, en base a la presencia/ausencia de estas dianas, se han clasificado en cinco tipos: (1) patrón A = digestión total o presencia de dianas en todos los monómeros; (2) patrón B = digestión parcial, siendo más frecuente la presencia de dianas que la ausencia de las mismas, dando lugar a una mayor intensidad de los fragmentos de restricción; (3) patrón C = digestión parcial con igual presencia/ausencia de dianas, lo cual da lugar a una intensidad igual de todos los fragmentos; (4) patrón D = digestión parcial, siendo más frecuente la ausencia de dianas que la presencia de las mismas, lo cual da lugar a una mayor intensidad del fragmento monomérico;

y (5) patrón E = ausencia de dianas en todos los monómeros. Los resultados obtenidos en las diferentes poblaciones se muestran en la TABLA XXI.

TABLA XXI

Patrones de restricción obtenidos en diferentes poblaciones de *Mytilus*

			POBLACIONES								
			<i>M. e</i>		<i>M. ch</i>	<i>M. g</i>		<i>M. t</i>			<i>M. c</i>
			YE	PE	PA	RA	BA	OI	BB	EL	PP
SATÉLITE I	<i>Hae III</i>	A	2	3	1	9	-	2	2	-	8
		B	-	-	1	-	-	-	1	-	-
		C	7	10	9	3	-	7	5	-	4
		D	7	3	5	4	16	7	8	16	4
		E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Msp I</i>	A	-	-	-	12	15	3	3	-	-
		B	1	16	15	4	1	6	13	2	3
		C	15	-	1	-	-	7	-	14	13
		D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Dra I</i>	A	1	-	-	-	-	-	-	-	2
		B	-	-	-	-	-	-	4	-	-
		C	12	13	16	5	-	13	12	15	11
		D	3	3	-	11	16	3	-	1	3
		E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Taq I</i>	A	10	8	-	12	-	7	-	-	7
		B	1	-	-	-	9	-	-	-	-
		C	5	8	11	-	3	9	14	10	9
		D	-	-	5	-	4	-	2	6	-
		E	-	-	-	4	-	-	-	-	-
SATÉLITE II	<i>Hae III</i>	A	6	6	1	12	5	10	4	8	15
		B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		C	10	10	15	4	11	6	12	8	1
		D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		E	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Dra I</i>	A	5	2	-	-	2	-	-	2	-
		B	8	2	5	13	2	10	4	5	16
		C	3	10	8	2	5	6	7	9	-
		D	-	2	3	1	7	-	5	-	-
		E	-	-	-	-	-	-	-	-	-

			POBLACIONES								
			<i>M. e</i>		<i>M. ch</i>	<i>M. g</i>		<i>M. t</i>			<i>M. c</i>
			YE	PE	PA	RA	BA	OI	BB	EL	PP
SATÉLITE III	<i>Hae</i> III	A	-	-	-	-	-	1	-	1	5
		B	16	2	14	8	14	4	3	3	-
		C	-	14	2	8	2	10	13	10	11
		D	-	-	-	-	-	-	-	2	-
		E	-	-	-	-	-	1	-	-	-

M. e = *M. edulis*; *M. ch* = *M. e. chilensis*; *M. g* = *M. galloprovincialis*; *M. t* = *M. trossulus*; *M. c* = *M. californianus*; YE, Yerseke; PE, Prince Edward Island; PA, Puerto Aguirre; RA, Ría de Arosa; BA, Balcobo; OI, Ölland Island; BB, Bedford Basin; EL, Esquimalt Lagoon; PP, Point no point; A, digestión total; B, digestión parcial siendo poco frecuente la ausencia de dianas; C, digestión parcial con igual presencia/ausencia de dianas; D, digestión parcial siendo más frecuente la ausencia de dianas; E, no digestión o ausencia de dianas.

En las **secuencias tipo I**, únicamente se ha observado una respuesta homogénea de todos los individuos analizados en la digestión con *Hae* III, en las poblaciones de Balcobo y Esquimalt L.; en la digestión con *Msp* I, en la población de Prince Edward I.; y en la digestión con *Dra* I, en las poblaciones de P. Aguirre y Balcobo. Los patrones más frecuentes en todos los casos son las digestiones parciales por pérdida o ausencia de dianas en algunas unidades monoméricas. La digestión total es el patrón más frecuente en las poblaciones de R. Arosa, con *Hae* III, *Msp* I y *Taq* I, en la de Yerseke, con *Taq* I y en la de P. point, con *Hae* III (FIGURA 33).

FIGURA 33. Amplificaciones por PCR de las secuencias tipo I y digestión con las endonucleasas:

(A) *Hae* III, (B) *Msp* I, (C) *Dra* I y (D) *Taq* I.

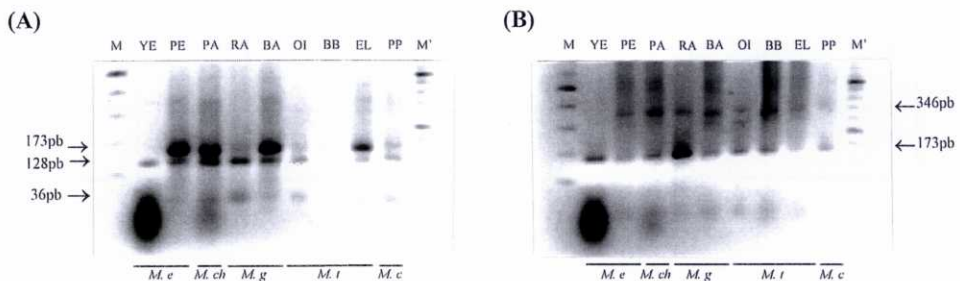
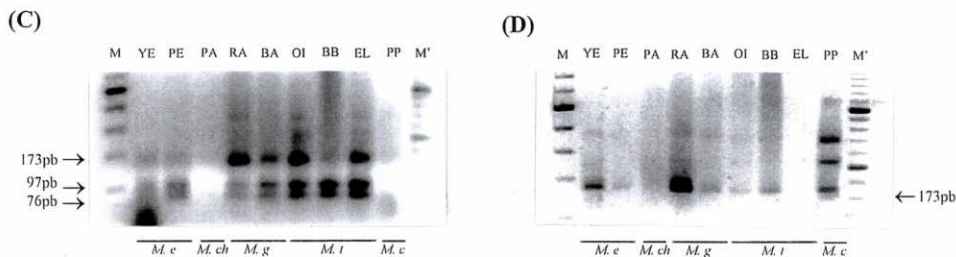


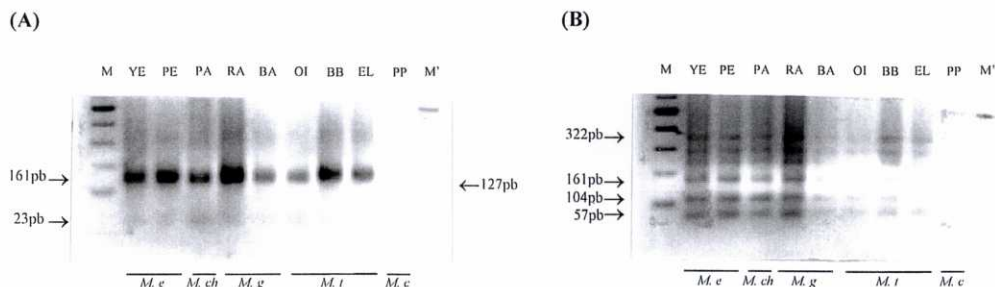
FIGURA 33 (continuación)



M: ADN marcador de 100pb; M': ADN marcador de 50pb; YE, Yerseke; PE, Prince Edward Island; PA, Puerto Aguirre; RA, Ría de Arosa; BA, Balcobo; OI, Öland Island; BB, Bedford Basin; EL, Esquimalt Lagoon; PP, Point no point.

En las **secuencias tipo II**, únicamente se ha observado un patrón homogéneo de todos los individuos analizados en la población de P. point, con *Dra I*. En el caso de *Hae III*, la digestión total es la respuesta más frecuente en las poblaciones de R. Arosa, Öland I. y P. point, y la digestión parcial (patrón C) en el resto de poblaciones analizadas. En el caso de *Dra I*, todas las poblaciones tienen como respuesta más frecuente uno de los tres patrones correspondientes a la digestión parcial, patrones B y/o C (FIGURA 34).

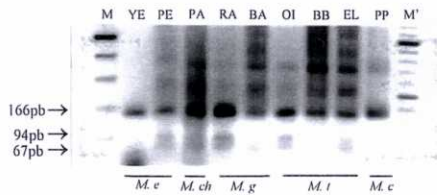
FIGURA 34. Amplificaciones por PCR de las secuencias tipo II y digestión con las endonucleasas: (A) *Hae III* y (B) *Dra I*.



M: ADN marcador de 100pb; M': ADN marcador de 50pb; YE, Yerseke; PE, Prince Edward Island; PA, Puerto Aguirre; RA, Ría de Arosa; BA, Balcobo; OI, Öland Island; BB, Bedford Basin; EL, Esquimalt Lagoon; PP, Point no point.

En las **secuencias tipo III**, la población de Yerseke es la única que presenta una respuesta homogénea en todos los individuos analizados, aunque todas las poblaciones presentan un patrón de digestión parcial (patrón B y/o C) como respuesta más frecuente (FIGURA 35).

FIGURA 35. Amplificaciones por PCR de las secuencias tipo III y digestión con la endonucleasa *Hae III*.



M: ADN marcador de 100pb; **M'**: ADN marcador de 50pb; **YE**, Yerseke; **PE**, Prince Edward Island; **PA**, Puerto Aguirre; **RA**, Ría de Arosa; **BA**, Balcobo; **OI**, Öland Island; **BB**, Bedford Basin; **EL**, Esquimalt Lagoon; **PP**, Point no point.

4.5. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE COPIA DE SECUENCIAS ADN SATÉLITE

Apa I.

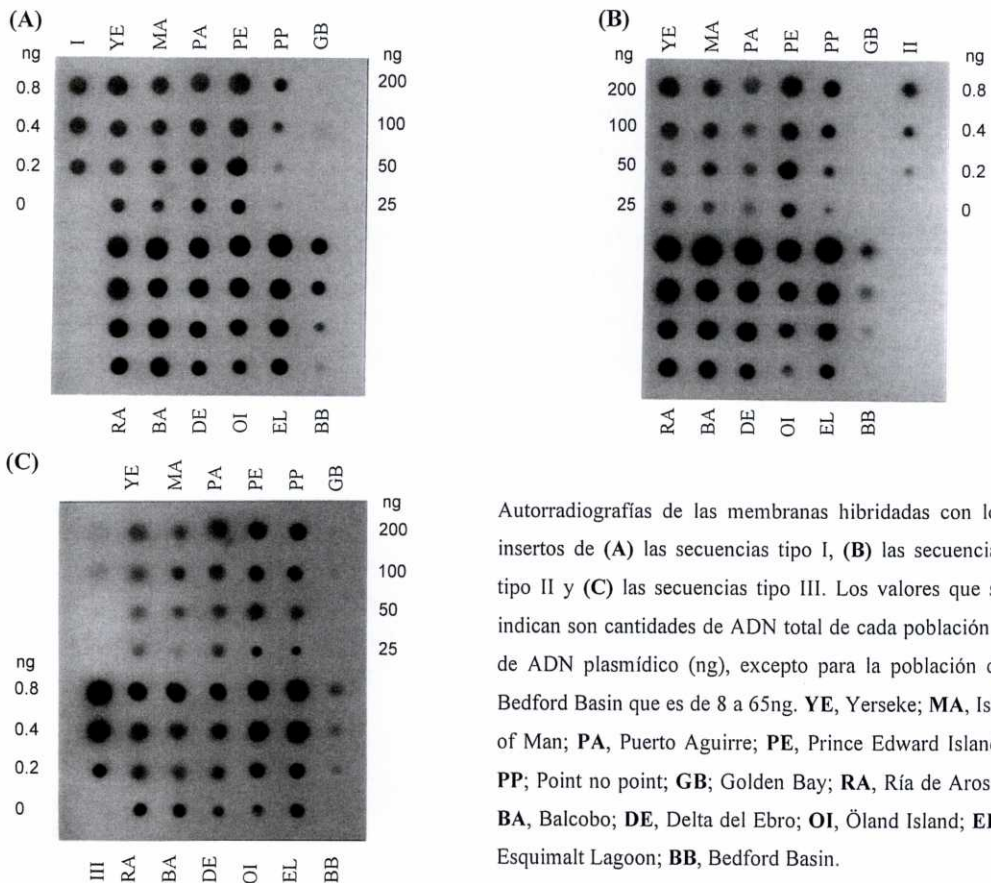
Las hibridaciones Dot Blot se realizaron para estimar de manera aproximada la cantidad relativa de los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I* en el genoma de diferentes poblaciones del género *Mytilus* y una población del género *Perna*.

La abundancia relativa de los tres elementos repetitivos descritos en el genoma de *M. edulis** (Ruíz-Lara, 1993), se determinó en 12 poblaciones de la familia Mytilidae, mediante hibridaciones Dot Blot, como se ha descrito en Material y Métodos (apartado 3.10). Para ello, se depositaron cantidades crecientes de insertos de ADN monoméricos (0.2, 0.4 y 0.8ng) de los tres tipos de secuencias y de ADN genómico de diferentes poblaciones de mejillón (25 a 200ng, excepto para la población de Bedford Basin que es de 8 a 65ng) en puntos discretos de una

membrana de nylon. Tras hibridar dicha membrana, independientemente, con los tres tipos de secuencias, la cantidad relativa de cada secuencia en cada población se estimó mediante la comparación entre la lectura realizada por un densitómetro, de la señal de hibridación en las diferentes diluciones de ADN genómico y la lectura de la señal de hibridación en las diluciones de ADN plasmídico.

Así, en la FIGURA 36 se muestran las autorradiografías de las membranas hibridadas, mediante Dot blot, con los insertos de las secuencias tipo I (A), tipo II (B) y tipo III (C). Se observa que la población de Golden Bay (*Perna canaliculus*) no hibrida con ninguno de estos tres tipos de secuencias y que la señal de hibridación en las secuencias tipo I para la población de P. point (*M. californianus*) es menos intensa que para el resto de poblaciones analizadas.

FIGURA 36. Hibridación Dot Blot, para estimar el número de copia de cada ADN satélite *Apa I* en diferentes poblaciones de la familia Mytilidae.



La TABLA XXII resume los valores promedio de los tres experimentos independientes, observándose que para las secuencias tipo I el número de copias por célula haploide varía entre 8.49×10^3 y 7.91×10^4 ; para las secuencias tipo II, entre 8.26×10^4 y 1.94×10^5 ; y para las secuencias tipo III, entre 1.12×10^3 y 1.06×10^4 .

TABLA XXII

Número de copias de los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I* en diferentes poblaciones de *Mytilidae*

POBLACIÓN	SATÉLITE TIPO I	SATÉLITE TIPO II	SATÉLITE TIPO III	
<i>M. e</i>	YE	44942 (0.46)	135927 (1.31)	1121 (0.011)
	MA	34980 (0.36)	114219 (1.10)	1611(0.016)
	PE	52745 (0.54)	115489 (1.11)	1405 (0.014)
<i>M. ch</i>	PA	36932 (0.38)	108721 (1.04)	1132 (0.011)
	RA	68496 (0.63)	148350 (1.27)	4472 (0.040)
<i>M. g</i>	BA	79096 (0.73)	194157 (1.66)	3456 (0.031)
	DE	70637 (0.65)	181259 (1.55)	2766 (0.025)
	OI	59860 (0.70)	104479 (1.13)	7334 (0.083)
<i>M. t</i>	BB	60421 (0.71)	125531 (1.36)	8208 (0.093)
	EL	67310 (0.79)	139253 (1.51)	10576 (0.120)
	PP	8486 (0.094)	82595 (0.85)	10118 (0.110)
<i>P. c</i>	GB	-	-	-

M. e = *M. edulis*; *M. ch* = *M. e. chilensis*; *M. g* = *M. galloprovincialis*; *M. t* = *M. trossulus*; *M. c* = *M. californianus*; *P. c* = *Perna canaliculus*; **YE**, Yerseke; **MA**, Isle of Man; **PE**, Prince Edward Island; **PA**, Puerto Aguirre; **RA**, Ría de Arosa; **BA**, Balcobo; **DE**, Delta del Ebro; **OI**, Öland Island; **BB**, Bedford Basin; **EL**, Esquimalt Lagoon; **PP**, Point no point; **GB**, Golden Bay. Entre paréntesis se expresan los valores en %.

4.6. ANÁLISIS SOUTHERN BLOT DE SECUENCIAS ADN SATÉLITE *Apa I*

4.6.1. Análisis del ADN satélite *Apa I* en *M. galloprovincialis*

El ADN genómico de 30 individuos de cada una de las poblaciones de *M. galloprovincialis* (Balcobo, Ría de Arosa y Delta del Ebro), fue digerido con cuatro endonucleasas de restricción (*Hae III*, *Msp I*, *Dra I* y *Taq I*). Los fragmentos generados en la digestión con los diferentes enzimas fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa y transferidos a membranas de nylon que, posteriormente, se hibridaron independientemente con los insertos marcados de los ADN satélites tipo I, tipo II y tipo III, como se ha descrito en Material y Métodos (apartado 3.9).

Un análisis previo de la **secuencia consenso tipo I** obtenida para *M. galloprovincialis* reveló que la endonucleasa *Hae III* presenta dos dianas de restricción (posiciones +6 y +170), cuya presencia en todas las unidades monoméricas da lugar a fragmentos de 164 y 9pb.

La hibridación con el inserto de las secuencias tipo I sobre membranas de nylon que tenían transferido ADN genómico digerido con *Hae III*, dio lugar a cinco patrones diferentes: patrón 1, se detectan dos bandas de 164 y 9pb; patrón 2, se aprecian dos bandas de 164 y 173pb; patrón 3, se observa una única banda correspondiente al monómero (173pb); patrón 4, se aprecian dos bandas, una de 173pb y otra cuyo peso molecular está comprendido entre 173 y 346pb; y patrón 5, se observa un fragmento prominente de 173pb y una segunda banda menos intensa de aproximadamente 346pb (FIGURA 37). Así, en la población de Balcobo se observó el patrón 1 en el 77% de los individuos analizados y el patrón 4 en el 20%. En la población de R. Arosa, se apreció el patrón 2 en el 50% de los individuos y el patrón 3 en el 50% restante. En la población de D. Ebro se observó el patrón 1 en el 28% de los individuos analizados, el patrón 3 en el 9%, el patrón 4 en el 20% y el patrón 5 en el 37% (FIGURA 37A).

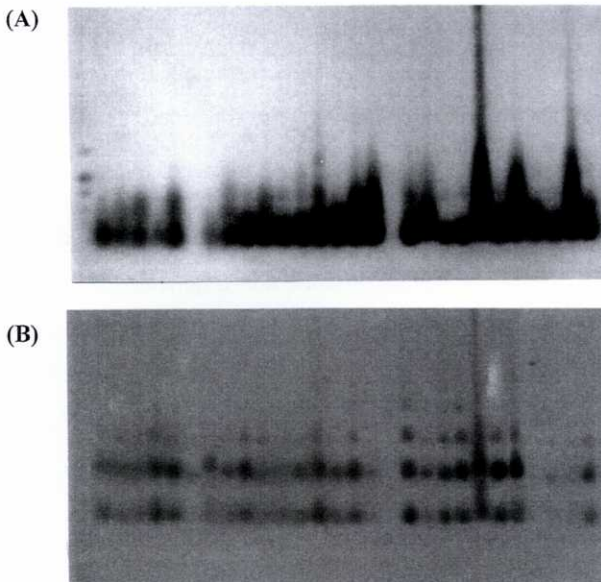
La enzima *Msp I* también presenta dos dianas en la secuencia consenso tipo I de *M. galloprovincialis* (posiciones +102 y +167), cuya presencia produce dos fragmentos de 108 y 65pb en la digestión total. En las hibridaciones del ADN digerido con *Msp I* se detectaron dos patrones: el patrón 1 en el que se observan dos fragmentos de 108 y 65pb y el patrón 2 en el que se aprecia una única banda correspondiente a la unidad monomérica. En la población de Balcobo, se observa el patrón 1 en el 63% de los individuos analizados y el patrón 2 en el 37% restante. Sin embargo, todos los individuos analizados de las poblaciones de R. Arosa y D. Ebro presentan un patrón 1.

restante. Sin embargo, todos los individuos analizados de las poblaciones de R. Arosa y D. Ebro presentan un patrón 1.

La secuencia consenso tipo I de *M. galloprovincialis* no presenta dianas de restricción para *Dra I*; sin embargo, en la posición +117 del clon pGBA111 existe una diana para esta endonucleasa. La restricción total con dicha enzima dio lugar a una distribución de fragmentos multimérica, observándose una respuesta homogénea en todos los individuos de las tres poblaciones analizadas. En la mayoría de los individuos, el fragmento dimérico de aproximadamente 346pb está más representado que el monomérico, ya que la intensidad de su banda es superior.

La secuencia consenso tipo I de *M. galloprovincialis* presenta una diana en la posición +73 para la endonucleasa *Taq I*. En la restricción total del ADN genómico con esta enzima, se observa una respuesta similar a la obtenida con *Dra I*, presentando todos los individuos de las tres poblaciones analizadas una respuesta homogénea. En la FIGURA 37B se observa la distribución de fragmentos multimérica obtenida en la digestión con *Taq I*, en la que se aprecia una mayor intensidad de la banda dimérica en la mayoría de los individuos.

FIGURA 37. Hibridación sobre Southern blot con la unidad monomérica marcada de las secuencias ADN satélite tipo I.



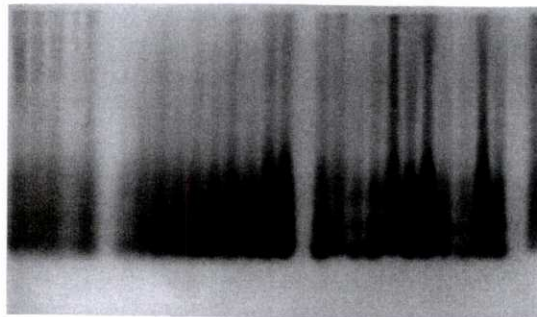
El ADN genómico de *M. galloprovincialis* fue digerido con las endonucleasas: **(A)** *Hae III*: en el margen izquierdo se representa el ADN marcador de peso molecular Marker VIII. Los carriles 1, 3, 5, 10, 15, 16, 18, 23, 24, 26, 27 corresponden al patrón 1, los carriles 2, 4, 7, 19 y 22 al patrón 3, los carriles 8, 14, 25 y 28 al patrón 4 y los carriles 9, 11, 12, 13, 20 y 21 al patrón 5. **(B)** *Taq I*: se observa la distribución multimérica de fragmentos.

La **secuencia consenso tipo II** de *M. galloprovincialis* presenta dos dianas, en las posiciones +8 y +158, para el enzima *Hae III*, que en la digestión total produce fragmentos de 150 y 11pb.

La hibridación con el inserto de las secuencias tipo II sobre membranas de nylon que tenían transferido ADN genómico digerido con *Hae III*, dio lugar a cuatro patrones diferentes: patrón 1, se detecta una banda de 150pb; patrón 2, se observa una única banda correspondiente al monómero (161pb); patrón 3, se aprecia un fragmento prominente de 161pb y una segunda banda menos intensa de aproximadamente 322pb; y patrón 4 se observan tres bandas de 150, 161 y 322pb. En la población de Balcobo se observó el patrón 1 en el 47% de los individuos analizados, el patrón 2 en el 37% y el patrón 3 en el 16% restante. En la población de R. Arosa, el patrón 1 y el 2 están representados en el mismo porcentaje. En la población de D. Ebro, se observó el patrón 4 en todos los individuos analizados. En las tres poblaciones, las respuestas obtenidas son más difusas a lo largo del carril, que las de las secuencias tipo I.

La secuencia consenso tipo II de *M. galloprovincialis* no presenta dianas para *Dra I*, aunque en el clon pGBA202 existe una diana en la posición +87. En las tres poblaciones analizadas, se observa una respuesta homogénea en todos los individuos, en la que la restricción total con este enzima muestra una distribución en “escalera” como la obtenida con las secuencias tipo I, aunque la señal es más difusa a lo largo del carril (FIGURA 38).

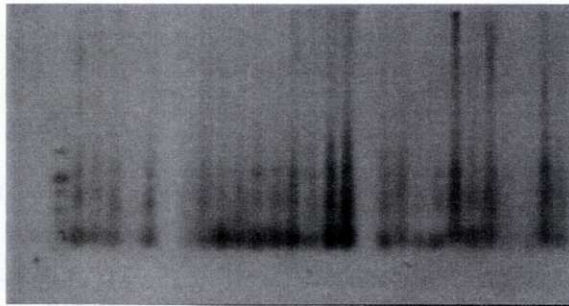
FIGURA 38. Autorradiografía de la restricción del ADN genómico de *M. galloprovincialis* con la enzima *Dra I*, transferido a membrana de nylon e hibridado con la unidad monomérica de las secuencias ADN satélite tipo II.



Los enzimas *Msp I* y *Taq I* no presentan dianas en la secuencia consenso tipo II de *M. galloprovincialis*, aunque en el clon pGBA202 existe una diana para *Taq I* en la posición +28. Sin embargo, ambas endonucleasas no digieren este tipo de secuencias, produciendo una señal difusa a lo largo del carril, debido a la ausencia de fragmentos definidos como en el resto de las restricciones totales.

La **secuencia consenso tipo III** de *M. galloprovincialis* presentan una diana, en la posición +162, para el enzima *Hae III*, que en la restricción total da lugar al monómero. Esta endonucleasa presenta otra diana en la posición +13 en el clon pGBA315. En las tres poblaciones analizadas se obtuvo una respuesta homogénea en todos los individuos, en la cual se aprecia una banda más intensa de aproximadamente 165pb y una segunda banda de menor intensidad de aproximadamente 330pb, que se corresponde con el dímero (FIGURA 39).

FIGURA 39. Patrones de hibridación obtenidos utilizando como sonda la unidad monomérica marcada de las secuencias ADN satélite tipo III, sobre el ADN de *M. galloprovincialis* digerido con *Hae III*.



En el margen izquierdo se representa el ADN marcador de peso molecular marker VIII.

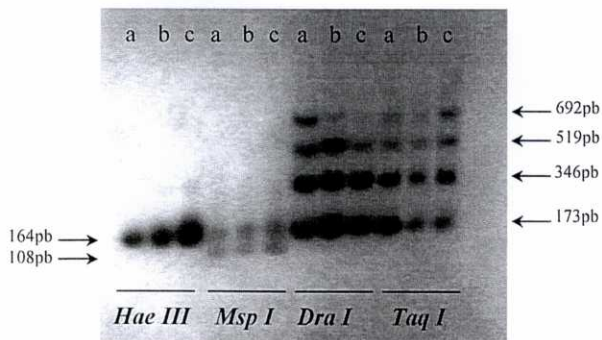
Los enzimas *Msp I*, *Dra I* y *Taq I* no presentan dianas en la secuencia consenso tipo III de *M. galloprovincialis*, ni en ninguno de los clones secuenciados. La digestión con estas endonucleasas produce una señal difusa a lo largo del carril, debido a la ausencia de fragmentos definidos, en las tres poblaciones analizadas.

4.6.2. Análisis del ADN satélite *Apa I* en diferentes especies de mejillón

Hemos analizado los patrones de restricción de los individuos de nueve poblaciones pertenecientes a cuatro especies del género *Mytilus*: (1) *M. galloprovincialis*: D. Ebro y Balcobo, (2) *M. edulis*: Yerseke y Prince Edward I., (3) *M. e. chilensis*: P. Aguirre, y (4) *M. trossulus*: Esquimalt L., Bedford B. y Öland I. La población de *Perna canaliculus* (Golden B.) se utilizó como control negativo. Para ello, el ADN genómico fue digerido con las cuatro endonucleasas mencionadas anteriormente y, como en los casos anteriores, sometido a electroforesis, transferido a membranas y éstas hibridadas independientemente con las correspondientes unidades monoméricas marcadas.

En las hibridaciones con las **secuencias tipo I** (FIGURA 40), la restricción total con *Hae III* da lugar a dos patrones. En las poblaciones de *M. galloprovincialis* y *M. edulis*, la digestión con este enzima genera bandas de 164pb y en las poblaciones de *M. e. chilensis* y *M. trossulus* se detecta una banda de 173pb correspondiente al monómero.

FIGURA 40. Patrones de hibridación de la unidad monomérica marcada de las secuencias ADN satélite tipo I sobre Souther blot conteniendo ADN digerido de: **a**, *M. edulis*; **b**, *M. galloprovincialis*; **c**, *M. trossulus*, digerido con las endonucleasas *Hae III*, *Msp I*, *Dra I* y *Taq I*.

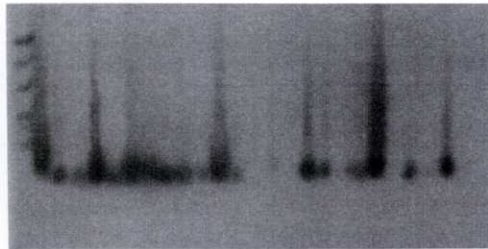


En la digestión con *Msp I*, se observa un patrón homogéneo en todas las poblaciones formado por dos bandas de 173 y 108pb.

Las restricciones totales con los enzimas *Dra I* y *Taq I* dan lugar a una distribución multimérica o en “escalera” en todas las poblaciones y en la mayoría de los casos, el fragmento correspondiente al dímero está más representado que el monómero, siendo la intensidad de su banda superior.

En las hibridaciones con las **secuencias tipo II** (FIGURA 41), la restricción total con *Hae III* da lugar a un patrón homogéneo, en todas las poblaciones analizadas, formado por una banda de 150pb. La endonucleasa *Dra I* también presenta una diana en este tipo de secuencias que, en todas las poblaciones analizadas, da lugar a una distribución en “escalera” similar a la obtenida con las secuencias tipo I, aunque en este caso la señal es más difusa a lo largo del carril. Por último, las enzimas *Msp I* y *Taq I* no digieren este tipo de secuencias, produciendo una señal difusa a lo largo del carril, debido a la ausencia de fragmentos definidos, en todas las poblaciones analizadas.

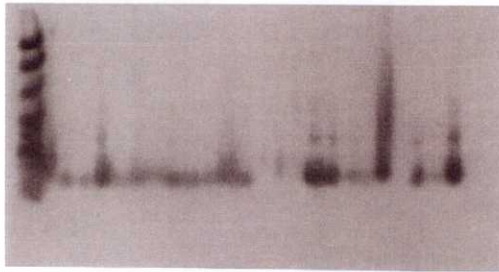
FIGURA 41. Patrones de hibridación con la unidad monomérica marcada de las secuencias ADN satélite tipo II, sobre Southern blot conteniendo el ADN digerido con la endonucleasa *Hae III* de diferentes poblaciones de mejillón



DE, Delta del Ebro (carriles 1-3); **BA**, Balcobo (carriles 4-6); **YE**, Yerseke (carriles 7-9); **PE**, Prince Edward Island (carriles 10-12); **PA**, Puerto Aguirre (carriles 13-15); **EL**, Esquimalt Lagoon (carriles 16-18); **BB**, Bedford Basin (carriles 19-21); **OI**, Öland Island (carriles 22-24); **GB**, Golden Bay (carriles 25-28).

En las hibridaciones con las **secuencias tipo III** (FIGURA 42), se observa una respuesta autorradiográfica de menor intensidad en igualdad de condiciones de hibridación y exposición. La endonucleasa *Hae III* presenta una diana que en la restricción total da lugar al fragmento monomérico en todas las poblaciones analizadas. Sin embargo, los enzimas *Msp I*, *Dra I* y *Taq I* no presentan dianas de restricción en este tipo de secuencias, dando lugar a una señal difusa a lo largo del carril, como en casos anteriores, en todas las poblaciones analizadas.

FIGURA 42. Patrones de hibridación obtenidos utilizando como sonda la unidad monomérica marcada de las secuencias ADN satélite tipo III, sobre el ADN de diferentes poblaciones de mejillón digerido con la endonucleasa *Hae III*.



DE, Delta del Ebro (carriles 1-3); **BA**, Balcobo (carriles 4-6); **YE**, Yerseke (carriles 7-9); **PE**, Prince Edward Island (carriles 10-12); **PA**, Puerto Aguirre (carriles 13-15); **EL**, Esquimalt Lagoon (carriles 16-18); **BB**, Bedford Basin (carriles 19-21); **OI**, Öland Island (carriles 22-24); **GB**, Golden Bay (carriles 25-28).

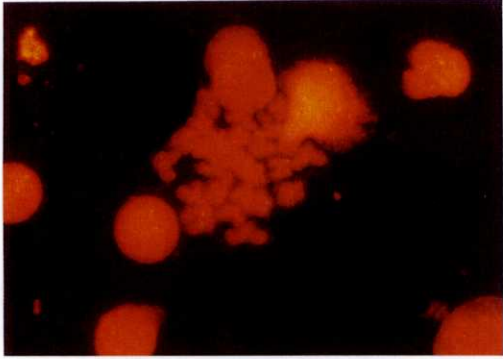
4.7. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH), con sondas de los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I*, se determinó la localización cromosómica de las mismas en *M. galloprovincialis* (Balcobo), *M. edulis* (Yerseke) y *M. trossulus* (Esquimalt L.).

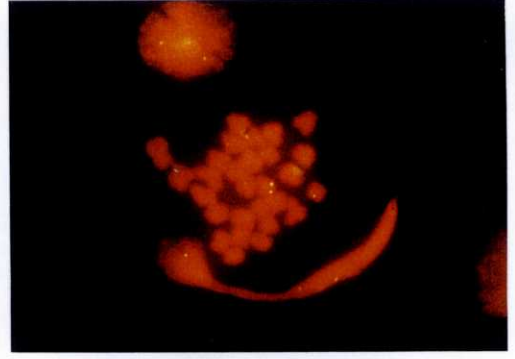
Las **secuencias tipo I** se encuentran localizadas en, al menos, nueve *clusters* diferentes en las tres especies analizadas. A nivel cromosómico la localización puede ser intercalar y, en algún caso, en regiones próximas a los telómeros (FIGURA 43A).

FIGURA 43. Hibridación *in situ* con las secuencias ADN satélite *Apa I*

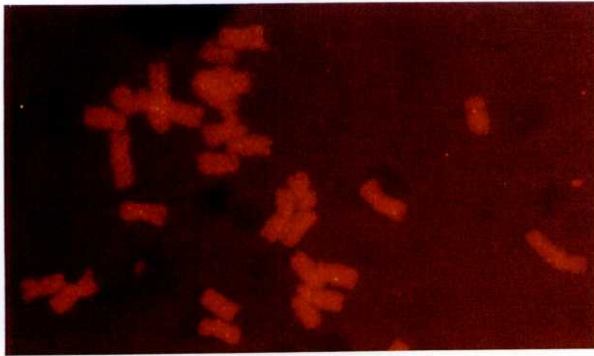
A



C



B



Hibridación *in situ* con (A) la unidad monomérica de las secuencias tipo I sobre cromosomas metafásicos de *M. edulis*; (B) la unidad monomérica de las secuencias tipo II sobre cromosomas metafásicos de *M. galloprovincialis*; (C) la unidad monomérica de las secuencias tipo III sobre cromosomas metafásicos de *M. trossulus*.

Los *clusters* de las **secuencias tipo II**, en las tres especies analizadas, se encuentran distribuidos por todos los cromosomas de forma longitudinal, sin estar localizados en regiones cromosómicas concretas (FIGURA 43B).

Las **secuencias tipo III**, al ser menos abundantes, únicamente se localizan en, al menos, tres pares cromosómicos y en regiones próximas al telómero en las tres especies analizadas (FIGURA 43C).

4.8. UTILIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS ADN SATÉLITE *Apa I* PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MEJILLONES

Desde el punto de vista práctico y como aplicación industrial y/o comercial de los resultados de este trabajo, se trató de diferenciar las seis especies de mejillón, con referencia especial a las cultivadas y utilizadas en productos manufacturados (*M. edulis*, *M. e. chilensis*, *M. galloprovincialis* y *P. canaliculus*). Teniendo en cuenta que en muchos casos estos productos proceden de muestras de conservas, el ADN se obtuvo según se ha descrito en el apartado 3.2 de Material y Métodos, realizando una serie de lavados previos en una solución de cloroformo:metanol:agua (1:2:0.8) para eliminar los lípidos y aceites de dichas muestras.

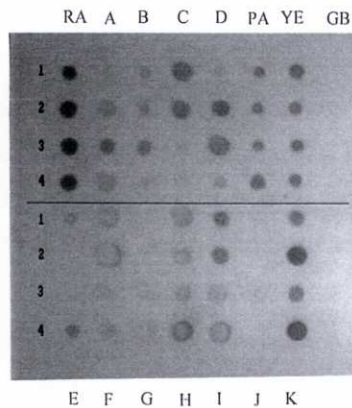
Las amplificaciones por PCR se realizaron en individuos de conservas pertenecientes a diferentes marcas comerciales, utilizando como controles individuos de las poblaciones de Yerseke, P. Aguirre y R. Arosa. En todas las muestras analizadas, los productos de PCR de las secuencias tipo I fueron de ~173pb, los de la tipo II de ~161pb y los de la tipo III de ~166pb, coincidiendo los resultados con los análisis anteriores en muestras de poblaciones naturales. Dado que la simple amplificación de estas secuencias no diferencia las especies procedentes de diferentes conservas y, basándonos en el elevado polimorfismo de estas secuencias, se realizó una restricción enzimática de dichos productos de PCR con un elevado número de endonucleasas. Una vez más, los resultados no permiten diferenciar entre *Mytilus spp.* y *Perna spp.*, ni entre especies del género *Mytilus*.

Sin embargo, mediante la técnica de hibridación Dot blot se detectó la ausencia de señal de hibridación en la población de *P. canaliculus* (Golden B.) con los tres tipos de secuencias repetitivas, debido al bajo número de repeticiones de dichas secuencias en los individuos de esa especie. Así, se adaptó la técnica de Dot blot para diferenciar *Perna spp.* de *Mytilus spp.* Para ello, se preparan diluciones de ADN con una concentración de 100ng/μL de los individuos a analizar y de controles positivos. Posteriormente, se desnaturalizaron depositándose 1μL de cada muestra en puntos discretos de una membrana de nylon. Después de fijar el ADN a la membrana con U.V., hibridamos con las secuencias tipo II (ya que la señal es más intensa debido a su mayor número de copia) como se describe en el apartado 3.10 de Material y Métodos. Sin embargo, los lavados posthibridación y la detección de la señal de hibridación es diferente. Así, después de hibridar la membrana durante toda la noche, se incubó en una solución de TNB durante 20min con agitación para bloquear los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo. Seguidamente, se incubó la membrana durante 45 min con agitación en la solución de

anticuerpos en TNB y, para eliminar el anticuerpo no unido, se realizan tres lavados de 5min en 1xPBS con agitación. Finalmente, se procede a la detección colorimétrica de la señal de hibridación con los reactivos NBT (solución 100mg/mL en dimetilformamida 70% v/v) y BCIP (X-fosfato, solución 50mg/mL), incubando la membrana en oscuridad. El precipitado de color comienza a formarse en pocos minutos y, normalmente, la reacción es completa después de 30min.

En la FIGURA 44 se muestra un ejemplo de esta técnica. Para ello se prepararon diluciones de ADN a una concentración de 100ng/μL de cuatro individuos pertenecientes a 11 marcas comerciales de conservas (A-K), de tres controles positivos con individuos pertenecientes a poblaciones que se explotan comercialmente, como son Yerseke, P. Aguirre y R. Arosa, y de un control negativo de *P. canaliculus* (Golden B.). Como se puede observar los individuos de las conservas G y J, así como en algunos individuos de las conservas C y E, no se detecta señal de hibridación, lo cual indica de forma inequívoca que estos individuos no pertenecen a las especies *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, las cuales son las únicas que la normativa europea de consumo permite comercializar con el nombre de mejillón.

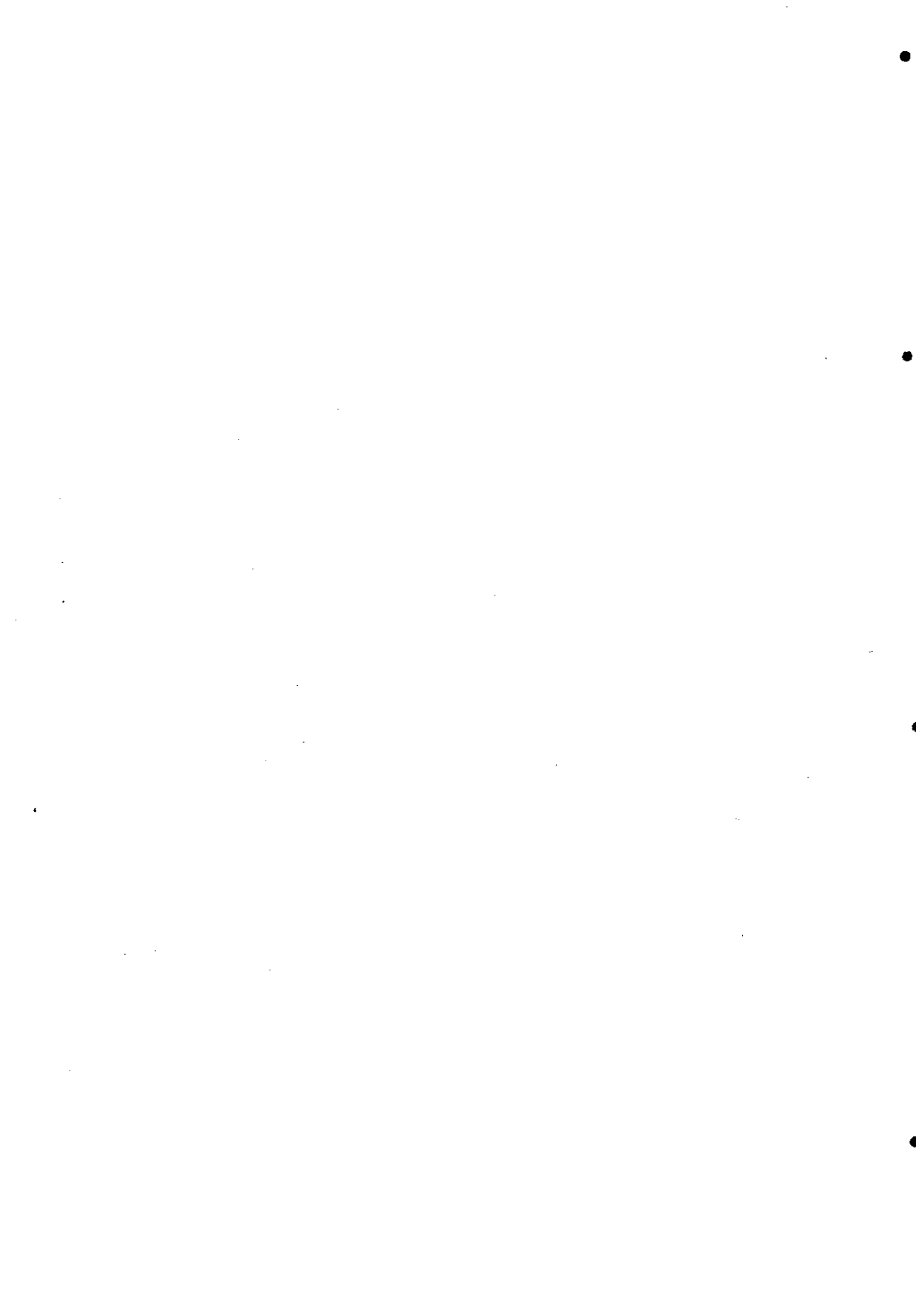
FIGURA 44. Hibridación Dot blot de muestras manufactureradas



Hibridación Dot blot con la unidad monomérica marcada de las secuencias tipo II ADN satélite *Apa I* del ADN genómico de cuatro individuos procedentes de muestras manufactureradas de 11 marcas comerciales (A-K); RA, control de *M. galloprovincialis* de la Ría de Arosa; YE, control de *M. edulis* de Yerseke; PA, control de *M. e. chilensis* de Puerto Aguirre; GB, control de *P. canaliculus* de Golden Bay.

Finalmente, en aquellos individuos en los que se ha detectado señal de hibridación en el Dot blot, se realiza una amplificación de las secuencias ADN satélite tipo I con los *primers* descritos en el apartado 4.2 (S1F y S1B). La digestión de los productos de PCR con la endonucleasa *Msp I* produce patrones de restricción que permiten diferenciar la población de procedencia de los mejillones analizados, ya que los pertenecientes a la especie *M. galloprovincialis* presentan un patrón de digestión total como respuesta más frecuente, lo cual no se detecta en las poblaciones de *M. edulis*, ni en las de *M. e. chilensis*. Así, las conservas D, F, H, I y K incluyen en sus viandas mejillones *M. galloprovincialis*.

5. DISCUSIÓN



5.1. SECUENCIAS DE COPIA ÚNICA EN MEJILLÓN

Los estudios de secuencias de mejillón basados en la amplificación por PCR, han tenido como único objetivo la búsqueda de un marcador diagnóstico que permita diferenciar las especies del "complejo *M. edulis*". Estos analizan únicamente los polimorfismos de uno o dos *loci* en muestras pertenecientes a poblaciones que se localizan en áreas próximas geográficamente. Los resultados descritos hasta este momento no han sido muy concluyentes, de forma que en este trabajo hemos estudiado por primera vez cinco marcadores de ADN en 10 poblaciones, distribuidas por las costas del Atlántico y del Pacífico, pertenecientes a diferentes especies de mejillón. Con ello, se pretende contribuir a conocer el grado de diferenciación genética entre las especies y/o poblaciones, así como analizar sus relaciones filogenéticas.

Los RFLPs obtenidos en este trabajo, tras la digestión con *Hinf I* de los productos de PCR de la fracción PLIIa de la proteína *protamine-like*, revelan que este marcador genético no resulta ser diagnóstico cuando se analizan poblaciones de mejillón distantes geográficamente. Estos resultados contrastan con los patrones de restricción observados por Heath *et al.* (1995), quienes diferenciaron la especie *M. trossulus* de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. Sin embargo, hemos detectado individuos pertenecientes a las especies *M. edulis* (I. Man) y *M. galloprovincialis* (Balcobo) que presentan el patrón típico descrito para *M. trossulus*; así como individuos *M. trossulus* (Öland I.) con el patrón característico de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*.

El análisis realizado en este trabajo, mediante la técnica Dot blot, indica que en las cuatro especies estudiadas el número de copia de esta proteína *protamine-like* varía entre 7 y 13 por genoma haploide (FIGURA 6 y TABLA VI). Estos resultados contrastan con lo observado por Heath & Hilbish (1998) quienes, mediante análisis Southern blot, sugirieron que el número de copia de este gen sería de aproximadamente 4 por genoma haploide. En cuanto a la naturaleza de los polimorfismos de este marcador, Carlos *et al.* (1993) encontraron dos secuencias divergentes en *M. trossulus*, mostrando cada una de ellas niveles elevados de variación entre individuos, lo cual sugiere la existencia de más de un *locus* PLII en esta especie. En este sentido, la intensidad de los patrones de digestión parcial refleja la presencia/ausencia de la diana de *Hinf I* en las distintas copias del gen PLII. Como se puede observar en la FIGURA 5, los individuos de Bedford B. y Esquimalt L. presentan el mismo número de copias con y sin diana para *Hinf I*, mientras que los individuos de I. Man y Balcobo tienen un mayor número de copias de PLII con la diana para dicha endonucleasa.

En la amplificación por PCR de la proteína *protamine-like* PHI-1 se han detectado dos nuevos fragmentos: uno de 300pb, en la mayoría de las poblaciones europeas, y otro de 475pb, únicamente en la población de I. Man, no observándose individuos homocigotos para dichos fragmentos. Los individuos de las poblaciones de *M. trossulus* y los de D. Ebro son homocigotos para el fragmento de 280pb, mientras que los individuos del resto de las poblaciones presentan frecuencias variables de homocigotos y heterocigotos para los fragmentos de 280pb y 300pb (TABLA VII). Nuestros resultados indican que la amplificación de esta proteína *protamine-like* no es útil para diferenciar las especies pertenecientes al “complejo *M. edulis*”, coincidiendo con lo observado por Heath *et al.* (1996), aunque estos autores diferenciaron diagnósticamente *M. californianus* de las especies que forman dicho complejo.

Al amplificar el intrón 3 del gen de la calmodulina, CaM1, únicamente detectamos polimorfismo en las poblaciones de Yerseke e I. Man (*M. edulis*). El resto de las poblaciones de esta especie, así como las pertenecientes a *M. galloprovincialis*, son monomórficas para el alelo de 525pb (TABLA VIII), coincidiendo con lo observado por Côte-Real *et al.* (1994a) en poblaciones de *M. edulis* de las Islas Británicas y de *M. galloprovincialis* de Venecia. Las dos poblaciones americanas de *M. trossulus* (Esquimalt L. y Bedford B.) resultaron ser monomórficas para el alelo de 460pb y, por el contrario, la población del Mar Báltico (Öland I.) es monomórfica para el alelo de 525pb. Estos resultados sugieren que el marcador CaM1 no es diagnóstico para diferenciar las especies del “complejo *M. edulis*”.

La amplificación del extremo 5' del exón gigante del gen que codifica la proteína polifenólica adhesiva del biso (Glu-5'), muestra que los individuos de la población de Esquimalt L. (*M. trossulus*) son homocigotos para el alelo de 240pb, coincidiendo con los resultados obtenidos por Rawson *et al.* (1996) y Comesaña *et al.* (1999) en poblaciones de *M. trossulus* de la costa Este de Newfoundland (Canadá). Como se puede observar en la TABLA IX, esta homogeneidad no aparece en las poblaciones de Bedford B. y Öland I., no detectándose en esta última el alelo característico de *M. trossulus*, a diferencia de lo observado por Borsa *et al.* (1999) en otras poblaciones del Mar Báltico.

En cuanto a las poblaciones de *M. galloprovincialis*, la mayor parte de los individuos de Balcobo y R. Arosa y, aproximadamente, la mitad de los de D. Ebro, son homocigotos para el alelo de 300pb (TABLA IX). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Borsa *et al.* (1999), en poblaciones del Mar Mediterráneo, pero difieren de los de Rawson *et al.* (1996), quienes encontraron que la mayoría de los individuos analizados mostraban un patrón de dos bandas de

300pb y 500pb. siendo algunos individuos, ocasionalmente, homocigotos para la banda de 300pb.

En las poblaciones de *M. edulis* de Yerseke y Prince Edward I. el alelo más frecuente es el de 350pb (TABLA IX), coincidiendo con lo observado por Rawson *et al.* (1996), Borsa *et al.* (1999) y Comesaña *et al.* (1999). Sin embargo, la población de I. Man presenta una gran variabilidad en el número de alelos detectados, llegando a ser de cinco diferentes. Es interesante señalar que el alelo de 500pb detectado por Rawson *et al.* (1996) en las poblaciones de *M. galloprovincialis* de San Diego y Sète (Francia), en nuestro análisis únicamente se ha observado en las poblaciones de I. Man y D. Ebro.

Los resultados obtenidos en la amplificación de la región no repetitiva de la proteína del pie I (NRPP) muestran que el alelo de 180pb es el más frecuente en *M. edulis*, el de 168pb en *M. trossulus* y el de 126pb en *M. galloprovincialis*. Sin embargo, como se puede observar en la TABLA X, los individuos de I. Man presentan tres tipos de alelos y en los de las poblaciones de Öland I. y Bedford B. detectamos un nuevo alelo de aproximadamente 220pb. Nuestros resultados contrastan con lo observado por Inoue *et al.* (1995c) quienes sugirieron que este marcador puede ser diagnóstico para identificar las tres especies. Estos autores obtuvieron una respuesta homogénea en todas las poblaciones, aunque únicamente analizaron un elevado número de individuos en la de *M. galloprovincialis* de Kamashi en Japón (n=32) y en la de *M. trossulus* de Juneau en Alaska (n=16), en las siete poblaciones restantes pertenecientes a las tres especies del "complejo *M. edulis*" analizan como máximo ocho individuos. El bajo número de individuos analizados puede ser la causa de no detectar polimorfismos, sobre todo en las poblaciones de Francia y Noruega estudiadas por dichos autores.

Hay que señalar que las poblaciones polimórficas se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg, excepto en los casos de I. Man para los loci PHI-1 y NRPP y de Bedford B. para el locus Glu-5'. Sin embargo, aunque en muchos organismos marinos se ha observado déficit de heterocigotos mediante alozimas (Raymond *et al.*, 1997) y marcadores moleculares anónimos (Hare *et al.*, 1996; Hare & Avise, 1998), en nuestro análisis el Índice de Selander indica que para el locus PHI-1 las desviaciones se deben a un exceso de heterocigotos, mientras que para los loci Glu-5' y NRPP son por un déficit. En este sentido, Zouros & Foltz (1984a) propusieron varias hipótesis (alelos nulos, endogamia, efecto Wahlund, aneuploidía y selección) para explicar la deficiencia de heterocigotos en poblaciones de bivalvos. La del alelo nulo no se puede aplicar a los alelos estudiados en este trabajo. En cuanto a la endogamia existen dos factores que se

oponen a que sea la causa del déficit de heterocigotos en poblaciones naturales de mejillón: el primero, la naturaleza del ciclo de vida, en lo que se refiere a la existencia de la fertilización externa y de un estadio larvario, y el segundo, el hecho de que no se observó déficit en todos los *loci*.

El efecto Wahlund se ha utilizado principalmente para explicar el déficit de heterocigotos en poblaciones híbridas (Koehn *et al.*, 1976; Gosling & Wilkins, 1985; Raymond *et al.*, 1997), aunque no puede explicar el marcado déficit observado en áreas de poblaciones en las que las frecuencias alélicas para un *locus* son homogéneas (Gosling, 1992b). Dicho efecto podría explicar el déficit encontrado en la I. Man, ya que como se ha observado para los *loci* Glu-5' y NRPP presenta alelos típicos de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, por lo que podría considerarse una población híbrida. En el caso de la población de Bedford B. la deficiencia de heterocigotos observada para el *locus* Glu-5' también puede explicarse por el efecto Wahlund, ya que se trata de una población en la que dos especies coexisten simpátricamente y hemos detectado genotipos *M. edulis*-*M. trossulus* para dicho *locus*. Sin embargo, no podemos descartar la existencia de otros factores que contribuyen a dicho déficit, tales como la variación genotipo-dependiente, relacionada con la supervivencia al medio ambiente, u otros factores ecológicos o fisiológicos (Raymond *et al.*, 1997). En este sentido, Côte-Real *et al.* (1994a) sugirieron que diversos factores hidrográficos pueden interferir en el transporte de las larvas, limitando el flujo de genes entre sitios. Dicho flujo también podría estar interrumpido si las larvas supervivientes están adversamente afectadas por la reducida salinidad o el aumento de partículas de lodo. Por el contrario, el efecto Wahlund no sería una explicación válida para la población de Öland I., ya que aunque se han detectado poblaciones híbridas en los Grandes Estrechos daneses (Bulnheim & Gosling, 1988; Väinölä & Hvilsum, 1991), no se han descrito en la zona interior del Mar Báltico.

Aunque existen pocos trabajos sobre el nivel de aneuploidía en mejillón, éste es otro de los factores propuestos para explicar el déficit de heterocigotos. Zouros & Foltz (1984a) sugieren que la aparente deficiencia de heterocigotos observada en una población se debe a que los individuos monosómicos se han designado como homocigotos y, teniendo en cuenta que los aneuploides son menos viables, se puede explicar por qué dichos déficits tienden a disminuir con la edad. Ahmed & Sparks (1970) encontraron un 10% de mitosis con un número cromosómico anormal en huevos y embriones de *M. trossulus*. Dixon (1982) describe un 8% de aneuploidía en huevos y embriones de *M. edulis* de una zona no contaminada frente a un 26% de una

contaminada. Sin embargo, la aneuploidía no explica los amplios déficits de heterocigotos que se mantienen en poblaciones de bivalvos adultos y, aunque Martínez-Expósito *et al.* (1992) describen valores del 22 y 32% de células aneuploides en branquias de mejillones adultos, no detectaron individuos con todas sus células aneuploides.

La selección ha sido uno de los factores más citados como la causa del déficit de heterocigotos en poblaciones naturales de bivalvos marinos. Zouros & Foltz (1984a) propusieron varios modelos: en el primero, analizaron la viabilidad pre- y post-establecimiento de las larvas, para determinar si la inferioridad de heterocigotos (subdominancia) durante la etapa pre-establecimiento está compensada por la superioridad de heterocigotos (superdominancia) en adultos. En el segundo modelo, consideraron que la selección de la viabilidad ocurre en el estadio larvario y está compensada por la superdominancia para la fertilidad en el estadio adulto. Ambos modelos requieren grandes presiones de selección, un cambio en el sentido de la selección entre el estadio larvario y el individuo adulto, y, para una gran deficiencia de heterocigotos, subdominancia de la viabilidad larvaria (Zouros & Foltz, 1984a, b). Sin embargo, la selección natural podría explicar por qué para determinados *loci* y poblaciones, existe un déficit o un exceso de heterocigotos. En este sentido, es interesante señalar que para el *locus* NRPP todas las poblaciones polimórficas tienen déficit y para el *locus* Glu-5' unas presentan exceso y otras déficit. En este último caso, hemos de destacar que las poblaciones *M. galloprovincialis* de Sète (Francia) y San Diego analizadas por Rawson *et al.* (1996), así como la de D. Ebro analizada en este trabajo, son las únicas en las que se ha detectado un exceso de heterocigotos, asociado al genotipo 300/500 en los tres casos.

Todos estos resultados revelan que ninguno de los cinco marcadores genéticos analizados (PLIIa, PHI-1, CaM-1, Glu-5' y NRPP), se pueden utilizar para discriminar entre *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, aunque podrían ser útiles teniendo en cuenta algunas consideraciones. La primera de ellas es que varios autores consideran que el mejillón azul de las costas de Chile es una especie diferente dentro del "complejo *M. edulis*", denominada *M. chilensis*. De acuerdo con esto, se podría explicar por qué las frecuencias alélicas de los *loci* Glu-5' y NRPP de la población de P. Aguirre difieren de las observadas en el resto de las poblaciones pertenecientes a *M. edulis*. En este sentido, las distancias obtenidas con alozimas entre poblaciones de *M. chilensis* y *M. edulis* o *M. trossulus* son similares a las estimadas en este trabajo con marcadores de ADN nuclear (TABLA XXIII). Sin embargo, las distancias entre poblaciones de *M. chilensis* y *M. galloprovincialis* coinciden con las detectadas entre las

poblaciones de *M. galloprovincialis* del Atlántico y del Mediterráneo y difieren de las obtenidas para estas especies con alozimas.

TABLA XXIII

Distancias genéticas entre diferentes grupos de poblaciones

	Alozimas								ADNmt	ADN nuclear	
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
<i>M.e</i> vs <i>M.g</i>	0.21	0.51	0.17	0.16		1.28	1.09		0.63	0.00	0.67
<i>M.e</i> vs <i>M.t</i> *	0.25	0.84					1.27		0.10	0.09	0.18
<i>M.g</i> vs <i>M.t</i> *	0.21	0.72					1.24		0.76	0.09	0.72
<i>M.e</i> vs <i>M.t</i>							1.16				0.86
<i>M.g</i> vs <i>M.t</i>							0.91				1.10
<i>M.g</i> * vs <i>M.g</i> #					0.03			0.13			0.07
<i>M.e</i> * vs <i>M.e</i> #						0.62	0.11				0.18
<i>M.ch</i> vs <i>M.e</i>							0.53				0.59
<i>M.ch</i> vs <i>M.g</i>							0.71				0.07
<i>M.ch</i> vs <i>M.t</i>							0.80				1.12
<i>M.ch</i> vs <i>M.t</i> *							0.74				0.71

(1) Väinölä & Hvilsom, 1991; (2) Bulnheim & Gosling, 1988; (3) Skibinski *et al.*, 1980; (4) Grant & Cherry, 1985; (5) Quesada *et al.*, 1995; (6) Blot *et al.*, 1988; (7) Gosling, 1992b; (8) Sanjuan *et al.*, 1997; (9) Wenne & Skibinski, 1995; (10) Beynon & Skibinski, 1996; (11) presente estudio; *M.e*, *M. edulis*; *M.e**, *M. edulis* de las costas europeas; *M.e*#, *M. edulis* de la costa atlántica americana; *M.g*, *M. galloprovincialis*; *M.g**, *M. galloprovincialis* de las costas europeas; *M.g*#, *M. galloprovincialis* del Mar Mediterráneo; *M.t*, *M. trossulus*; *M.t**, *M. trossulus* del Mar Báltico; *M.ch*, *M. chilensis*.

La segunda consideración es que los valores de las distancias obtenidas en este estudio son del orden de las estimadas por Wenne & Skibinski (1995), mediante el análisis del ADNmt, y de las obtenidas por Bulnheim & Gosling (1988) con marcadores alozímicos, excepto para las poblaciones de *M. edulis* y las de *M. trossulus* del Mar Báltico (TABLA XXIII). Análogamente, si de forma general se comparan las distancias obtenidas en este estudio con las que se pueden estimar a partir de las frecuencias génicas que figuran en el trabajo de Gosling (1992b) entre grupos de poblaciones, los resultados son muy similares, excepto cuando se incluyen en el análisis las poblaciones del Mar Báltico. Esto se debe, principalmente, a que en la población de Öland I. hemos detectado frecuencias elevadas de alelos característicos de *M. edulis*. Por otro lado, existen importantes diferencias a nivel cromosómico entre los mejillones *M. trossulus* del

Mar Báltico y los de Esquimalt L. (Martínez-Lage *et al.*, 1997), variando totalmente la posición de sus *loci* ribosomales (González-Tizón *et al.*, 2000) como se puede observar en las TABLAS II y III, respectivamente. En este sentido, los análisis del ADNmt han revelado la existencia de una mayor proximidad entre *M. trossulus* del Mar Báltico y *M. edulis* que entre *M. edulis* y *M. galloprovincialis* (Wenne & Skibinski, 1995; Rawson & Hilbish, 1998). Teniendo en cuenta todos estos resultados podemos sugerir que las poblaciones del Mar Báltico deberían ser consideradas como *M. edulis*.

En cuanto a la población de I. Man, la distancia genética media en relación a las restantes poblaciones de *M. edulis* es de 0.329 y con las poblaciones de *M. galloprovincialis* es de 0.510. Estas distancias y la presencia de alelos característicos de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* apoyan la condición híbrida de dicha población. Por otro lado, se trata de la población que presenta un mayor polimorfismo en todos los *loci* analizados, así como el mayor número de desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg.

Así, excluyendo las poblaciones de P. Aguirre, I. Man y Öland I., se pueden diferenciar las tres especies del "complejo *M. edulis*" utilizando el marcador Glu-5', ya que aunque no es diagnóstico, tal y como señalaron Rawson *et al.* (1996), se cumple que las poblaciones de *M. edulis* amplifican al menos un fragmento de 350pb o de 380pb, las de *M. galloprovincialis* de 300pb y las de *M. trossulus* de 240pb o de 550pb. De la misma forma, el marcador NRPP permite diferenciar las tres especies excluyendo las mismas poblaciones, ya que los individuos de *M. edulis* son homocigóticos para el alelo de 180pb, los de *M. galloprovincialis* lo son para el de 168pb y los de *M. trossulus* presentan el alelo de 126pb o el de 220pb.

5.2. ADN SATÉLITE *Apa I* DE MEJILLÓN

Los ADN satélites son secuencias repetidas en tándem, localizadas generalmente en regiones de heterocromatina de cromosomas eucariotas, que muestran gran variabilidad en la secuencia, frecuencia de reiteración y distribución cromosómica, incluso entre especies próximamente relacionadas. Aunque su función todavía no está clara, se han utilizado en estudios filogenéticos, ya que suelen mostrar una homogeneidad intraespecífica muy alta, mientras la variabilidad interespecífica aumenta en función directa con la distancia filética.

Los estudios comparativos de secuencias ADN satélite son numerosos en vertebrados, pero menos comunes en invertebrados. En moluscos bivalvos la posible presencia y las características de secuencias ADN satélite solamente han sido estudiadas en cinco especies: la ostra *Crassostrea gigas* (McLean & Whiteley, 1973; Clabby *et al.*, 1996), el mejillón *Mytilus edulis* (Ruiz-Lara *et al.*, 1992; Ruiz-Lara, 1993), la coquina *Donax trunculus* (Plohl & Cornudella, 1996, 1997) y los pectínidos *Argopecten irradians* (Estabrooks, 1999) y *Adamussium colbecki* (Canapa *et al.*, 2000). Además, no se han realizado estudios relacionados con la posible evolución de este tipo de secuencias en varias especies de moluscos. En este sentido, con el fin de conocer diversos aspectos de estas secuencias, tales como la frecuencia de reiteración, su distribución cromosómica y los posibles procesos mutacionales y evolutivos que actúan sobre las mismas, hemos secuenciado los tres tipos de ADN satélite, descritos en la especie *M. edulis*, en cinco especies del género *Mytilus* y en la especie *P. canaliculus*.

5.2.1. Características generales

Las secuencias de los clones en las cinco especies analizadas del género *Mytilus* tienen una longitud de monómero de 173pb, 161pb y 167pb para los satélites tipo I, tipo II y tipo III, respectivamente. Las diferencias predominantes entre ellas se deben a sustituciones nucleotídicas, excepto en algunos casos en los que existen deleciones y/o inserciones, como en algunos clones de *M. chilensis* y *M. californianus* para las secuencias tipo I, de *M. trossulus* para las tipo II y de *M. galloprovincialis* para las tipo III. Estos resultados coinciden con los descritos para *M. edulis* por Ruiz-Lara *et al.* (1992) y Ruiz-Lara (1993), así como para otros moluscos (Clabby *et al.*, 1996; Plohl & Cornudella, 1996; Muchmore *et al.*, 1998; Estabrooks, 1999; Canapa *et al.*, 2000).

El contenido de A+T de estos tres tipos de secuencias en las cinco especies analizadas del género *Mytilus* es de alrededor del 55% en los satélites tipo I y tipo III y algo mayor en el satélite tipo II, llegando al 65%. Estos valores son ligeramente superiores a los obtenidos por Ruiz-Lara (1993) en la especie *M. edulis*, del orden de lo observado en otros moluscos, como *C. gigas* (Clabby *et al.*, 1996) y *Tapes philippinarum* (Passamonti, 1996), y relativamente bajo comparado con el del ADN satélite descrito en *Adamussium colbecki* (Canapa *et al.*, 2000).

La presencia de series cortas de adeninas y/o timinas espaciadas periódicamente en la secuencia de un ADN satélite sugiere que éstas son responsables de la curvatura de las moléculas

de ADN (Koo *et al.*, 1986; Martínez-Balbás *et al.*, 1990), siendo necesarias al menos tres adeninas seguidas para introducir una torsión en la hélice de ADN (Koo *et al.*, 1986). En los tres tipos de ADN satélite *Apa I* el conjunto de bases A+T se disponen aisladamente o en grupos, pero su distribución no es continua ni periódica a lo largo de las secuencias. Esto sugiere que es poco probable que sean capaces de inducir curvatura, debido a la diferente disposición que presentan estas bases en relación a la observada en algunos ADN satélites (Radic *et al.*, 1987; Martínez-Balbás *et al.*, 1990; Ruíz-Lara *et al.*, 1992), y aunque se ha detectado un retraso electroforético de estas secuencias, existen casos como el de *Tribolium confusum*, en el que se observa retraso electroforético pero no presenta dicha curvatura (Plohl *et al.*, 1993).

La fracción de estos tres tipos de ADN satélite varía ligeramente entre las especies analizadas, siendo para las secuencias tipo I del 0.60% del genoma aproximadamente, excepto para *M. californianus* que es menor del 0.10%. Las secuencias tipo II constituyen, en general, alrededor del 1.30% del genoma, mientras que es del 0.85% en *M. californianus*. Las secuencias tipo III constituyen una fracción más pequeña del genoma de los mejillones del género *Mytilus*, siendo de aproximadamente el 0.018% en la mayoría de las especies analizadas, y algo más elevada (0.11%) en *M. trossulus* y *M. californianus* (TABLA XXII). En este último caso, hemos de señalar que la respuesta autorradiográfica obtenida, tanto en las hibridaciones Southern como Dot blot, era de menor intensidad en igualdad de condiciones de hibridación y exposición. Los valores obtenidos para las secuencias tipo I y tipo III son del orden de los observados en otras especies de moluscos bivalvos (Plohl y Cornudella, 1996; Canapa *et al.*, 2000) y, aunque los de las tipo II son más elevados, contrastan con otros satélites que se hallan en mayores proporciones genómicas, incluso superiores al 50% del genoma, como en el coleóptero *Tenebrio molitor* (Plohl *et al.*, 1992), o al 30% en el caso del cangrejo ermitaño (Fowler & Skinner, 1985).

Por otro lado, mediante hibridación Dot blot hemos detectado la ausencia de señal en la población de *P. canaliculus* (Golden B.) con los tres tipos de ADN repetitivo, lo cual indica que estas secuencias podrían constituir una pequeña fracción del genoma de dicha especie, considerándose por ello secuencias de bajo número de copia (<10 copias).

La unidad repetitiva y la organización en tándem de un ADN satélite se pueden revelar mediante digestión con endonucleasas de restricción. La presencia periódica de dianas específicas en una unidad típica de repetición convierte la organización en tándem en un conjunto de fragmentos que son múltiplos del monómero (digestión tipo "A"; Hörz & Zachan, 1977; Singer, 1982). La ausencia de dianas puede ocurrir ocasionalmente, debido a la variación

de la secuencia, dando lugar a patrones de digestión en los que predominan los fragmentos de gran longitud (digestión tipo "B"; Singer, 1982). Las alteraciones de las dianas de restricción pueden estar: (1) dispersas al azar entre las copias de una unidad repetitiva, (2) agrupadas dentro de repeticiones vecinas ó (3) encontrarse en intervalos regulares a lo largo de las repeticiones. La técnica de hibridación Southern blot informa sobre la organización y la disposición de las diferentes unidades variables de un ADN satélite, de acuerdo a los patrones de restricción e hibridación que, para diferentes enzimas, muestra dicho ADN satélite (Singer, 1982; Plohl *et al.*, 1992). Los patrones de bandas compuestos por la unidad monomérica y multímeros de ésta son característicos de la organización en tándem de unidades repetitivas. En nuestro análisis, estos patrones se observan en la digestión del ADN genómico con las endonucleasas *Dra I* y *Taq I*, en el caso de las secuencias tipo I, y en la digestión con *Dra I* en las tipo II, para las especies *M. edulis*, *M. chilensis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*. En cuanto a la distribución y localización cromosómica de los tres tipos de ADN satélite en *M. galloprovincialis* (Balcobo), *M. edulis* (Yerseke) y *M. trossulus* (Esquimalt L.), se ha podido comprobar mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) que las secuencias tipo I se encuentran distribuidas en, al menos, nueve *clusters*. Estos se localizan a nivel intercalar y, en algún caso, en regiones próximas a los telómeros (FIGURA 43A). Las secuencias tipo II se encuentran en *clusters* distribuidos por todos los cromosomas de forma longitudinal, sin estar localizados en regiones cromosómicas concretas (FIGURA 43B), coincidiendo con lo observado en algunos satélites, como en el ADN satélite inserción-1711B del oryx y otros ADN satélites de antílopes (Modi *et al.*, 1996). Las señales de hibridación de las secuencias tipo III en *M. edulis* y *M. galloprovincialis* son bastante débiles, debido a que constituyen una fracción pequeña del genoma de estas especies. Estas secuencias únicamente se localizan en, al menos, tres pares cromosómicos y en regiones próximas al telómero (FIGURA 43C).

Los resultados de este trabajo confirman, en parte, los postulados por Ruíz-Lara (1993), para *M. edulis*, mediante el seguimiento de la cinética de liberación de los fragmentos repetitivos oligoméricos, producidos durante la restricción parcial de ADN genómico con *Apa I*. Este autor indicó que las secuencias tipo I están ordenadas en tándem, aunque no excluye la posibilidad de que algunos miembros aislados de este ADN repetitivo se encuentren dispersos formando parte de otras secuencias. Las secuencias tipo II podrían, al menos en parte, exhibir una distribución dispersa y las tipo III podrían encontrarse parcialmente en tándem y también dispersas en el ADN genómico.

5.2.2. Origen y Evolución

La existencia de repeticiones directas en las secuencias de un ADN satélite es un fenómeno común (Singer, 1982) y su presencia puede estar relacionada con el origen del mismo (Hörz & Altenburger, 1981). Se han descrito algunos ADN satélites en ratones (Hörz & Altenburger, 1981; Singer, 1982) y peces (Wright, 1989; Garrido-Ramos *et al.*, 1995), cuyas unidades monoméricas actuales se han originado a partir de ciclos de amplificación y divergencia de una secuencia ancestral de 9pb. La existencia de una repetición corta en una secuencia monomérica de un ADN satélite, que se repite de forma directa de 3 a 4 veces y en las mismas posiciones, sugiere que la unidad monomérica actual se ha originado a partir de la amplificación de dicho motivo o de una secuencia que lo contenía. La amplificación puede haber ocurrido a través de mecanismos como la duplicación en tándem o posiblemente mediante la replicación *slippage* (Levinson & Gutman, 1987).

El análisis de estos tres tipos de secuencias ha revelado la existencia de repeticiones directas e inversas en todas las especies analizadas, incluyendo *P. canaliculus* (FIGURAS 12 a 17). En las tipo I se observan diferentes repeticiones directas de 6-7 nucleótidos (FIGURA 18), estando las repeticiones 1 a 4 presentes en todas las especies, excepto en *M. californianus* la cual tiene otras repeticiones diferentes (FIGURA 15). Las secuencias tipo II presentan repeticiones directas de 5-7 nucleótidos, aunque únicamente la repetición 1 se encuentra en todas las especies (FIGURA 21). La repetición 2 se observa en todas excepto en *M. galloprovincialis*, y la repetición 4 también está presente en todas excepto en *M. californianus*. En las secuencias tipo III, las repeticiones directas son de 6-7 nucleótidos y únicamente la repetición directa 4 se encuentra en todas las especies (FIGURA 24).

En los tres tipos de ADN satélite *Apa I* se observan diferentes repeticiones directas cortas, localizadas en las mismas posiciones y distribuidas a lo largo de toda la secuencia en la que se encuentran repetidas dos veces. Sin embargo, la comparación entre todas las unidades monoméricas no revela la existencia de una región particular de similitud significativa que pudiese representar un potencial motivo ancestral.

Las repeticiones inversas 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). Las repeticiones inversas largas y las secuencias palindrómicas tienen capacidad de formar estructuras secundarias de tipo cruciforme, como estructuras en horquilla (*hairpin*),

cuando las repeticiones inversas son adyacentes, o estructuras de tallo-bucle (*stem loop*), si están separadas (Lewin, 2000). Por otro lado, las repeticiones inversas no adyacentes parecen estar relacionadas con la amplificación del ADN satélite (Oshima *et al.*, 1992). Como ya hemos mencionado, se han observado varias repeticiones inversas en los tres tipos de ADN satélite (FIGURAS 12 a 16), las cuales se caracterizan por ser cortas (5-7 nucleótidos) y poco significativas. En el satélite tipo I sólo la repetición inversa 1 está presente en todas las especies analizadas y se encuentra tres veces repetida en las consenso de *M. edulis*, *M. chilensis* y *M. trossulus*. En las tipo II, también se observan varias repeticiones inversas a lo largo de la secuencia pero sólo la inversión 1 está presente en todas las especies analizadas. Finalmente, en las tipo III las inversiones 1 y 3 se encuentran presentes en todas las especies. Por otro lado, estas repeticiones también se han detectado en *P. canaliculus*, existiendo una nueva repetición inversa (inversión 7) que se encuentra tres veces en la secuencia tipo I. De todas las repeticiones invertidas observadas en los tres tipos de secuencias analizadas, algunas de ellas muestran capacidad potencial para formar estructuras secundarias tipo horquilla y de tallo-bucle, tal y como observó Ruíz-Lara (1993).

Por otro lado, se cree que las repeticiones directas se generan mediante la duplicación de sitios diana durante la inserción de elementos transponibles (Kleckner, 1981), de manera que su presencia puede sugerir la implicación de la transposición en la amplificación de estas repeticiones. Las regiones de simplicidad críptica, que son una característica general de los ADN satélites y se cree que son responsables de la amplificación y divergencia de los *arrays*, están ausentes en nuestras secuencias. Una pérdida similar de subestructuras internas también se ha encontrado en las repeticiones de otras especies (Denovan & Wright, 1990), incluyendo los moluscos *M. edulis* (Ruíz-Lara *et al.*, 1992) y *C. gigas* (Clabby *et al.*, 1996).

Estos tres tipos de ADN satélite contienen secuencias de gran semejanza con las cajas A y B que constituyen el promotor interno partido de los genes para el ARNt así como de sus pseudogenes procesados (FIGURAS 18, 21 y 24). El grado de homología encontrado entre las secuencias tipo I y tipo III y las cajas A y B mencionadas es, en general, del 63.6%, aunque superior con la caja B que con la A. En las secuencias tipo II las homologías son más variables siendo del 45.5% con la caja A y del 81.8% con la B. La separación entre los tramos de secuencias homólogas a dichas cajas observados en los tres tipos de secuencias está dentro del rango descrito, el cual oscila entre 25 a 60pb (Singer & Berg, 1991). Todas las características

observadas en estos tres tipos de secuencias podrían indicar que en la amplificación de éstas estuviesen implicados mecanismos de transposición.

Diversos estudios sobre secuencias repetitivas en diferentes especies han mostrado una elevada homogeneidad intraespecífica con respecto a la secuencia nucleotídica y longitud entre todas las copias de una familia de ADN altamente repetido. Al cuantificar la variabilidad intraespecífica de los tres tipos de ADN satélite en las cinco especies analizadas, se observa un elevado grado de homología entre las distintas unidades monoméricas dentro de cada especie. En la TABLA XXIV se muestra la variabilidad intraespecífica para cada especie, medida como diversidad nucleotídica, de los tres tipos de ADN satélite *Apa I*. En las secuencias tipo I y tipo II, la variación media en las cinco especies analizadas es, aproximadamente, del 5%. Sin embargo, los valores más altos de variabilidad intraespecífica, llegando a ser de alrededor del 8%, se detectan en las secuencias tipo III para las especies *M. chilensis*, *M. galloprovincialis* y *M. californianus*. En general, estos valores son semejantes a los observados en *M. edulis* (Ruíz-Lara *et al.*, 1992) y en *Adamussium colbecki* (Canapa *et al.*, 2000), cuya variabilidad está en torno al 5%; así como los observados en otros ADN satélites que muestran valores de variabilidad intraespecífica muy bajos, como es el caso del ADN satélite de *Drosophila melanogaster* (Hsieh & Brutlag, 1979) con un 3.6% de variabilidad, de los ADN satélites de tenébridos con niveles de variabilidad por debajo del 3% (Ugarkovic *et al.*, 1995; Pons *et al.*, 1997) o del ADN satélite de *Apis mellifera* con una variabilidad del 1.4% (Tares *et al.*, 1993). Sin embargo, nuestros datos contrastan con los elevados niveles de variabilidad intraespecífica observados en otros ADN satélites, como el de la ostra *Crassostrea gigas*, cuyos monómeros difieren en su secuencia hasta un 21% (Clabby *et al.*, 1996) o el de la mosca tse-tse con una variabilidad de hasta un 30% (Trick & Dover, 1984).

TABLA XXIV

Diversidad nucleotídica de los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I* en cinco especies de mejillón

	VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA		
	SATÉLITE I	SATÉLITE II	SATÉLITE III
<i>M. edulis</i>	0.021	0.038	0
<i>M. chilensis</i>	0.042	0.051	0.083
<i>M. galloprovincialis</i>	0.038	0.068	0.070
<i>M. trossulus</i>	0.026	0.026	0.021
<i>M. californianus</i>	0.055	-	0.087

La divergencia interespecífica para los tres tipos de ADN satélite *Apa I* se muestra en las TABLAS XXV y XXVI. En las secuencias tipo I, *M. californianus* presentan un grado de divergencia bastante elevado (0.628) con respecto a las demás especies. Sin embargo, la divergencia en el resto de especies varía entre 0.024 y 0.065. En las tipo II, los mayores valores de divergencia también los muestra *M. californianus* con respecto a las demás especies, aunque son considerablemente menores que los observados en las tipo I. La divergencia entre las especies restantes oscila entre 0.040 y 0.048, aunque *M. galloprovincialis* presenta valores de divergencia más elevados que en las tipo I (0.103). En las secuencias tipo III, la mayor divergencia interespecífica se observa en *M. californianus*, con un valor promedio del 0.148, y en el resto de especies varía entre 0.050 y 0.075.

TABLA XXV

Diversidad nucleotídica de las secuencias tipo I y tipo II entre las diferentes especies de mejillón

SAT.I \ SAT.II	<i>M. edulis</i>	<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. trossulus</i>	<i>M. californianus</i>
<i>M. edulis</i>	-	0.056	0.052	0.024	0.628
<i>M. chilensis</i>	0.045	-	0.047	0.063	0.629
<i>M. galloprovincialis</i>	0.105	0.108	-	0.065	0.632
<i>M. trossulus</i>	0.040	0.048	0.097	-	0.624
<i>M. californianus</i>	0.238	0.229	0.268	0.238	-

TABLA XXVI

Diversidad nucleotídica de las secuencias tipo III entre las diferentes especies de mejillón

SAT. III	<i>M. edulis</i>	<i>M. chilensis</i>	<i>M. galloprovincialis</i>	<i>M. trossulus</i>	<i>M. californianus</i>
<i>M. edulis</i>	-	0.062	0.056	0.050	0.133
<i>M. chilensis</i>		-	0.075	0.067	0.162
<i>M. galloprovincialis</i>			-	0.067	0.159
<i>M. trossulus</i>				-	0.139
<i>M. californianus</i>					-

La comparación de la variabilidad intraespecífica (TABLA XXIV) con la divergencia interespecífica (TABLAS XXV y XXVI) para los tres tipos de ADN satélite *Apa I*, demuestra que dichas secuencias evolucionan de manera concertada, ya que en general la primera es menor que la segunda. Sin embargo, existen dos excepciones, las secuencias tipo III de *M. chilensis* y de *M. galloprovincialis*, en las que la variabilidad intraespecífica es mayor que la divergencia interespecífica. Esto se explica si se tiene en cuenta que los sitios variables en los monómeros de una especie pueden ser sitios en estado de transición en el proceso de fijación de los mismos. Por lo que al no estar totalmente homogeneizados y fijados en cada especie, posiblemente no se ven reflejados en la secuencia consenso y, por tanto, no serán analizados como sitios variables entre las dos especies que se comparan, dando lugar a una menor divergencia interespecífica.

En la comparación de todos los clones secuenciados para el **satélite tipo I** se observa una divergencia elevada de los pertenecientes a *M. californianus* con respecto al resto de especies, incluso mayor que la de *P. canaliculus*, debido a la presencia de alrededor de 100 sitios variables (TABLA XII). En el resto de los clones analizados para este tipo de secuencias, el 93.9% de las diferencias son debidas a sustituciones nucleotídicas, mientras que las demás son cambios por inserción de 1 nucleótido. Dichas sustituciones muestran tendencia a acumularse en ciertas posiciones o regiones específicas de las secuencias. Así, muchas de las posiciones con múltiples variantes tienden a encontrarse en tramos cortos de 12 nucleótidos (posiciones 71 a 82 y 131 a 143) o en las posiciones 103 y 119 (FIGURA 18). Los patrones de sustitución nucleotídica a nivel intraespecífico varían según la especie, oscilando entre una relación transiciones/transversiones (ns/nt) de 1.67 en *M. trossulus* y de 0.29 en *M. chilensis* y *M. californianus*. Por lo que respecta a *M. edulis* y *M. galloprovincialis* los valores de este coeficiente indican que las transiciones son más frecuentes que las transversiones. En cuanto a la relación ns/nt a nivel interespecífico, en

general, se observan valores mayores de 1, excepto en el caso de *M. californianus*, cuyos coeficientes varían entre 0.80 y 0.92 respecto al resto de clones (TABLA XII).

Análogamente, las distancias de Kimura estimadas para las secuencias tipo I entre clones de una misma especie son generalmente menores que entre clones de distintas especies, siendo los más próximos los de *M. edulis* y *M. trossulus* y los más alejados los de *M. californianus* con respecto al resto (TABLA XIII). Las diferencias observadas entre las secuencias de *M. californianus* y el resto de especies, se visualizan de una forma más clara en los árboles filogenéticos de las FIGURAS 19 y 20. Ambos métodos de inferencia agrupan las secuencias monoméricas de *M. californianus* en un *cluster* soportado por un valor de *bootstrap* muy elevado, mientras que el resto de especies se agrupan de diferente forma. Así, en el árbol Neighbor-Joining (FIGURA 19) se observa una relación más directa entre los clones de *M. edulis* y *M. trossulus* por un lado y los de *M. galloprovincialis* y los de *M. chilensis* por otro. Estas dos últimas especies están en un único *cluster* en el árbol de máxima parsimonia (FIGURA 20), aunque el valor de *bootstrap* es menor de 500.

En el **satélite tipo II**, las sustituciones nucleotídicas son las desviaciones predominantes (86.1%), mientras que las inserciones y deleciones resultan escasas (8.3% y 5.6%, respectivamente). Al igual que en las secuencias tipo I, en las tipo II las sustituciones múltiples parecen agruparse en ciertas zonas de la secuencia, encontrándose múltiples variantes entre las posiciones 116 a 128 y 132 a 145, así como en las posiciones 32, 54 y 94. Esta afirmación también es válida para las deleciones, las cuales se limitan a las posiciones 1, 81 y 141 (FIGURA 21). De todos los clones analizados para este tipo de secuencias, el de *M. californianus* es también el más divergente presentando alrededor de 35 sitios variables con respecto a los demás (TABLA XIV). La relación ns/nt tiene un valor intraespecífico que varía según la especie siendo de 1.50 para *M. edulis*, de 1.08 para *M. chilensis*, de 0.84 para *M. galloprovincialis*, de 1.25 para *M. trossulus* y de 1.04 para *M. californianus*. El valor medio de dicha relación a nivel interespecífico es de aproximadamente 1 entre todos los clones, exceptuando, de nuevo, el clon de *M. californianus* cuya relación varía entre 0.64 y 0.86 (TABLA XIV).

Las distancias de Kimura estimadas para las secuencias tipo II son generalmente menores a nivel intraespecífico que entre clones de distintas especies, siendo las más próximas las pertenecientes a las especies *M. edulis* y *M. trossulus* y la más alejada la de *M. californianus* con respecto al resto de especies. Estos resultados coinciden con lo observado en las secuencias tipo I, aunque a diferencia de éstas las distancias entre los clones de *M. galloprovincialis* y el resto de

especies son mayores en las tipo II y, sin embargo, las distancias entre el clon de *M. californianus* con el resto de clones son menores que las obtenidas previamente para las tipo I (TABLA XV). Sin embargo, las secuencias de una misma especie están más relacionadas que en el caso de las tipo I, como se puede observar en el árbol obtenido para este tipo de ADN satélite aplicando el algoritmo Neighbor-Joining (FIGURA 22). Así, los clones de *M. galloprovincialis* están agrupados en un *cluster* soportado por un valor de *bootstrap* muy elevado y los clones de *M. edulis* y *M. trossulus* en otro, si bien el valor de *bootstrap* para éste es menor de 500. El árbol de máxima parsimonia (FIGURA 23) muestra que los clones de *M. galloprovincialis* están agrupados en un *cluster* soportado por un nivel de confianza elevado; sin embargo, los clones de *M. edulis*, *M. chilensis* y *M. trossulus* no se agrupan en *clusters* perfectamente definidos

Al igual que en las secuencias anteriores, las mutaciones más frecuentes en el **satélite tipo III** son las sustituciones nucleotídicas (92.1%), observándose también algunas deleciones. Sin embargo, en este caso las sustituciones múltiples están esparcidas por toda la secuencia, no encontrándose agrupadas en regiones específicas (FIGURA 24). Los clones de *M. californianus* también son los más divergentes con respecto al resto de especies, aunque el número de sitios variables es de aproximadamente 26 (TABLA XVI). Para este tipo de secuencias la relación ns/nt oscila entre 0.71 para *M. chilensis*, 0.31 para *M. galloprovincialis* y 0 para *M. trossulus*. A nivel interespecífico, dicha relación es en general menor que 1 y, a diferencia de los análisis anteriores, no existen diferencias entre los coeficientes de los clones de *M. californianus* con respecto al resto (TABLA XVI).

En el caso de las secuencias tipo III, las distancias de Kimura entre clones de una misma especie, en general, no son inferiores a las observadas a nivel interespecífico. Además, las distancias entre los clones de *M. californianus* y el resto de especies son menores que las observadas tanto para las secuencias tipo I como para las tipo II (TABLA XVII). Al igual que en los satélites anteriores, observamos que con ambos métodos de inferencia filogenética las secuencias monoméricas de *M. californianus* se encuentran en un *cluster* soportado por un valor de *bootstrap* muy elevado, aunque el resto de especies se agrupan de distinta forma. Así, en el árbol Neighbor-Joining obtenido para las secuencias tipo III (FIGURA 25) los clones de *M. trossulus* se localizan en un *cluster* cuyo valor de *bootstrap* es menor que en el caso anterior. El resto de clones pertenecientes a *M. edulis*, *M. chilensis* y *M. galloprovincialis* están agrupados en *clusters* cuyos niveles de confianza son menores que en los análisis anteriores. Sin embargo, en el árbol generado por el principio de máxima parsimonia (FIGURA 26) se pueden observar unos

coeficientes de confianza elevados en los nodos que soportan los *clusters* de los clones de *M. californianus*, *M. edulis* y *M. trossulus*.

En general, en los tres tipos de secuencias satélite, algunas de las alteraciones observadas parecen no ser aleatorias. La especificidad de reemplazamiento de bases en determinadas regiones, sugiere que podría existir un mecanismo que estaría actuando sobre las secuencias, el cual dirigiría las mutaciones a ciertas regiones predeterminadas. Así, los mismos cambios nucleotídicos que se pueden encontrar en posiciones definidas en varios clones, probablemente no son el resultado de sucesos mutacionales independientes, sino que se deben a procesos de dispersión de nuevas variantes de la secuencia. En estudios previos, se ha sugerido que el compartido de subconjuntos de mutaciones entre variantes de secuencias es consecuencia de homogeneizaciones parciales promovidas por mecanismos de conversión génica (Drouin & Dover, 1990). Algunas mutaciones en particular, aparecen limitadas a un mismo grupo de variantes monoméricas, circunstancia que repercute en su homología recíproca y en la desviación del resto de clones. En este sentido, Dover (1993) propuso que los episodios de conversión génica afectan a regiones que contienen mutaciones agrupadas, ya sean de pocos pb o bien extendiéndose a lo largo de varias kb.

Diversos estudios han sugerido que durante la evolución de los ADN satélites las transiciones C a T y G a A son más frecuentes que las transiciones inversas, produciendo un enriquecimiento en el contenido A+T de estas secuencias (Ugarkovic *et al.*, 1989; Rojas-Rousse *et al.*, 1993). En este sentido, se sabe que aunque la posibilidad de cambio transicional (4 tipos de sustituciones nucleotídicas) es mayor que la de cambio por transversión (8 tipos de sustituciones distintas), la probabilidad de sustituciones por transición es mayor que la de cambios por transversión (Nei, 1987), aumentando dicha probabilidad en secuencias no codificantes (Li *et al.*, 1984). Un sesgo en el número de transiciones frente al de transversiones (relación transiciones/transversiones próxima a 2) indica una divergencia reciente de los taxones que se comparan, mientras que una relación transiciones/transversiones de 0.4 es indicativa de secuencias cuyos niveles de sustitución están muy saturados, apuntando a una mayor divergencia entre las especies que se comparan (Holmquist, 1983). La relación transiciones/transversiones por lo general es más elevada para las secuencias tipo I, después para las tipo II y finalmente para las tipo III. Estos valores podrían indicar una mayor antigüedad de las secuencias tipo III con respecto a las tipo II y tipo I, siendo estas últimas las que presentan una divergencia reciente. Sin embargo, esto contrasta en cierta medida con los resultados obtenidos mediante FISH, ya que

según el modelo evolutivo de McGregor & Sessions (1986) la localización de un ADN satélite a nivel intercalar en unos pocos cromosomas podría indicar que su origen es reciente y que los mecanismos de expansión entre todos los cromosomas del cariotipo están en fase de progresión. De acuerdo con este modelo, los ADN satélites más recientes estarían próximos al centrómero y los más antiguos próximos a los telómeros; por lo que el satélite tipo I sería más reciente que el tipo II.

Por otro lado, en *Perna canaliculus* hemos obtenido un fragmento de 220pb (FIGURA 17D) al secuenciar el producto de amplificación resultante tras utilizar los *primers* diseñados para el satélite tipo II de *Mytilus*. Dicha secuencia es rica en AT (65.8%) y contiene seis repeticiones directas perfectas de 6 nucleótidos y tres repeticiones inversas de 5-8 nucleótidos. Como se puede observar en la FIGURA 17D, la secuencia nucleotídica marcada en negrita corresponde a los nucleótidos comprendidos entre las posiciones 32 y 161 de la unidad monomérica tipo II, siendo el resto de la secuencia relativamente similar a las posiciones 32 a 143; por lo que podría haberse originado como una duplicación de los nucleótidos.

5.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y ORIGEN DEL GÉNERO *Mytilus*

El análisis de las relaciones filogenéticas de mejillón se realizó utilizando las secuencias consenso de los tres tipos de ADN repetitivo de las seis especies analizadas. Sin embargo, los datos de secuenciación del ADN satélite hay que manejarlos con precaución, conociendo y teniendo en cuenta los mecanismos que intervienen en su evolución. Se puede inferir una filogenia a partir de secuencias consenso, pero puede ocurrir que la divergencia entre dichas secuencias sea menor que la variabilidad intraespecífica. Por otro lado, cuando se comparan distintas unidades monoméricas de cada especie la existencia de sitios variables en una especie (estados de transición), puede llevar a la paradoja de que secuencias monoméricas de dos especies distintas presenten mayor identidad que cuando se comparan cada una con unidades de la misma especie (Adegoke *et al.*, 1993). Dado que la vida media de un ADN satélite supera la vida media de una especie (Harding *et al.*, 1992), puede ocurrir que la variabilidad exista ya en la especie ancestral a las especies que se analizan. En este caso, si el tiempo que hace que divergieron las especies que se comparan es relativamente reciente, o la homogeneización y fijación de las variantes es un proceso relativamente lento, puede darse la paradoja mencionada.

Así, las filogenias basadas en ADN satélite han de considerar no sólo las tasas de mutación, sino también las de homogeneización y fijación, distinguiendo entre sitios en estado de transición y sitios totalmente homogeneizados (Strachan *et al.*, 1985; Gretarsdottir & Arnason, 1992; Laursen *et al.*, 1992).

Cuando se analizan las relaciones entre las distintas secuencias monoméricas de cada especie, mediante métodos de inferencia filogenética, como el método del vecino más próximo y el de máxima parsimonia, se obtienen topologías confusas que agrupan las secuencias de una manera que no se corresponde con las especies que se comparan. Aunque por lo general, las secuencias monoméricas de una misma especie aparecen más íntimamente relacionadas entre ellas que con respecto a las demás especies, éstas no se localizan en un único *cluster*.

Como ya hemos mencionado, en los tres tipos de secuencias se observa una divergencia elevada entre las de *M. californianus* y el resto de especies de mejillón, incluso mayor que la de *P. canaliculus*. Si bien dicha divergencia es más elevada en las secuencias tipo I y menor en las tipo II y tipo III. Por el contrario, las distancias entre el resto de especies son mayores en las tipo III que en las tipo II y las tipo I.

En las secuencias tipo I y tipo II el árbol generado por máxima parsimonia es el que presenta mayores valores de *bootstrap* y en el caso de las tipo III ambos métodos de inferencia generan árboles cuyos niveles de confianza muestran valores relativamente elevados. Por otro lado, tanto si se comparan las consenso tipo I como las tipo II y con cualquiera de los métodos de inferencia filogenética empleados (árboles filogenéticos de las FIGURAS 28 y 30), se aprecia que las especies más emparentadas son *M. edulis* y *M. trossulus*. En la comparación de las secuencias tipo III, ambos métodos de inferencia muestran una mayor proximidad entre las especies *M. edulis*, *M. chilensis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*.

La familia Mytilidae se cree que evolucionó hace 350 millones de años, en el Devónico reciente, directamente de un linaje de la familia Modioloipsidae del Ordovícico (Soot-Ryen, 1955). En el Pérmico o Triásico reciente (hace aproximadamente 250 millones de años), fósiles identificados como mitiliformes (*Promytilus*) y modioliiformes (*Volsellina*) demarcaron la divergencia de las subfamilias Mytilinae y Modiolinae (Newell, 1969). Dentro de la subfamilia Mytilinae, se cree que las especies *Mytilus like* se han originado a partir del grupo Brachidontes durante el Jurásico reciente (hace 155 millones de años), en Panthalassa, y las especies de *Perna*

en el Eoceno reciente (Cox *et al.*, 1969). En particular la especie *P. canaliculus* se originó en el Mioceno temprano-Oligoceno, hace aproximadamente 25-30 millones de años (Fleming, 1979).

Los datos paleontológicos consideran a *M. edulis* la especie más ancestral dentro del género, aunque existe cierta controversia sobre su origen, el cual se sitúa según Soot-Ryen (1955) y Bernard (1983) entre el Plioceno-Mioceno, o según Cox *et al.* (1969) en el Plioceno. Los análisis de las secuencias consenso de los tres tipos de ADN satélite permiten observar que *M. californianus* es la especie más divergente del género, y, aunque hemos enraizado los árboles tomando como *outgroup* la especie *P. canaliculus* por pertenecer a otro género diferente, la divergencia de *M. californianus* con el resto de especies es incluso mayor que la observada entre éstas y *P. canaliculus*. En el caso del satélite tipo III, en el que las secuencias han divergido más y los árboles presentan los mayores valores de *bootstrap*, las especies *P. canaliculus* y *M. californianus* están perfectamente separadas del "complejo *M. edulis*". Además, esta mayor diferenciación de *M. californianus* se hace patente en la imposibilidad de amplificar mediante PCR las regiones PLIIa, CaM1, Glu-5' y NRPP debido a la elevada divergencia de estos fragmentos génicos. Por todo ello, sugerimos que la especie más antigua, de las que actualmente existen, sería *M. californianus* y no *M. edulis*. En este sentido, Kenchington *et al.* (1995) detectaron una mayor divergencia en la secuencia ADNr 18S de esta especie con respecto al resto, sugiriendo que se originó hace aproximadamente 25 ó 45 millones de años.

Por otro lado, los datos moleculares obtenidos por Kenchington *et al.* (1995) apoyan una separación de las especies del género *Mytilus* a mediados del Terciario. Utilizando una tasa evolutiva del 1% por 50 millones de años, tal y como se ha utilizado para los ARNr 16S, estos autores sugieren que el "complejo *M. edulis*" tendría entre 10 y 20 millones de años, y *Geukensia* (familia Modiolinae) divergiría de Mytilidae hace aproximadamente 150 millones de años. Sin embargo, las evidencias paleontológicas sitúan la divergencia de ambas subfamilias mucho antes, en 250 millones de años. La recalibración del reloj molecular, basándose en los datos de divergencia del ADNmt 16S, estima la tasa evolutiva en 0.6% por 50 millones de años, comparable con la tasa observada en vertebrados (Ochman & Wilson, 1987). Dicha tasa sitúa el origen del "complejo *M. edulis*" en 33 millones de años, en el Oligoceno tardío, lo cual es anterior a los registros fósiles disponibles (Bernard, 1983).

Vermeij (1991) postuló que el "complejo *M. edulis*" se originó en el Pacífico Norte durante el Eoceno reciente y, basándose en los datos electroforéticos de Varvio *et al.* (1988), que la especie ancestral es *M. trossulus*, de la cual posteriormente deriva *M. edulis* y, a su vez, de ésta

M. galloprovincialis. Las especies *M. trossulus* y *M. edulis* invadieron el Atlántico Norte desde el Pacífico (“invasión trans-Ártica”) cuando el estrecho de Bering se abrió, hace aproximadamente 3.5 millones de años, no divergiendo morfológicamente las poblaciones del Atlántico y el Pacífico hasta el punto en el que la discriminación de especies es posible (Vermeij, 1991). Los resultados obtenidos en este trabajo mediante polimorfismos de marcadores nucleares y secuencias ADN satélite, apoyan esta teoría ya que en general se observa un mayor agrupamiento entre las especies *M. edulis*, *M. chilensis* y *M. galloprovincialis* con respecto a *M. trossulus*. Esto coincide con diversos estudios basados en datos moleculares del ADN 18S (Geller *et al.*, 1993; Kenchington *et al.*, 1995; Adamkewicz *et al.*, 1997), y aunque *a priori* contradicen los datos paleontológicos de la mayor antigüedad de *M. edulis*, hay que tener en cuenta que la enorme plasticidad de las características morfológicas de la concha dificulta la diferenciación de las especies del “complejo *M. edulis*”, sobre todo en registros fósiles.

Se han descrito híbridos fértiles entre *M. trossulus*-*M. edulis* en áreas geográficas en las que ambas especies cohabitan simpátricamente (Saavedra *et al.*, 1996; Comesaña *et al.*, 1999). Sin embargo, a pesar de esto, ambas especies mantienen su integridad genética (Stewart *et al.*, 1995), lo cual se debe a las diferencias morfológicas de los cromosomas (Martínez-Lage *et al.*, 1997) que dificultan la aparición de híbridos. Nuestros resultados coinciden con el análisis del ADNmt realizado por Rawson & Hilbish (1998), quienes encontraron que la población de *M. trossulus* de la costa Oeste americana estaba muy separada de las otras poblaciones de mejillón que analizaron.

La separación entre *M. edulis* y *M. galloprovincialis* no se podría haber producido hace 1-2 millones de años, en el Pleistoceno, coincidiendo con la formación del Mar Mediterráneo como postularon Barsotti & Meluzzi (1968). Hay que destacar que el Pleistoceno y el Plioceno reciente se han caracterizado por la aparición de períodos de glaciación, con ciclos de 100000 años aproximadamente. Por ello, si la divergencia entre *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* es reciente (1-3.5 millones de años), durante los períodos de glaciación estas especies migrarían hacia los trópicos por debajo de los límites de las banquisas, facilitando la coexistencia en un mismo nicho ecológico y la hibridación entre ellas. Posteriormente, transcurrida la glaciación las especies colonizarían las zonas templadas de ambos hemisferios. Así, si la última glaciación se produjo aproximadamente hace 15000 años, durante el estadio isotópico 2, la colonización de la mayor parte de las poblaciones estudiadas se produciría desde esos momentos hasta la actualidad y, en particular, la población del Mar Báltico hace aproximadamente 8000 años cuando el Lago

Ancylus se abrió al mar. En este sentido, hay que tener en cuenta que durante dichos períodos el margen de la banquisa se extendía hasta el borde de la cornisa Cantábrica, dejando una distancia de unos 20m entre banquisa y costa, lo cual coincide exactamente con el área de distribución descrita por Comesaña & Sanjuan (1997) para *M. galloprovincialis*.

5.4. UTILIZACIÓN DE MARCADORES DE ADN EN LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES COMERCIALES DE MEJILLÓN

El incremento de la producción mundial de moluscos bivalvos en diferentes países ha producido una globalización del mercado. En el caso particular del mejillón, la normativa europea únicamente permite comercializar con el nombre de “mejillón” las especies *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. Sin embargo, durante los últimos años se ha constatado un incremento de las importaciones de especies afines, de menor calidad y valor comercial, no incluidas en la denominación comercial, como *M. chilensis*, *M. trossulus* y *P. canaliculus*. Esta situación hace necesario desarrollar técnicas analíticas que permitan una identificación clara de las especies que se comercializan. El sector productor gallego demanda la diferenciación del mejillón de las rías gallegas de los procedentes de otras regiones del mundo, con el fin de evitar el fraude en el etiquetado de otros moluscos bajo la denominación “mejillón gallego”. Por esta razón, en un intento de seleccionar los marcadores genéticos que permitan caracterizar, identificar y evaluar las especies que puedan ser comercializadas bajo el nombre común de “mejillón”, independientemente de su grado de manipulación, hemos analizado secuencias de copia única y de ADN satélite en diferentes poblaciones utilizando diversas técnicas.

Los resultados obtenidos en este trabajo a partir de la amplificación de las regiones Glu-5' y NRPP de la proteína polifenólica adhesiva del biso permiten diferenciar muestras de mejillones frescos y los congelados. Sin embargo, cuando éstas se encuentran enlatados o precocinados, los procesos de elaboración y esterilización del producto implican una degradación del ADN que impide utilizar estas amplificaciones en la diferenciación de especies. Como ya hemos citado anteriormente, para el *locus* Glu-5' los individuos *M. edulis* amplifican al menos un fragmento de 350pb o de 380pb, los de *M. galloprovincialis* de 300pb y los de *M. trossulus* de 240pb o de 550pb. Análogamente, el marcador NRPP permite diferenciar las tres especies, ya que los individuos *M. edulis* son homocigóticos para el alelo de 180pb, los de *M. galloprovincialis* son

homocigóticos para el de 168pb y los de *M. trossulus* presentan el alelo de 126pb o el de 220pb. En el caso de estos dos marcadores, las poblaciones de *M. chilensis* no se pueden diferenciar de *M. galloprovincialis*, debido a que los productos de amplificación son similares.

Por otro lado, se realizaron hibridaciones Southern blot con ADN genómico digerido con diferentes endonucleasas, así como amplificaciones por PCR de los tres tipos de secuencias, seguidas de la digestión con dichas enzimas. Los diferentes patrones de restricción obtenidos con la endonucleasa *Hae III* en las hibridaciones Southern blot de las secuencias tipo I de diferentes especies del G. *Mytilus* se deben a alteraciones puntuales en la secuencia de una unidad monomérica, las cuales se ponen de manifiesto tanto por la pérdida como por la ganancia de la diana de reconocimiento para dicha endonucleasa. Por otro lado, los patrones de bandas intermedias se puede explicar como resultado de la aparición de dianas de restricción adicionales debido a simples mutaciones puntuales en los monómeros satélite. Análogamente, la alteración de la diana de restricción de dicho enzima explica los patrones de digestión parcial obtenidos en las amplificaciones por PCR de este tipo de secuencias.

En las secuencias tipo I, las posiciones 103 y 119 presentan una elevada frecuencia de mutación entre los clones de todas las especies, alterando una de las dianas de *Msp I* y la diana de *Dra I*, respectivamente. Esto explica el patrón obtenido en la población de Balcobo, así como los obtenidos en las poblaciones de *M. edulis* y *M. trossulus*, al digerir completamente el ADN genómico con *Msp I* e hibridar con el inserto de las secuencias tipo I. De igual forma, se explican los patrones de digestión parcial obtenidos tras la digestión de los productos de PCR de este tipo de secuencias en las distintas especies. La distribución en “escalera” obtenida en todas las especies analizadas con *Dra I* también se produce por la alteración de la correspondiente diana.

En las secuencias tipo II, los clones secuenciados de *M. galloprovincialis* presentan una frecuencia de mutación elevada en la diana de *Dra I*, y los clones de *M. edulis* y *M. trossulus* en una de las dianas de *Hae III* (posición 160). Esto explica el patrón de digestión parcial y la distribución en “escalera” obtenidos en todas las poblaciones analizadas al digerir completamente el ADN genómico con las endonucleasas *Hae III* y *Dra I*, respectivamente, e hibridar con el inserto de las secuencias tipo II. Igualmente se explican los patrones de digestión parcial obtenidos tras la digestión de los productos de PCR de este tipo de secuencias en las diferentes especies analizadas.

Los clones de las secuencias tipo III de *M. edulis* y *M. trossulus* presentan una frecuencia de mutación elevada en la diana de *Hae III* (posición 166). Esto explica el patrón obtenido en las diferentes especies al digerir completamente el ADN genómico con este enzima e hibridar con el inserto de las secuencias tipo III. Análogamente, se explican los patrones obtenidos tras la digestión de los productos de PCR de este tipo de secuencias en las diferentes poblaciones.

Los patrones de restricción obtenidos con los tres tipos de ADN satélite, mediante hibridación Southern blot y amplificación por PCR no nos permiten diferenciar las especies analizadas. Inicialmente, en las hibridaciones con las secuencias tipo I de ADN digerido con *Hae III* observamos dos patrones que nos permiten diferenciar las poblaciones de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* de las de *M. chilensis* y *M. trossulus*. Sin embargo, al analizar un mayor número de individuos de dichas poblaciones mediante la digestión del producto de PCR, obtenemos una respuesta más heterogénea. En las restantes hibridaciones Southern blot hemos observado el mismo patrón en todas las poblaciones analizadas. Análogamente, el análisis realizado mediante PCR únicamente nos permite diferenciar la especie *M. galloprovincialis* de *M. edulis*, ya que la amplificación de las secuencias tipo I y la posterior digestión con la endonucleasa *Msp I* produce un patrón de digestión total en la mayoría de los individuos *M. galloprovincialis*, mientras que la respuesta más frecuente en el resto de especies analizadas es la digestión parcial.

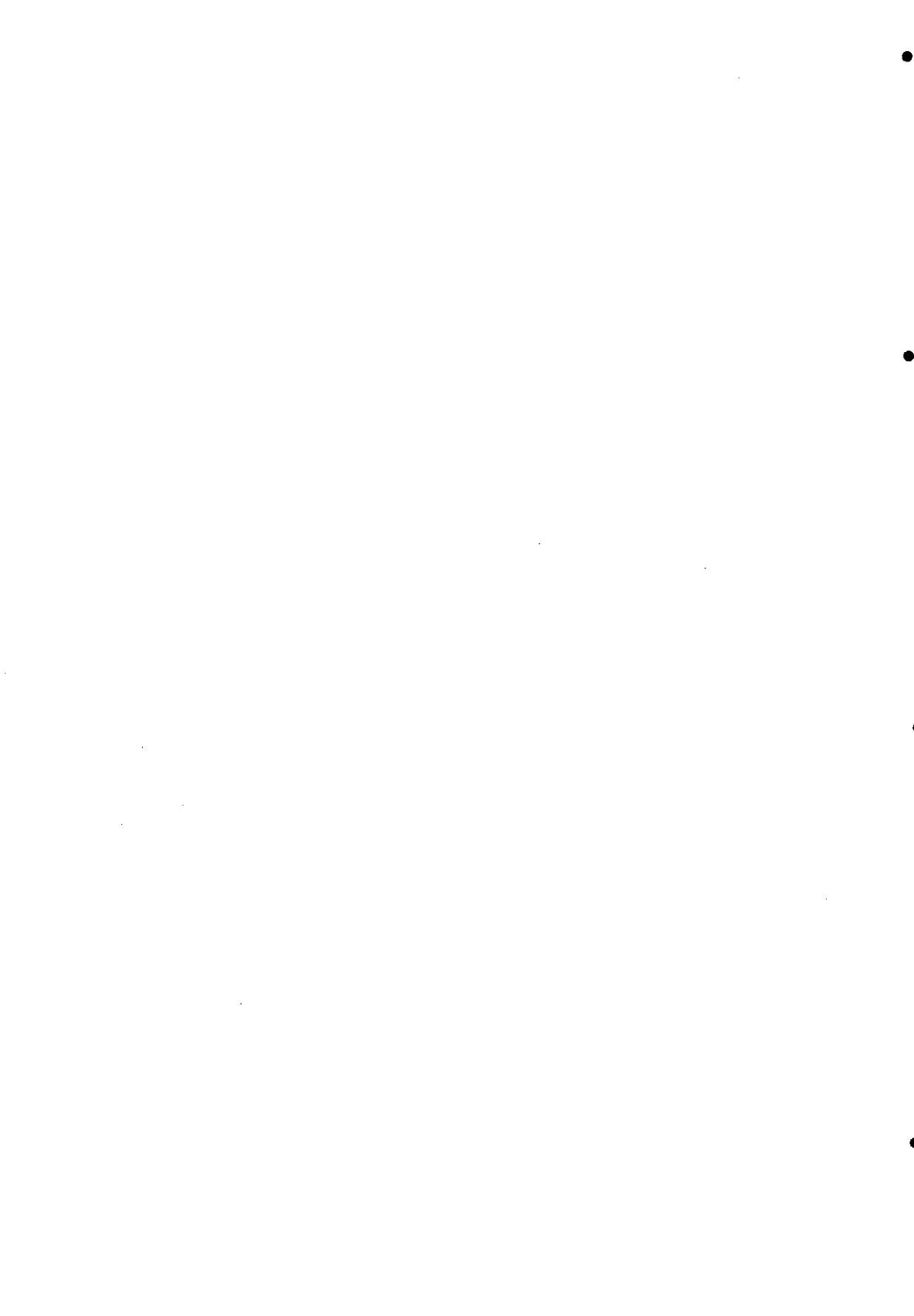
Finalmente, hemos aplicado y comprobado la fiabilidad de los marcadores seleccionados en productos manufacturados y/o en conserva, con el objetivo de que puedan ser transferidos a las industrias conserveras para su utilización rutinaria. Como ya se ha mencionado, el ADN obtenido de dichos productos generalmente se encuentra degradado en fragmentos de bajo peso molecular debido a los procesos a los que son sometidas las muestras, tales como la elaboración y la esterilización del producto. Por ello, en estos casos las técnicas más adecuadas son aquellas que utilizan el ADN satélite, debido a su elevado número de copia y a la longitud de la unidad monomérica. La calidad del ADN de estas muestras, obtenido mediante el protocolo descrito en el apartado 4.8 de Resultados, resultó aceptable para su utilización, tanto en la técnica de PCR como de hibridación Dot blot.

Debido a las características de las secuencias utilizadas en este trabajo, de todas las técnicas utilizadas la hibridación Dot blot resultó ser la más adecuada para diferenciar *P. canaliculus* del resto de especies de mejillón. Una de las particularidades del método

desarrollado en este trabajo es la detección de la señal mediante reacción colorimétrica. lo cual nos permite visualizar los resultados en poco tiempo y con un coste relativamente bajo.

Así, en la FIGURA 44 se observa que los individuos analizados procedentes de las conservas G y J, así como algunos de las conservas C y E, no pertenecen a ninguna de las dos especies que la normativa europea de consumo permite comercializar con el nombre de “mejillón”. Posteriormente, la amplificación de las secuencias tipo I y la digestión con la endonucleasa *Msp I* de dichos productos de PCR, nos permite identificar que los mejillones de las conservas D, F, H, I y K corresponden a *M. galloprovincialis*, por lo que podrían etiquetar sus conservas con la denominación “mejillón gallego”.

6. CONCLUSIONES

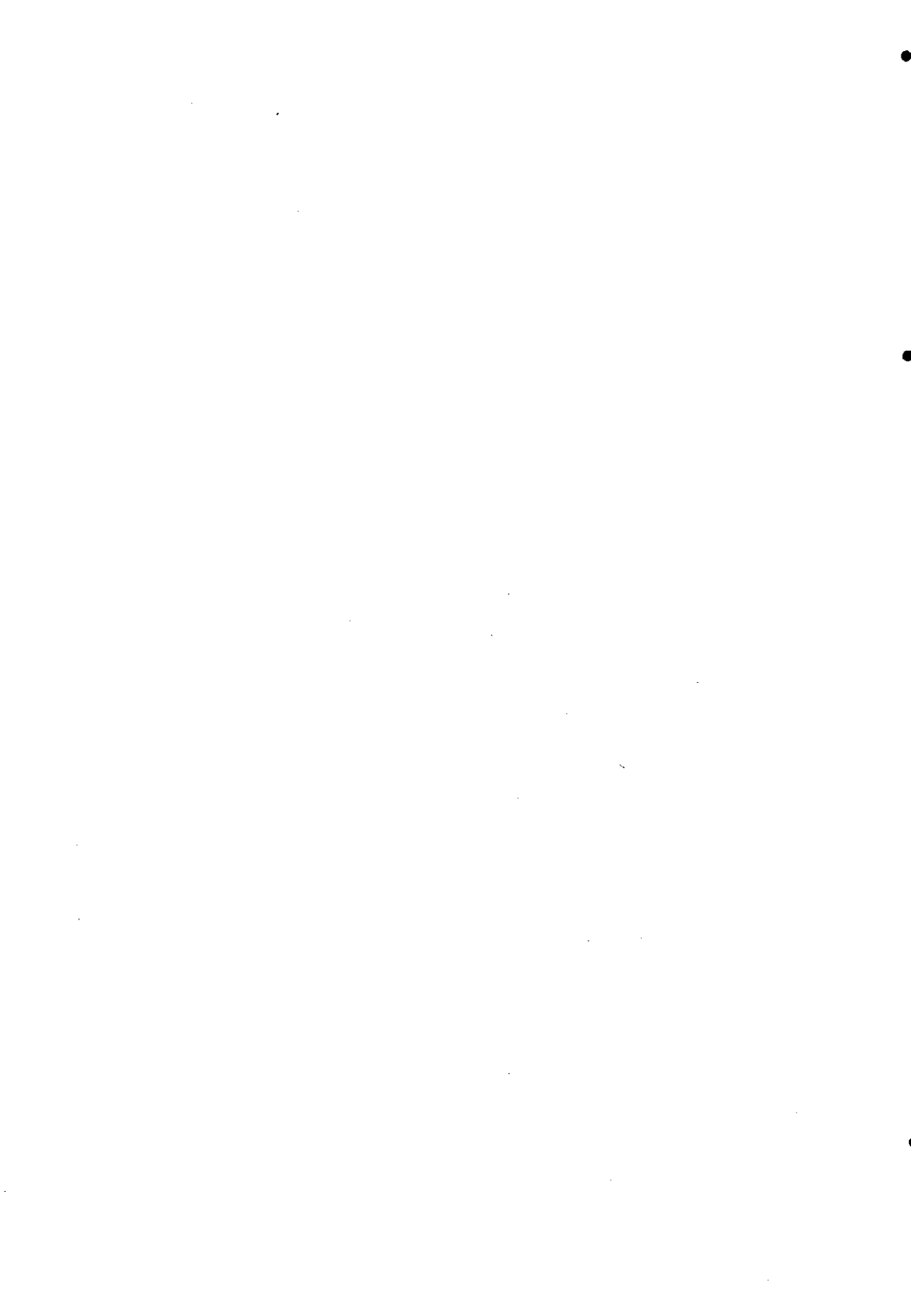


1. En las diez poblaciones analizadas pertenecientes al género *Mytilus*, el número de copia de la proteína *protamine-like* esperma específica PLII varía entre 7 y 13 copias por genoma haploide.
2. Las distancias genéticas obtenidas, mediante los marcadores nucleares analizados en este trabajo, entre las poblaciones de P. Aguirre y las pertenecientes a las especies *M. edulis* o *M. trossulus* son similares a las obtenidas con marcadores alozimicos, y las distancias entre las poblaciones de P. Aguirre y las de *M. galloprovincialis* se asemejan a las observadas con alozimas entre las poblaciones de *M. galloprovincialis* del Atlántico y del Mediterráneo.
3. Las distancias genéticas obtenidas con marcadores nucleares entre la población de Öland I. de Suecia y las poblaciones de *M. edulis* son iguales a las obtenidas entre *M. edulis* de las costas europeas y de la costa atlántica americana. Teniendo en cuenta la distinta morfología cromosómica de los mejillones de Öland I y los resultados obtenidos a partir de este análisis, podría sugerirse que la población de Öland I. pertenece a la especie *M. edulis*.
4. Utilizando el marcador Glu-5' podemos diferenciar las especies del "complejo *M. edulis*", ya que las poblaciones de *M. edulis* amplifican un fragmento de 350pb o uno de 380pb, las de *M. galloprovincialis* uno de 300pb y las de *M. trossulus* uno de 240pb o uno de 550pb. Igualmente, el marcador NRPP permite diferenciar dichas especies, debido a que los individuos *M. edulis* son homocigotos para el alelo de 180pb, los de *M. galloprovincialis* para el de 168pb y los de *M. trossulus* presentan el alelo de 126 o el de 220pb.
5. Los tres tipos de secuencias ADN satélite *Apa I* están presentes en todas las especies analizadas y se caracterizan por tener un elevado contenido A+T, el cual varía entre 55 y 65%. En general, la longitud de la unidad monomérica está muy conservada, siendo de 173pb en las secuencias tipo I, 161pb en las de tipo II y 167pb en las de tipo III. Estos ADN satélites constituyen el 0.60%, el 1.30% y el 0.018% del genoma de las especies del "complejo *M. edulis*". En *M. californianus* constituyen el 0.10%, el 0.85% y el 0.11%. Los análisis para determinar el número de copia en *P. canaliculus* indican que estos tres tipos de secuencias constituyen una fracción muy pequeña de su genoma, encontrándose presentes en un número inferior a 10 copias.
6. En cuanto a la distribución y localización cromosómica, las secuencias ADN satélite tipo I se encuentran organizadas en tándem y distribuidas en, al menos, nueve *clusters* diferentes,

localizándose a nivel intercalar y en algunos casos en regiones próximas a los telómeros. Las secuencias tipo II se encuentran organizadas en tándem y en *clusters* distribuidos de forma aleatoria por todos los cromosomas del complemento. Las secuencias tipo III se localizan en, al menos, tres pares cromosómicos en regiones próximas a los telómeros.

7. La comparación de la variabilidad intraespecífica con la divergencia interespecífica de los tres tipos de secuencias ADN satélite indica que éstas evolucionan de manera concertada. El hecho de que las mismas sustituciones aparezcan frecuentemente en las mismas posiciones en diferentes clones, sugiere un proceso de esparcimiento de las variantes monoméricas frente a series de sucesos mutacionales independientes. Por otro lado, el patrón de mutaciones agrupadas observado en las secuencias tipo I y tipo II puede ser consecuencia de homogenizaciones parciales debido a mecanismos de conversión génica.
8. Los valores de la relación transiciones/transversiones en las especies del género *Mytilus*, indican una mayor antigüedad de las secuencias tipo III con respecto a las tipo II y tipo I, siendo éstas últimas las que muestran una divergencia más reciente. El origen de estas secuencias es anterior a la separación de los géneros *Mytilus* y *Perna*, hace aproximadamente 155 millones de años, degenerando éstas en ADN satélite en el género *Mytilus*.
9. Las relaciones establecidas mediante la estimación de distancias y la aplicación de métodos de inferencia filogenética entre los clones de los tres tipos de ADN satélite, reflejan que la especie *M. californianus* es la más divergente, siendo las menos divergentes *M. chilensis* y *M. galloprovincialis*.
10. El análisis realizado de las secuencias de copia única y de ADN satélite permite sugerir que el mejillón azul de la población de P. Aguirre es una especie diferente dentro del "complejo *M. edulis*", denominada *M. chilensis*.
11. La aplicación de la técnica de hibridación Dot blot con las secuencias ADN satélite tipo II ha resultado de gran utilidad y fiabilidad para diferenciar *P. canaliculus* de las especies pertenecientes al género *Mytilus*. El análisis de los RFLPs, obtenidos tras la digestión de las secuencias tipo I con la endonucleasa *Msp I*, permiten la diferenciación de *stocks* de poblaciones de *M. galloprovincialis* del resto de las especies analizadas.

7. BIBLIOGRAFÍA



- ADAMKEWICZ, S.L.; HARASEWYCH, M.G.; BLAKE, J.; SAUDEK, D. & BULT, C.J. 1997. A molecular phylogeny of the bivalve molluscs. *Mol. Biol. Evol.*, 14: 619-629.
- ADEGOKE, J.A.; ARNASON, U. & WIDEGREN, B. 1993. Sequence organization and evolution, in all extant whalebone whales, of a DNA satellite with terminal chromosome localization. *Chromosoma*, 102: 382-388.
- 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 mussel *Mytilus edulis* and *M. californianus*. *Biol. Bull.*, 138: 1-13.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. & LIPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.*, 25: 3389-3402.
- ARNASON, U. 1990. Phylogeny of marine mammals-evidence from chromosomes and DNA. En: *Chromosomes today*. Eds. K. Fredga, A. Kihlman & M.D. Bennet. Vol. 10, pp. 267-278.
- AUSIÓ, J. 1986. Structural variability and compositional homology of the protamine-like components of the sperm from the bivalve mollusc. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B: 439-449.
- 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. 1992. Presence of a highly specific histone H1-like protein in the chromatin of the sperm of the bivalve molluscs. *Mol. Cell Biochem.*, 115: 163-172.
- AUSIÓ, J. 1995. Histone H1 and the evolution of the nuclear sperm-specific proteins. En: *Advances in Spermatozoal Taxonomy and Phylogeny*. B.G.M. Jamieson, J. Ausió & J.L. Justine. Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, Vol. 166, pp. 447-462.
- AUSIÓ, J. 1999. Histone H1 and evolution of sperm nuclear basic proteins. *J. Biol. Chem.*, 274: 31115-31118.
- AUSIÓ, J. & SUBIRANA, J.A. 1982a. A high molecular weight nuclear basic protein from the bivalve mollusc *Spisula solidissima*. *J. Biol. Chem.*, 257: 2802-2805.
- AUSIÓ, J. & SUBIRANA, J.A. 1982b. Nuclear proteins and the organization of chromatin in spermatozoa of *Mytilus edulis*. *Exp. Cell Res.*, 141: 39-45.
- BACHMANN, L.; SCHIBEL, J.B.; RAAB, M. & SPERLICH, D. 1993. Satellite DNA as a taxonomic marker. *Biochem. Syst. Ecol.*, 21: 3-11.

- BACHMANN, L. & SPERLICH, D. 1993. Gradual evolution of a specific satellite DNA family in *Drosophila ambigua*, *D. tristis* and *D. obscura*. *Mol. Biol. Evol.*, 10: 647-659.
- BACHMANN, L.; VENANZETTI, F. & SBORDONI, V. 1994. Characterization of a species-specific satellite DNA family of *Dolichopoda schiavazzii* (Orthoptera, Rhaphidophoridae) cave crickets. *J. Mol. Evol.*, 39: 274-281.
- BARSOTTI, G. & MELUZZI, C. 1968. Osservazioni su *Mytilus edulis* L. e *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. *Conchiglie*, 4: 50-58.
- BEAUMONT, A.R. 1991. Genetic studies of laboratory reared *Mytilus edulis*: heterozygote deficiencies, heterozygosity and growth. *Biol. J. Linn. Soc.*, 44: 273-285.
- BEAUMONT, A.R.; SEED, R. & GARCÍA-MARTÍNEZ, P. 1989. Electrophoretic and morphometric criteria for the identification of the mussels *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. En: *Reproduction, Genetics and Distribution of Marine Organism*. Eds. J.S. Ryland & P.A. Tyler. Olsen and Olsen, Fredensborg, Denmark, pp. 251-258.
- BENNETT, M.D. & SMITH, T.B. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Phi. Trans. Roy. Soc.*, 224B: 227-274.
- 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.
- BENYON, 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.
- BLACKBURN, E.H. 1991. Structure and function of DNA of telomeres. *Nature*, 321: 209-213.
- BLOT, M.; THIRIOT-QUIÉVREUX, C. & SOYER, J. 1988. Genetic relationships among populations of *Mytilus desolationis* from Kerguelen, *M. edulis* from the North Atlantic and *M. galloprovincialis* from the Mediterranean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 44: 239-247.
- BOGENBERGER, J.M.; NEITZEL, H. & FITTLER, F. 1987. A highly repetitive DNA component common to all *Cervidae*: its organization and chromosomal distribution during evolution. *Chromosoma*, 95: 154-161.
- 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.

- BRUTLAG, D.L. 1980. Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. *Ann. Rev. Genet.*, 14: 121-144.
- BULNHEIM, H.P. & GOSLING, E.M. 1988. Population genetic structure of mussels from the Baltic Sea. *Helgoländer Meeresunt.*, 42: 113-129.
- CANAPA, A.; BARUCCA, M.; CERIONI, P.N. & OLMO, E. 2000. A satellite containing CENP-B box-like motifs is present in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Gene*, 247: 175-180.
- CARLOS, S.; HUNT, D.F.; ROCCINI, C.; ARNOTT, D.P. & AUSIÓ, J. 1993. Post-translational cleavage of a histone H1-like protein in the sperm of *Mytilus*. *J. Biol. Chem.*, 268: 195-199.
- CAVALIER-SMITH, T. 1980. How selfish is DNA?. *Nature*, 285: 617-618.
- CAVALIER-SMITH, T. 1985. Cell volume and the evolution of eukaryote genome size. En: *The evolution of genome size*. Ed. T. Cavalier-Smith. John Wiley & Sons Ltd., London, pp. 105-184.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. & EDWARDS, A.W. 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.*, 19: 233-257.
- CHARLESWORTH, B.; SNIEGOWSKI, P. & STEPHAN, W. 1994. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature*, 371: 215-220.
- CLABBY, C.; GOSWAMI, U.; FLAVIN, F.; WILKINS, N.P.; HOUGHTON, J.A. & POWELL, R. 1996. Cloning, characterization and chromosomal location of satellite DNA from the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*, 168: 205-209.
- COMESAÑA, A.S. & SANJUAN, A. 1997. Microgeographic allozyme differentiation in the hybrid zone of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. on the continental European coast. *Helgoländer Meeresunt.*, 51: 107-124.
- COMESAÑA, A.S.; TORO, J.E.; INNES, D.J. & THOMPSON, R.J. 1999. A molecular approach to the ecology of a mussel (*Mytilus edulis* – *M. trossulus*) hybrid zone on the east coast of Newfoundland, Canada. *Mar. Biol.*, 133: 213-221.
- CONRAD, T.A. 1837. Description of new marine shells from upper California, collected by Thomas Nuttall. *Esq. J. Acad. Nat. Sci.*, 7: 227-268.
- CÔRTE-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. 225-907.
- 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.
- DEL RÍO-PORTILLA, M.A. & BEAUMONT, A.R. 1997. Inheritance of the calmodulin gene-1 intron 3 in *Mytilus edulis* juveniles. *J. Moll. Stud.*, 63: 469-471.
- DENOVAN, E.M. & WRIGHT, J.M. 1990. A satellite DNA family from pollock (*Pollachius virens*). *Gene*, 87: 279-283.
- DIXON, D.R. 1982. Aneuploidy in mussel embryos (*Mytilus edulis* L.) originating from a polluted dock. *Mar. Biol. Lett.*, 3: 155-161.
- DIXON, D.R. 1983. Sister chromatid exchange and mutagens in the aquatic environment. *Mar. Pollut. Bull.*, 14: 282-284.
- DIXON, D.R. & CLARK, K.R. 1982. Sister chromatid exchange: a sensitive method for detecting damage caused by exposure to environmental mutagens in the chromosomes of adult *Mytilus edulis*. *Mar. Biol. Lett.*, 3: 163-172.
- 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.
- DODGE, H. 1952. A historical review of the mollusks of Linnaeus. Part I. The classes Loricata and Pelecypoda. *Am. Mus. Hist. Bull.*, 100: 1-263.
- DOOLITTLE, W.F. & SAPIENZA, C. 1980. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*, 284: 601-603.
- DOVER, G.A. 1978. DNA conservation and speciation: adaptative or accidental?. *Nature*, 272: 123-124.
- DOVER, G.A. 1980. Ignorant DNA?. *Nature*, 285: 618-620.
- DOVER, G. 1993. Evolution of genetic redundancy for advanced players. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 3: 902-910.

- DOYLE, K.E.; KOVALICK, G.E.; LEE, E. & BECKINGHAM, K. 1990. *Drosophila melanogaster* contains a single calmodulin gene: further structure and expression studies. *J. Mol. Biol.*, 213: 599-605.
- 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.
- DROUIN, G. & DOVER, G.A. 1990. Independent gene evolution in the potato actin gene family demonstrated by phylogenetic procedures for resolving gene conversions and the phylogeny of angiosperm actin genes. *J. Mol. Evol.*, 31: 132-150.
- ESTABROOKS, S.L. 1999. The telomeres of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck). *J. Shellfish Res.*, 18: 401-404.
- FANNING, T.G.; SEUANEZ, H.N. & FORMAN, L. 1989. Satellite DNA sequences in the neotropical marmoset *Callimico goeldii* (Primates, Platyrrhini). *Chromosoma*, 98: 396-401.
- FANNING, T.G.; SEUANEZ, H.N. & FORMAN, L. 1993. Satellite DNA sequences in the New World primate *Cebus apella* (Platyrrhini, Primates). *Chromosoma*, 102: 306-311.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using 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.
- FILPULA, D.R.; LEE, S.M.; LINK, R.P.; STRAUSBERG, S.L. & STRAUSBERG, R.L. 1990. Structural and functional repetition in a marine mussel adhesive protein. *Biotechnol. Prog.*, 6: 171-177.
- FLEMING, C.A. 1979. *The geological history of New Zealand and its life*. Auckland Univ. Press, Auckland, New Zealand.
- FOWLER, R.F. & SKINNER, D.M. 1985. Cryptic satellites rich in inverted repeats comprise 30% of the genome of a hermit crab. *J. Biol. Chem.*, 260: 1296-1303.
- GAFFNEY, P.M. 1994. Heterosis and heterozygote deficiencies in marine bivalves: more light?. En: *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Ed. A.R. Beaumont. London, Chapman and Hall, pp. 146-153.
- GALINOD, 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.
- GARRIDO-RAMOS, M.A.; DE LA HERRÁN, R.; JAMILENA, M.; LOZANO, R.; RUIZ-REJÓN, C. & RUIZ-REJÓN, M. 1999. Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of the *Sparidae* family (Pisces, Perciformes). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 12: 200-204.

- GARRIDO-RAMOS, M.A.; JAMILENA, M.; LOZANO, R.; RUÍZ-REJÓN, C. & RUÍZ-REJÓN, M. 1995. Phylogenetic relationships of the *Sparidae* family (Pisces, Perciformes) inferred from satellite-DNA. *Hereditas*, 122: 1-6.
- GARTNER-KEPKAY, K.E.; DICKIE, L.M.; FREEMAN, K.R. & ZOUROS, E. 1980. Genetic differences and environments of mussel populations in the Maritime Provinces. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37: 775-782.
- 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.
- GARTON, D.W.; KOEHN, R.K. & SCOTT, T.M. 1984. Multiple-locus heterozygosity and the physiological energetics of growth in the coot clam, *Mulinia lateralis*, from a natural population. *Genetics*, 108: 445-455.
- 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.
- GONZÁLEZ-TIZÓN, A.; MARTÍNEZ-LAGE, A.; REGO, J.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. E.M. Gosling. Elsevier Press, Amsterdam, pp. 1-20.
- GOSLING, E.M. 1992b. Genetics of *Mytilus*. En: *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Ed. E.M. Gosling. Elsevier Press, Amsterdam, pp. 309-382.
- GOSLING, E.M. & WILKINS, N.P. 1985. Genetics of settling cohorts of *Mytilus edulis* (L.): preliminary observations. *Aquaculture*, 44: 115-123.
- 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.
- GREIDER, C.W. 1996. Telomere length regulation. *Annu. Rev. Genet.*, 30: 141-172.
- GRETARSDOTTIR, G. & ARNASON, U. 1992. Evolution of common cetacean highly repetitive DNA component and the systematic position of *Orcaella brevirostris*. *J. Mol. Evol.*, 34: 201-208.
- GRIFFITH, J.D.; COMEAU, L.; ROSENFELD, S.; STANSEL, R.M.; BIANCHI, A.; MOSS, H. & DE LANGE, T. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97: 503-514.
- GUO, S.W. & THOMPSON, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for Multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- HAAF, T.; WARBURTON, P.E. & WILLARD, H.F. 1992. Integration of human alpha-satellite DNA into simian chromosomes: centromere protein binding and disruption of normal chromosome segregation. *Cell*, 70: 681-696.
- HARDING, R.M.; BOYCE, A.J. & CLEGG, J.B. 1992. The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics*, 132: 847-859.
- HARDY, D.O.; BENDER, P.K. & KRETSINGER, R.J. 1988. Two calmodulin genes are expressed in *Arvacia punctulata*. *J. Mol. Biol.*, 199: 223-227.
- HARE, M.P. & AVISE, J.C. 1998. Population structure in the american oyster as inferred by nuclear gene genealogies. *Mol. Biol. Evol.*, 15: 119-128.
- HARE, M.P.; KARL, S.A. & AVISE, J.C. 1996. Anonymous nuclear DNA markers in the American oyster and their implications for the heterozygote deficiency phenomenon in marine bivalves. *Mol. Biol. Evol.*, 13: 334-345.
- 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.
- HEDGES, S.B. 1992. The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol. Biol. Evol.*, 9: 366-369.

- HESLOP-HARRISON, J.S.; SCHWARZACHER, T.; ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K.; LEITCH, A.R.; SHI, M. & LEITCH, I.J. 1991. *In situ* hybridization with automated chromosome denaturation. *Technique*, 3: 109-115.
- HILBISH, T.J.; MULLINAX, A.; DOLVEN, S.I.; MEYER, R.K.; 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.
- HILLIS, D.M. & BULL, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 41: 182-192.
- HINEGARDNER, R. 1974. Cellular DNA content of the Mollusca. *Comp. Biochem. Physiol.*, 47: 447-460.
- HINEGARDNER, R. 1976. Evolution of genome size. En: *Molecular Evolution*. Ed. F.J. Ayala. Sinauer Associates, Massachusetts, pp. 179-199.
- HOLMQUIST, R. 1983. Transitions and transversions in evolutionary descent: an approach to understanding. *J. Mol. Evol.*, 19: 134-144.
- HÖRZ, W. & ALTENBURGER, W. 1981. Nucleotide sequence of mouse satellite DNA. *Nucleic Acids Res.*, 9: 683-696.
- HÖRZ, W. & ZACHAN, H.G. 1977. Characterization of distinct segments in mouse satellite DNA by restriction nucleases. *Eur. J. Biochem.*, 73: 383-392.
- HOURCADE, D.; DRESSLER, D. & WOLFSON, J. 1973. The amplification of ribosomal RNA genes involving a rolling circle intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70: 2926-2930.
- HSIEH, T. & BRUTLAG, D. 1979. Sequence and sequence variation within the 1.688g/cm³ satellite DNA *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.*, 135: 465-481.
- HUPÉ, H. 1854. Molluscos. En: *Historia física y política de Chile. Zoología*. Ed. C. Gay. París, 99. Vol. 8, pp. 1-407.
- IEYAMA, H.; KAMEOKA, O.; TAN, T. & YAMSAKI, J. 1994. Chromosomes and nuclear DNA contents of some species in Mytilidae. *Venus*, 53: 327-331.
- INOUE, K.; KAMINO, K.; SASAKI, F.; ODO, S. & HARAYAMA, S. 2000. Conservative structure of the plaque matrix protein of mussels in the genus *Mytilus*. *Mar. Biotechnol.*, 2: 348-351.
- 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.
- INOUE, K.; WAITE, H.; MATSUOKA, M.; ODO, S. & HARAYAMA, S. 1995c. Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* and *M. trossulus*. *Biol. Bull.*, 189: 370-375.
- 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.
- ISENBERG, I. 1978. Histones. En: *The Cell Nucleus*. Academic Press, New York. Volume 4, Part A. pp. 135-154.
- JOHANNESON, 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.
- JUKES-BROWN, A.J. 1905. A review of the genera of the family Mytilidae. *Malacol. Soc. Lond. Proc.*, 6: 211-224.
- JUTGLAR, L.; BORRELL, J.I. & AUSIÓ, J. 1991. Primary, secondary and tertiary structure of the core of a histone H1-like protein from the sperm of *Mytilus*. *J. Biol. Chem.*, 266: 8184-8191.
- KARL, S.A. & AVISE, J.C. 1993. PCR-based assays of Mendelian polymorphisms from anonymous single-copy nuclear DNA. Techniques and applications for population genetics. *Mol. Biol. Evol.*, 10: 342-361.
- KENCHINGTON, 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.
- KENCHINGTON, E.L.; RODDICK, D.L.; SINGH, R.K. & BIRD, C.J. 1994. Analysis of small-subunit rRNA gene sequences from six families of molluscs. *J. Mar. Biotechnol.*, 1: 215-217.

- 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.
- KIRA, T. 1962. *Shells of the western Pacific in color*. Hoikusha Publishing Co., Osaka.
- KLECKNER, N. 1981. Transposable elements in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.*, 15: 341-404.
- KLEE, C.B. & VANAMAN, T.C. 1982. Calmodulin. *Advan. Protein Chem.*, 35: 213-321.
- KOEHN, R.K. 1991. The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. *Aquaculture*, 94: 125-145.
- KOEHN, R.K.; DIEHL, W.J. & SCOTT, T.M. 1988. The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozygosity and growth rate in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics*, 118: 121-130.
- KOEHN, R.K. & GAFFNEY, P.M. 1984. Genetic heterozygosity and growth rate in *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 82: 1-7.
- 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.; NEWELL, R.I.E. & IMMERMANN, F. 1980. Maintenance of an aminopeptidase allele frequency cline by natural selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5385-5389.
- KOO, H.S.; WU, H.M. & CROTHERS, D.M. 1986. DNA bending at adenine-thymine tracts. *Nature*, 320: 501-506.
- KORN, E.D. 1978. Biochemistry of actomyosin-dependent cell motility (a review). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 588-599.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B. & NEI, M. 2000. *MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.0*. Pennsylvania State University, University Park, and Arizona State University, Tempe.
- LAMARCK, J.B.P.A. 1819. *Histoire naturelle des animaux sans vertèbres*. Vol. 6, A.S.B. Verdiere Libraire, Paris.
- LAMERS, A.E.; HEINEY, J.P. & RAM, J.L. 1998. Isolation and characterization of cDNA encoding an actin protein from the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *J. Shellfish. Res.*, 17: 1215-1217.
- LAMY, E. 1936. Révision des Mytilidae vivants du Muséum national d'Histoire naturelle de Paris. *J. Conchy.*, 80: 66-363.

- 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*. Ed. S.T. Case. Springer-Verlag, Berlin. Vol. 19, pp. 55-74.
- LAURSEN, H.B.; JORGENSEN, A.L.; JONES, C. & BAK, A.L. 1992. Higher rate of evolution of X chromosome alpha-repeat DNA in human than in the great apes. *EMBO J.*, 11: 2367-2372.
- LEE, S.Y. & MORTON, B.S. 1985. The introduction of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* into Hong Kong. *Malacol. Rev.*, 18: 107-109.
- LEVINSON, G. & GUTMAN, G.A. 1987. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 203-221.
- LEWIN, B. 2000. *Genes VII*. Oxford University Press Inc., New York.
- 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.
- LI, W.H.; WU, C.I. & LUO, C.C. 1984. Nonrandomness of point mutation as reflected in nucleotide substitutions in pseudogenes and its evolutionary implications. *J. Mol. Evol.*, 21: 58-71.
- LI, W.H. & GRAUR, D. 1991. *Fundamentals of molecular evolution*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts.
- 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. Laurentii Salvi, Stockholm. 10th Edition, Vol. 1, pp. 1384.
- LISCHKE, C.E. 1868. Diagnosen neuer Meeres-Konchylien von Japan. *Malakozool. Blätter*, 15: 218-222.
- MARTÍNEZ-BALBÁS, A.; RODRÍGUEZ-CAMPOS, A.; GARCÍA-RAMÍREZ, M.; SAINZ, J.; CARRERA, P.; AYMAMI, J. & AZORÍN, F. 1990. Satellite DNAs contain sequences that induce curvature. *Biochemistry*, 29: 2342-2348.
- MARTÍNEZ-EXPÓSITO, M.J.; MARTÍNEZ-LAGE, A., PASANTES, J.J. & MÉNDEZ, J. 1992. Estudio preliminar de la aneuploidía en poblaciones naturales del Género *Mytilus*. *Cuad. Area Cien. Mar.*, 6: 49-56
- MARTÍNEZ-EXPÓSITO, M.J.; MÉNDEZ, J. & PASANTES, J.J. 1997. Analysis of NORs and NOR-associated heterochromatin in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Chrom. Res.*, 5: 268-273.
- 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.
- MARTÍN-PONTHIEU, A.; WOUTERS-TYROU, D.; BELAICHE, D.; SAUTIERE, P.; SCHINDLER, P. & VAN DORSSELAER, A. 1991. Cuttlefish sperm protamines. I. Amino acid sequences of two distinct variants. *Eur. J. Biochem.*, 195: 611-619.
- MARZLUFF, W.F. 1986. Evolution of histone genes. En: *DNA Systematics*. Ed. S.K. Dutta. CRC Press, Boca Raton, Florida. Volume I- Evolution, 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.
- MCGREGOR, H.C. & SESSIONS, S.K. 1986. The biological significance of variation in satellite DNA and heterochromatin in newts of the genus *Triturus*. an evolutionary perspective. *Phil. Trans. R. Soc.*, 312: 243-259.
- MCLEAN, K.W. & WHITELEY, A.H. 1973. Characteristics of DNA from the oyster, *Crassostrea gigas*. *Biochem. Biophys.*, 335: 35-41.
- 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.
- MIKLOS, G.L. 1985. Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. En: *Molecular Evolutionary genetics*. Ed. J.R. McIntyre. Plenum Press, New York, pp. 241-321.

- MIKLOS, G.L. & GILL, A.C. 1982. Nucleotide sequence of highly repeated DNAs: compilation and comments. *Genet. Res.*, 39: 1-30.
- MITTA, G.; ROCH, P. & CADORET, J.P. 2000. Isolation and characterization of a cDNA encoding an actin protein from the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *J. Shell. Res.*, 19(1): 183-186.
- MODI, W.S.; GALLAGHER, D.S. & WOMACK, J.E. 1996. Evolutionary histories of highly repeated DNA families among the Artiodactyla (Mammalia). *J. Mol. Evol.*, 42: 337-349.
- 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.
- MOYNIHAN, E.P. & MAHON, G.A.T. 1983. Quantitative karyotype analysis in the mussel *Mytilus edulis*. *Aquaculture*, 33: 301-309.
- MUCHMORE, M.E.; MOY, G.W.; SWANON, W.J. & VACQUIER, V.D. 1998. Direct sequencing of genomic DNA for characterization of a satellite DNA in five species of eastern pacific abalone. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 7: 1-6.
- MURDOCK, E.A.; FERGUSON, A. & SEED, R. 1975. Geographical variation in leucine aminopeptidase in *Mytilus edulis* L. from the Irish coasts. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 19: 33-41.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.*, 106: 283-292.
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- NEWELL, N.D. 1969. Classification of bivalvia. En: *Treatise on Invertebrate Paleontology*. Ed. R.C. Moore. Geol. Soc. Am. and the University Press of Kansas. Part N, Vol. 1, Mollusca 6, Bivalvia, pp. 205-224.
- NOJIMA, H. 1989. Structural organization of multiple rat calmodulin genes. *J. Molec. Biol.*, 208: 269-282.
- NOJIMA, H. & SOKABE, H. 1989. Structural organization of multiple rat calmodulin genes in the rat genome. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 255: 223-232.
- OHNO, S. 1974. *Animal Cytogenetics*. Ed. Bernard John. Gebrüder Borntraeger, Berlin-Stuttgart. Vol. 4, nº 1.
- 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.
- ORBIGNY D', A. 1846. Mollusques lamellibranches. En: *Voyage dans l'Amérique Méridionale*. Ed. A. d'Orbigny. Bertrand and Levrault, Paris. Vol. 5(3), pp. 489-758.
- ORGEL, L.E & CRICK, F.H.C. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, 284: 604-607.

- OSHIMA, A.; INOUE, S. & INOUE, 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.
- PAPOV, V.V.; DIAMONDS, T.V.; BIEMANN, K. & WAITE, J.H. 1995. Hydroarginine-containing polyphenolic proteins in the adhesive plaques of the marine mussel *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.*, 270: 20183-20192.
- PASANTES, J.J.; MARTÍNEZ-EXPÓSITO, M.J.; MARTÍNEZ-LAGE, A. & MÉNDEZ, J. 1990. Chromosomes of gallician mussels. *J. Moll. Stud.*, 65: 123-126.
- PASSAMONTI, M. 1996. *Tapes philippinarum* centromeric satellite DNA. Direct Submission Journal Submitted Biologia Evoluzionistica sperimentale, University of Bologna, Italy. (GenBank accession, U80936).
- PLOHL, M.; BORSTNIK, B.; LUCIJANIC-JUSTIC, V. & UGARKOVIC, D. 1992. Evidence for random distribution of sequence variants in *Tenebrio molitor* satellite DNA. *Genet. Res.*, 60: 7-13.
- PLOHL, M. & CORNUDELLA, L. 1996. Characterization of a complex satellite DNA in the mollusc *Donax trunculus*: Analysis of sequence variations and divergence. *Gene*, 169: 157-164.
- PLOHL, M. & CORNUDELLA, L. 1997. Characterization of interrelated sequence motifs in four satellite DNAs and their distribution in the genome of the mollusc *Donax trunculus*. *J. Mol. Evol.*, 44: 189-198.
- PLOHL, M.; LUCIJANIC-JUSTIC, V.; UGARKOVIC, D.; PETITPIERRE, E. & JUAN, C. 1993. Satellite DNA and heterochromatin of the flour beetle *Tribolium confusum*. *Genome*, 36: 467-475.
- PLOHL, M. & UGARKOVIC, D. 1994. Analysis of divergence of *Alphitobius diaperinus* satellite DNA - roles of recombination, replication slippage and gene conversion. *Mol. Gen. Genet.*, 242: 297-304.
- PONS, J.; BRUVO, B.; JUAN, C.; PETITPIERRE, E.; PLOHL, M. & UGARKOVIC, D. 1997. Conservation of satellite DNA in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Gene*, 205: 183-190.
- QUESADA, H.; SKIBINSKI, D.A.G. & SKIBINSKI, D.O.F. 1996. Sex-biased heteroplasmy and mitochondrial DNA in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Curr. Genet.*, 29: 423-426.
- 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.
- RADIC, M.Z.; LUNDGREN, K. & HAMKALO, B. 1987. Curvature of mouse satellite DNA and condensation of heterochromatin. *Cell*, 50: 1101-1108.
- 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. & HILBISH, T.J. 1998. Asymmetric introgression of mitochondrial DNA among European populations of blue mussels (*Mytilus spp.*). *Evolution*, 52: 100-108.
- 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.
- RAYMOND, M.; VÄÄNTÖ, R.L.; THOMAS, F.; ROUSSET, F.; MEEÛS, T. & RENAUD, F. 1997. Heterozygote deficiency in the mussel *Mytilus edulis* species complex revisited. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 156: 225-237.
- RICE, E.L. & BIRD, C.J. 1990. Relationships among geographically distant population of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta) and related species. *Phycologia*, 29: 501-510.
- RICE, E.L.; RODDICK, D. & SINGH, R.K. 1993. A comparison of molluscan (Bivalvia) phylogenies based on palaeontological and molecular data. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 2: 137-146.
- RÍOS, J. 1998. *Estudio de los genes ribosomales en los mejillones Mytilus edulis y M. galloprovincialis*. Tesis de Licenciatura. Universidade da Coruña.
- ROCCINI, C.; MARX, R.M.; VONCAROSFELD, J.S.; KASINSKY, H.E.; ROSENBERG, E.; SOMMER, F. & AUSIÓ, J. 1996. Replacement of nucleosomal histones by histone H1 like proteins during spermiogenesis in cnidaria: evolutionary implications. *J. Mol. Evol.*, 42: 240-246.
- RODHOUSE, P.G. & GAFFNEY, P.M. 1984. Effect of heterozygosity on metabolism during starvation in the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.*, 80: 179-187.
- RODRÍGUEZ-JUIZ, A.M.; TORRADO, M. & MÉNDEZ, J. 1996. Genome-size variation in bivalve molluscs determined by flow cytometry. *Mar. Biol.*, 126: 489-497.
- ROGERS, J.S. 1986. Deriving phylogenetic trees from allele frequencies: a comparison of nine genetic distances. *Syst. Zool.*, 35(3): 297-310.
- ROJAS-ROUSSE, D.; BIGOT, Y. & PERIQUET, G. 1993. DNA insertions as a component of the evolution of unique satellite DNA families in two genera of parasitoid wasps: *Diadromus* and *Eupelmus* (Hymenoptera). *Mol. Biol. Evol.*, 10: 383-396.
- RUBENSTEIN, P.A. 1990. The functional importance of multiple actin isoforms. *Bioessays*, 12: 309-315.
- RUÍZ-LARA, S. 1993. *Análisis del ADN satélite en el mejillón Mytilus edulis*. Tesis Doctoral. Universidad Central de Barcelona.

- 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.
- SAAVEDRA, C.; REYNERO, M. & ZOUROS, E. 1997. Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics*, 145: 1073-1082.
- SAAVEDRA, C.; STEWART, D.T.; STANWOOD, R.R. & ZOUROS, E. 1996. Species-specific segregation of gender-associated mitochondrial DNA types in an area where two mussel species (*Mytilus edulis* and *M. trossulus*) hybridize. *Genetics*, 143: 1359-1367.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- 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.*, 74: 5463-5467.
- SANJUAN, A.; QUESADA, H.; ZAPATA, C. & ALVAREZ, G. 1990. On the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. on NW coasts of the Iberian Peninsula. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 143: 1-15.
- 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. & ALVAREZ, G. 1997. Genetic differentiation in *Mytilus galloprovincialis* Lmk. throughout the world. *Ophelia*, 47: 13-31.
- SAPERAS, N.; AUSIÓ, J.; LLORIS, D. & CHIVA, M. 1994. On the evolution of protamines in bony fish: alternatives to the "retroviral horizontal transmission" hypothesis. *J. Mol. Evol.*, 39: 282-295.
- SAPERAS, N.; CHIVA, M. & AUSIÓ, J. 1992. Purification and characterization of the protamines and related proteins from the sperm of a tunicate, *Styela plicata*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 103: 969-974.
- SAPERAS, N.; CHIVA, M.; PFEIFFER, D.C.; KASINSKY, H.E. & AUSIÓ, J. 1997. Sperm nuclear basic proteins (SNBPS) of agnathans and chondrichthyans: variability and evolution of sperm proteins in fish. *J. Mol. Evol.*, 44: 422-431.
- SCARLATO, O.A. 1981. Bivalve molluscs of temperate latitudes of the western portion of the Pacific Ocean. *Opred. Faune SSSR*, 126: 1-461.

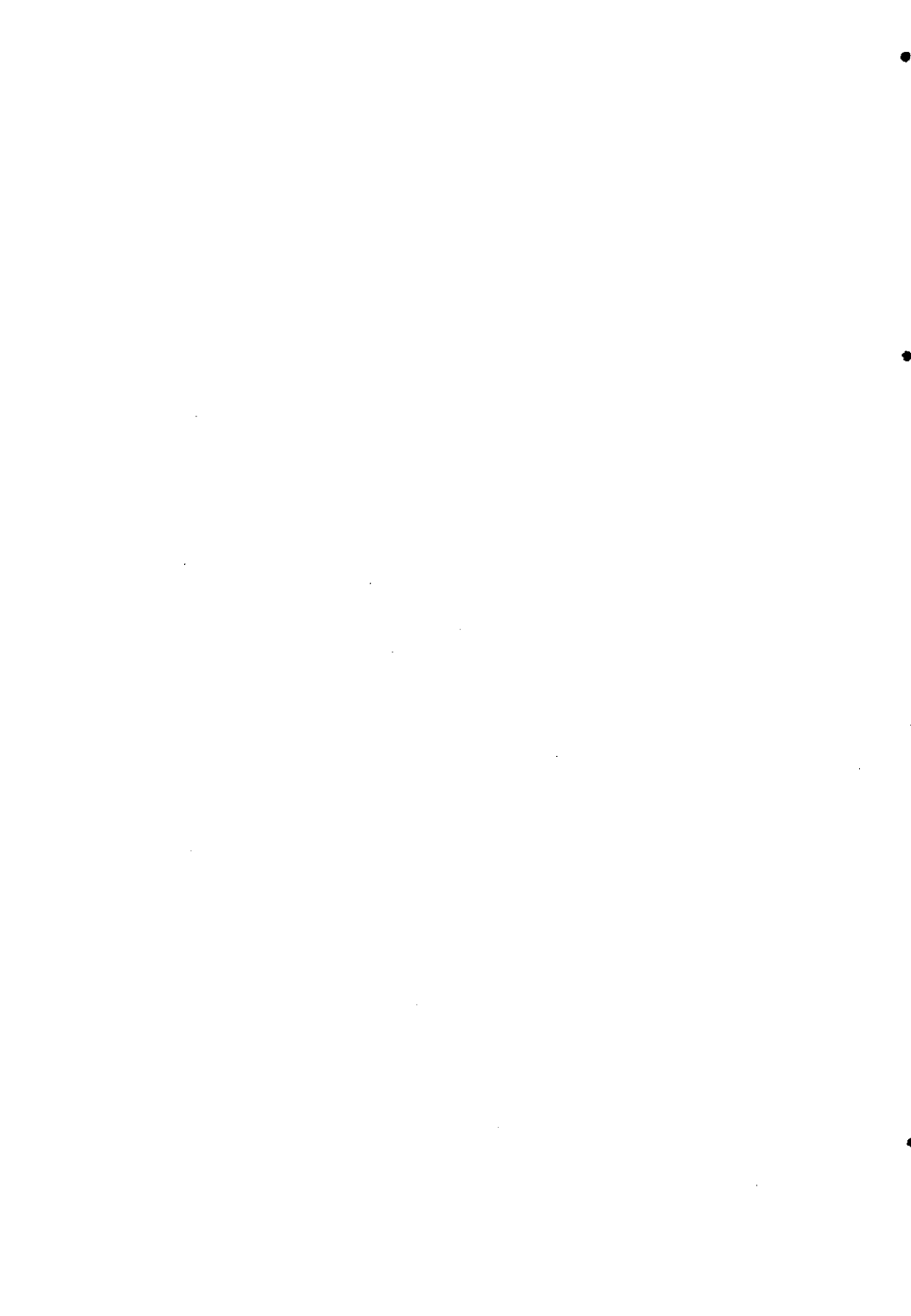
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. & EXCOFFIER, L. 2000. *ARLEQUIN ver. 2000: a software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SCHOLOETERER, C. & TAUTZ, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.*, 20: 211-215.
- SEED, R. 1972. Morphological variations in *Mytilus* from the French coasts in relation to the occurrence and distribution of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.). *Cah. Biol. Mar.*, 13: 357-384.
- SEED, R. 1974. Morphological variations in *Mytilus* from the Irish coasts in relation to the occurrence and distribution of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.). *Cah. Biol. Mar.*, 15: 1-25.
- SEED, R. 1976. Ecology. En: *Marine Mussels: their ecology and physiology*. Ed. B.L. Bayne. 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. B. Battaglini & J.A. Beardmore. 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.
- SELANDER, R.K. 1970. Behaviour and genetic variation in natural populations. *Am. Zool.*, 10: 53-66.
- 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. & GREEN, R.H. 1984. Excess of allozyme homozygosity in marine molluscs and its possible biological significance. *Malacologia*, 25(2): 569-581.
- 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. 1983. Natural selection in hybrid mussel populations. En: *Protein polymorphism: adaptative and taxonomic significance, systematics association specia*. Eds. Oxford, G.S. & Rollinson, D. Academic Press, New York & London, Volumen 24, pp. 283-298.
- 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. 1994a. Mitochondrial DNA inheritance. *Nature*, 368: 817-818.
- SKIBINSKI, D.O.F.; GALLAGHER, C. & BEYNON, C.M. 1994b. Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics*, 138: 801-809.
- SMITH, G.P. 1974. Unequal crossover and the evolution of multigene families. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 38: 507-513.
- SMITH, G.P. 1976. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossovers. *Science*, 191: 528-535.
- SNEATH, P.H. & SOKAL, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. Ed. W.H. Freeman, San Francisco.
- SOKAL, R.R. & ROHLF, F.J. 1995. *Biometry*, 3rd Ed. W.H. Freeman and Company, New York.
- SOOT-RYEN, T. 1955. A report on the family Mytilidae (Pelocypoda). *Allan Hancock Pacif. Exped.*, 20: 1-175.
- SOOT-RYEN, T. 1969. Family Mytilidae Rafinesque 1815. En: *Treatise on Invertebrate Paleontology*. Ed. R.C. Moore. Geological Society of America and University of Kansas Press, Lawrence. Part N, Vol. 1, Mollusca 6, Bivalvia, pp. N271-N280.
- STEINER, G. & MÜLLER, M. 1996. What can 18S rDNA do for bivalve phylogeny?. *J. Mol. Evol.*, 43: 58-70.
- STEPHAN, W. 1989. Tandem-repetitive noncoding DNA: forms and forces. *Mol. Biol. Evol.*, 6: 198-212.
- STEPHAN, W. & CHO, S. 1994. Possible role of natural selection in the formation of tandem-repetitive noncoding DNA. *Genetics*, 136: 333-341.
- 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.
- STRACHAN, T.; WEBB, D. & DOVER, G. 1985. Transition stages of molecular drive in multiple-copy DNA families in *Drosophila*. *EMBO J.*, 4: 1701-1708.
- SUBIRANA, J.A. 1983. Nuclear proteins in spermatozoa and their interactions with DNA. En: *The Sperm Cell*. Ed. J. André. The Hague, Martinus Nijhoff, pp. 197-214.
- SUCHANEK, T.H. 1985. Mussels and their role in structuring rocky shore communities. En: *Ecology of Rocky Coasts*. Eds. P.G. Moore & R. Seed. Hodder and Stoughton, Sevenoaks, Kent, pp. 70-96.

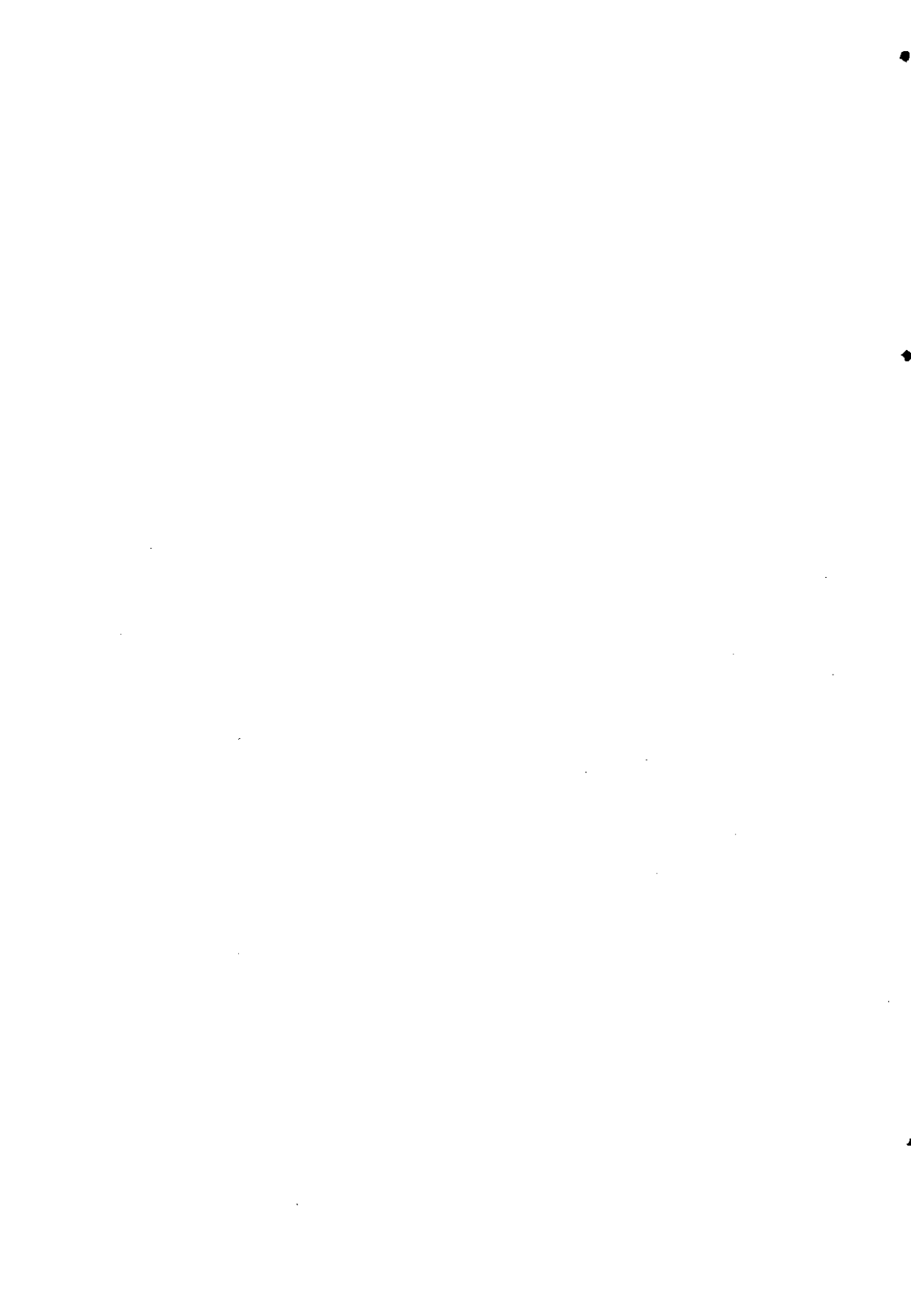
- SWANSON, M.E.; STURNER, S.F. & SCHWARTZ, J.H. 1990. Structure and expression of the *Aplysia californica* calmodulin gene. *J. Molec. Biol.*, 216: 545-553.
- SWIFT, H. 1950. The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 36: 643-654.
- SWOFFORD, D.L. & SELANDER, 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.
- TARES, S.; CORNUET, J.M. & ABAD, P. 1993. Characterization of an unusually conserved *AluI* highly reiterated DNA sequence family from the honeybee, *Apis mellifera*. *Genetics*, 134: 1195-1204.
- TAUTZ, D.; TRICK, M. & DOVER, G.A. 1986. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322: 652-656.
- 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-QUIÉVREUX, C. 1984. Chromosome analysis of three species of *Mytilus* (Bivalvia: Mytilidae). *Mar. Biol.*, 5: 265-273.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAC, 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.
- TRICK, M. & DOVER, G. 1984. Unexpectedly slow homogenization within a repetitive DNA family shared between two subspecies of tsetse fly. *J. Mol. Evol.*, 20: 322-329.
- UGARKOVIC, D.; PETITPIERRE, E.; JUAN, C. & PLOHL, M. 1995. Satellite DNAs in tenebrionid species: structure, organization and evolution. *Croat. Chem. Acta*, 68: 627-638.
- UGARCOVIC, D.; PLOHL, M. & GAMULIN, V. 1989. Sequence variability of satellite DNA from the mealworm *Tenebrio molitor*. *Gene*, 83: 181-183.
- VÄINÖLÄ, R. & HVILSOM, 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.
- VAN DEN BUSCHE, R.S.; BAKER, R.J.; WICHMAN, H.A. & HAMILTON, M.J. 1993. Molecular phylogenetics of Stenodermatini bat genera: congruence of data from nuclear and mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, 10: 944-959.
- 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.

- VERDUIN, A. 1979. Conchological evidence for the separate specific identity of *Mytilus edulis* L. and *M. galloprovincialis* Lamarck. *Basteria*, 43: 61-80.
- 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.
- VOGT, P. 1990. Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a highly conserved "chromatin folding code". *Human Genet.*, 84: 301-336.
- VOGT, P. 1992. Code domains in tandem repetitive DNA sequence structures. *Chromosoma*, 101: 585-589.
- VOLCKAERT, 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*. Ed. S.T. Springer, Berlin. Vol. 19, pp. 55-74.
- WALSH, J.B. 1987. Persistence of tandem arrays: implications for satellite and simple-sequence DNAs. *Genetics*, 115: 553-567.
- WEINSTEIN, H. & MEHLER, E.L. 1994. Ca²⁺ binding and structural dynamics in the functions of calmodulin. *Ann. Rev. Physiol.*, 56: 213-236.
- WENNE, R. & SKIBINSKI, D.O.F. 1995. Mitochondrial DNA heteroplasmy in European populations of the mussel *Mytilus trossulus*. *Mar. Biol.*, 122: 619-624.
- WIJERS, E.R.; ZIJLSTRA, C. & LENSTRA, J.A. 1993. Rapid evolution of horse satellite DNA. *Genomics*, 18: 113-117.
- WILKINS, N.P.; FUJINO, K. & GOSLING, E.M. 1983. The Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in Japan. *Biol. J. Linn. Soc.*, 20: 365-374.
- WILLARD, H.F. 1991. Evolution of alpha satellite. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 1: 509-514.
- WINNEPENNINCKX, B.; BACKELJAU, T. & DEWACHTER, R. 1994. Small ribosomal subunit RNA and the phylogeny of Mollusca. *Nautilus*, 2: 98-110.

- WINNEPENINCKX, B.; BACKELJAU, T. & DEWACHTER, R. 1996. Investigation of molluscan phylogeny on the basis of 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.*, 13: 1306-1317.
- WRIGHT, J.M. 1989. Nucleotide sequence, genomic organization and evolution of a major repetitive DNA family in tilapia (*Oreochromis mossambicus/hornorum*). *Nucleic Acids Res.*, 17: 5071-5079.
- 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.
- ZINKOWSKI, R.P.; MEYNE, J. & BRINKLEY, B.R. 1991. The centromere-kinetochore complex: a repeat subunit model. *J. Cell Biol.*, 113: 1091-1110.
- 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. 1984a. Minimal selection requirements for the correlation between heterozygosity and growth, and for the deficiency of heterozygotes, in oyster populations. *Dev. Genet.*, 4: 393-405.
- ZOUROS, E. & FOLTZ, D.W. 1984b. Possible explanations of heterozygote deficiency in bivalve molluscs. *Malacologia*, 25: 583-591.
- ZOUROS, E.; ROMERO-DOREY, M. & MALLET, A.L. 1988. Heterozygosity and growth in marine bivalves: further data and possible explanations. *Evolution*, 42: 1332-1341.



8. APÉNDICE



8.1. ABREVIATURAS

- **anti-Dig-AP:** anti-Digoxigenina-Fosfatasa alcalina.
- **BCIP (X-fosfato):** 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-fosfato, 4-toluidine salt.
- **CaM:** calmodulina.
- **CSPD®:** Disodium 3-(4-methoxypro [1, 2 -dioxitane-3, 2'-(5'-cloro) tricyclo [3. 3. 1. 1^{3,7}] decan} -4-yl) fenyl fosfato).
- **DUI:** herencia doble uniparental.
- **Glu-5':** extremo 5' del exon gigante de la proteína polifenólica adhesiva del biso.
- **IPTG:** isopropyl β-D-thiogalacto-pyranoside.
- **ITS:** espaciador transcrito interno.
- **m:** pares cromosómicos metacéntricos.
- **NBT:** 4-Nitroblue tetrazolium chloride.
- **NRPP:** región no repetitiva de la proteína del pie 1.
- **ns/nt:** relación transiciones/transversiones.
- **PHI-1:** proteína *protamine-like* esperma-específica PLIII ó φ1.
- **Pi:** número de sitios polimórficos.
- **PL:** *protamine-like*.
- **sm:** pares cromosómicos submetacéntricos.
- **st:** pares cromosómicos subteloicéntricos.
- **X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3indolyl-β-D-galactopyranoside

8.2. SOLUCIONES UTILIZADAS

Extracción de ADN genómico

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

Extracción de ADN plasmídico

- **Medio LB:** 10mg/ml de Triptona, 5mg/ml de Levadura, 10mg/ml de NaCl.
- **Tampón glucosa:** 50mM glucosa, 10mM EDTA, 25mM Tris-ClH pH 8.0. Guardar a 4°C.
- **Tampón de lisis:** 0.2N NaOH, 1% SDS.
- **Solución acetato potásico:** 3M acetato potásico pH 4.8, 2M ácido acético glacial.

Electroforesis y cuantificación de ADN

- **TAE:** 40mM Tris-acetato, 1mM 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 XIII (Roche):** consiste en 15 fragmentos de entre 100 y 1500pb, en múltiplos de 100pb, y un fragmento adicional de 2642pb. Las bandas de 500 y 1000pb son aproximadamente 2 ó 3 veces más intensas que el resto.
- **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.

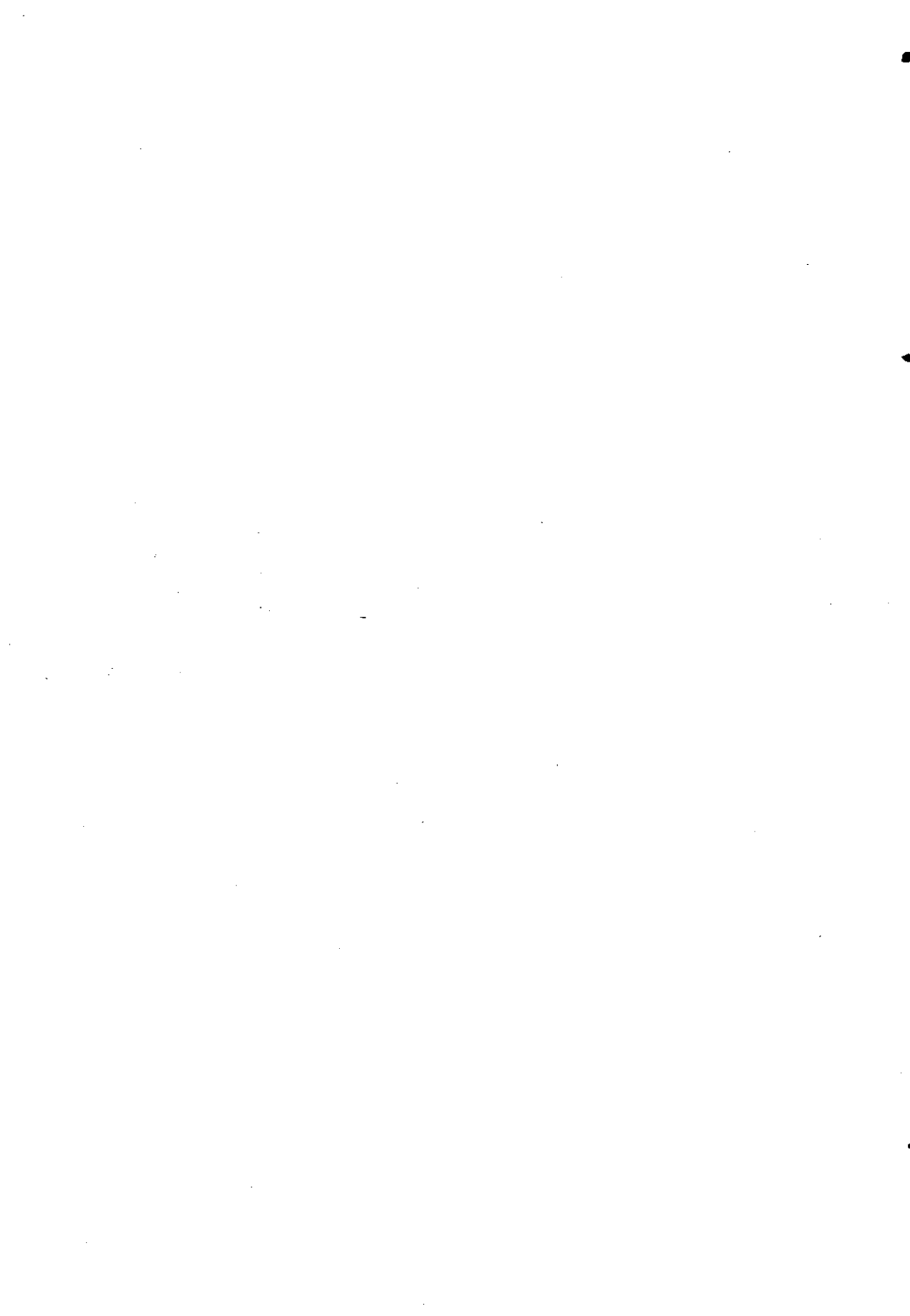
- **ADN marcador VIII marcado con digoxigenina (Roche):** es una mezcla de ADN de pUCBM21 digerido con Hpa II y ADN de pUCBM21 digerido con Dra I y Hind III, que produce los fragmentos de 19, 26, 34, 34, 37, 67, 110, 124, 147, 190, 242, 320, 404, 489, 501, 692, 900 y 1114 pb.

Hibridación Southern y Dot blot

- **10xSSC, 2xSSC y 0.1xSSC:** se preparan a partir de una solución stock 20xSSC; 3M ClNa, 0.3M 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, 25ng/ml de sonda marcada con digoxigenina.
- **Tampón de ácido maleico:** 0.1M ácido maleico, 0.15M 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:** 0.2M NaOH, 0.1% SDS.
- **Tampón bloqueante:** Blocking de Roche 1% en tampón de ácido maleico.
- **Tampón de detección:** 0.1M Tris-ClH pH 9.5, 0.1M ClNa, 50 mM MgCl₂.

Hibridación *in situ* fluorescente

- **Solución de pepsina:** pepsina al 10% en 100nM ClH.
- **PBS:** 140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄.
- **Solución de formaldehido:** Formaldehido al 10%, 50mM MgCl₂ en PBS.
- **Solución de formamida:** Formamida al 20%, 0.2xSSC pH 7.0.
- **TNT:** 1M Tris-ClH/ 1.5mM ClNa pH 7.5, 10% Tween 20.
- **TNB:** 0.1M Tris-ClH/ 0.15M ClNa, 0.5% Blocking de Roche.



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700759550



UNIVERSIDADE DA CORUÑA