

## Consecuencias de la autofecundación sobre la tasa de crecimiento y supervivencia de *Argopecten purpuratus*

Consequences of self-fertilization on the growth rate and survival of *Argopecten purpuratus*

JE Toro<sup>a\*</sup>, MP Montoya<sup>a</sup>, V Martínez<sup>b</sup>, D Gutiérrez<sup>a</sup>, AM Vergara<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Biología Marina "Dr. Jürgen Winter", Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

<sup>b</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

<sup>c</sup>Instituto de Fomento Pesquero, Puerto Montt, Chile.

### SUMMARY

The Northern scallop, *Argopecten purpuratus*, is a hermaphrodite species which has a great economical importance in Chile and Perú. Hatchery techniques for juvenile production have been developed for this species, allowing the study of the potential effect of self-fertilization in the aquaculture of the Northern scallop. The present study produced several families of *A. purpuratus* in a hatchery using a factorial design, which allowed the statistical analyses of growth and survival of each family, with variable initial self-fertilization percentage. On the other hand, PCR-based molecular markers (RAPD) were developed which allowed the identification of self-fertilized individuals within each family. The percentage of self-fertilization was estimated initially and at 6, 9 and 12 months of age, observing a significant reduction of it in each of the experimental families. The results obtained allowed us to conclude that even if the self-fertilization has a negative effect on the development of the Northern scallop, this is only at individual level, affecting the growth and survival of the individuals which have been produced under that condition. However, those families produced by crossfertilization, which have variable self-fertilization percentages among them, are not significantly affected on their growth and survival, because the self-fertilization percentage is reduced gradually with the age of the individuals.

*Palabras clave:* autofecundación, crecimiento, supervivencia, *Argopecten purpuratus*.

*Key words:* self-fertilization, growth, survival, *Argopecten purpuratus*.

### INTRODUCCIÓN

El ostión del norte, *Argopecten purpuratus*, es un molusco bivalvo, hermafrodita funcional, de fecundación externa, que se distribuye por la costa pacífica desde Corinto en Nicaragua hasta Valparaíso en Chile, encontrándose en fondos arenosos y/o con grava hasta los 40 m de profundidad. Como recurso pesquero en Chile (Martínez y col 2007) y Perú (Tarazona y col 2007) posee un alto valor comercial. El número de centros de cultivo de ostión en Chile tuvo un importante incremento en los últimos 15 años, existiendo actualmente 252 centros de cultivo autorizados (Taud y Palacios 2003), con una producción que aumentó de 1.182 t en 1990 a 20.072 t en el año 2007 (SERNAPESCA 2007).

En los bancos naturales, la condición hermafrodita del ostión hace que inevitablemente existan grados variables de autofecundación, debido a que esta especie emite ambos tipos de gametos en un lapso de tiempo muy corto (Illanes 1988). La emisión de gametos se inicia con los espermatozoides y al cabo de un par de minutos continúa

con los ovocitos por el mismo conducto, lo cual genera un número variable de individuos autofecundados.

La autofecundación, por definición, se traduce en un aumento de la endogamia, la que a nivel genotípico genera una reducción de la heterocigosidad (Kristensen y Sorensen 2005). A nivel fenotípico, en cambio, la autofecundación reduce la viabilidad de los organismos debido a los efectos deletéreos de algunos alelos en estado homocigoto y a la depresión endogámica o reducción del valor fenotípico promedio de los caracteres cuantitativos relacionados con el crecimiento, supervivencia y la eficiencia fisiológica (Falconer y Mackay 1996). Además, la autofecundación es un mecanismo reproductivo que lleva a una pérdida de la variabilidad genética y afecta la capacidad de adaptación de un individuo, ya que incrementa el número de loci homocigotos (Tuan y Simões 1998, Zheng y col 2008). En *Crassostrea virginica* y *Mytilus edulis* se detectó una correlación positiva entre la tasa de crecimiento y la heterocigosidad, por lo que la autofecundación, que en teoría disminuye esta heterocigosidad, afectaría negativamente el crecimiento y supervivencia de estas especies (Gentili y Beaumont 1988, Toro y col 2008). Los individuos heterocigotos de una misma cohorte fueron en promedio más grandes que los homocigotos (Gentili y Beaumont 1988), lo que hizo pensar que la contribución de diferentes loci

Acceptado: 18.11.2009.

\* Casilla 567, Valdivia, Chile; jtoro@uach.cl

en esta relación sería aditiva, sin embargo, en *Mulinia lateralis* se observó que la contribución de los loci era de tipo diferencial (Koehn y col 1988).

Los efectos de la autofecundación se han estudiado en varias especies de moluscos bivalvos. Beaumont y Budd (1983) observaron en *Pecten maximus* una reducción significativa de la tasa de crecimiento de la larva véliger (de 18 días) en condiciones de cultivo. Por su parte, Tuan y Simões (1998) estudiaron la autofecundación en *Biomphalaria tenagophila* utilizando isoenzimas y microsatélites, demostrando que una desventaja que les otorga la característica de autofecundados a los individuos era la edad en que los individuos alcanzaban la madurez sexual, la cual era cada vez mayor a medida que pasaban las generaciones. Para otras especies del género *Argopecten*, Ibarra y col (1995) estimaron el efecto de la autofecundación sobre el crecimiento y la supervivencia en larvas de *Argopecten circularis*, en familias provenientes de autofecundación por cruzamientos y familias obtenidas a través de desove masivo. En su trabajo, además, se contrastó cada tipo de cruzamiento observándose diferencias significativas en el tamaño y mortalidad de los individuos al final del experimento en los 3 cruzamientos, siendo el crecimiento y la supervivencia de los individuos autofecundados significativamente menor.

La correcta identificación de los individuos autofecundados es un requisito para un diseño en que los ostiones de distintas familias se distribuyen al azar con el fin de cuantificar sus potenciales efectos en un programa de mejoramiento genético. Los marcadores moleculares RAPDs (random amplified polymorphic DNA) son para este propósito una buena alternativa para estudios de genética poblacional (Liu y Cordes 2004). Algunas ventajas de estos marcadores –con respecto a otras técnicas moleculares– son la rapidez, el menor costo y que sólo requiere una pequeña cantidad de ADN molde por reacción. Además, en esta técnica se utilizan regiones anónimas del ADN, por lo que no es necesario tener un conocimiento previo de la secuencia a amplificar y, además, los iniciadores aquí empleados permiten amplificar tanto ADN nuclear como mitocondrial. Considerando como desventaja de la técnica el hecho de que los loci RAPDs en su mayoría proveen marcadores bialélicos dominantes (Aagard y col 1998, García y Benzie 1995), es necesario estandarizar todas las variables posibles al momento de amplificar para que los patrones de bandas sean repetibles (Montoya 2005). Estos marcadores (RAPDs) han sido utilizados satisfactoriamente en estudios de genética poblacional en *Placopecten magellanicus* (Patwary y col 1994), *Nematostella vectensis* (Pearson y col 2002), *Perna canaliculus* (Star y col 2003), *Oreochromis niloticus* (Hassanien y col 2004), *Mytilus chilensis* (Toro y col 2004), *Rutilus rutilus caspicus* (Keyvanshokoo y Kalbassi 2006), *Momordica charantia* (Behera y col 2008). También se ha utilizado para la identificación de especies del género *Cerastoderma* (Andre y col 1999) diferenciar especies de

mitílidos (Rego y col 2002), para evidenciar fertilización cruzada en *Biomphalaria glabrata* (Vernon y col 1995) y para diferenciar morfos en la especie *Oersteddia dorsalis* (Sundberg y Andersson 1995). Vernon y col (1995), en la especie *B. glabrata*, determinaron que los RAPDs proveen el polimorfismo necesario para ser empleados en la diferenciación de progenies producidas por autofecundación y cruzamiento. Estos autores observaron que cuando un individuo provenía de fertilización cruzada todos los patrones de banda tenían la combinación de bandas de ambos padres.

De acuerdo a su biología reproductiva, el ostión del norte es una especie idónea para estudiar los efectos de la autofecundación sobre la tasa de crecimiento y la supervivencia. Además, la identificación de los individuos autofecundados es indispensable para determinar sus efectos en las familias producto de fecundación entre distintos reproductores.

El objetivo del presente trabajo fue cuantificar molecularmente la autofecundación y su efecto sobre la viabilidad y el crecimiento, en familias obtenidas por cruzamiento dirigido, identificando los individuos autofecundados por medio de marcadores moleculares RAPDs.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Ostiones adultos (*A. purpuratus*) provenientes de bancos naturales del norte de Chile (IV Región) fueron utilizados para generar 49 familias mediante un diseño de cruzamiento factorial con 7 hembras y 7 machos (7 x 7). Del total de familias obtenidas, 7 fueron autofecundadas y las 42 restantes se obtuvieron por los cruzamientos entre reproductores. Los desoves y el cultivo larval fueron realizados de acuerdo a Toro y col (2003). Debido a que los ostiones desovan primero como macho y luego como hembra, después de 3 pulsos de espermatozoides los ostiones se trasladaron a nuevos recipientes con agua de mar para el desove como hembra. Previo a efectuar los cruzamientos se tomaron muestras de los ovocitos de cada uno de los ostiones (3 alícuotas por hembra), las que se mantuvieron en agua de mar durante 12 horas, para luego fijarlas y establecer, por medio de observación directa al microscopio, el porcentaje inicial de ovocitos fecundados por hembra (Toro y col 2009). Las familias obtenidas se mantuvieron en estanques de 200 l (N = 49) con agua de mar filtrada y esterilizada. A los 2 (larva trocófora), 5 (larva D) y 15 días postfecundación (larva con ojo) se tomaron muestras de cada estanque (con 3 réplicas) para cuantificar el número inicial de larvas en cada familia. El agua de los estanques se cambió diariamente y se adicionó una mezcla de microalgas (*Isochrysis* sp. y *Chaetoceros* sp.) a una concentración conocida (Martínez y col 1995). A los 30 días de cultivo larval se colocaron mallas japonesas “netlon” en los estanques como sustrato para la fijación de las larvas (Winkler y Estévez 2003). Los juveniles allí fijados se mantuvieron en el laboratorio

por 3 meses, para luego ser trasladados al mar en líneas de cultivo en la Bahía de Hueihue, Chiloé.

A los 7 meses de edad, 200 ostiones de cada familia fueron medidos (mm) y pesados (mg) según Winkler y Estévez (2003) y marcados en forma individual (Toro y col 1995), lo que permitió mezclar los individuos de todas las familias, evitando así el efecto ambiental. Los ejemplares experimentales se dispusieron en redes cilíndricas (Kafucu y Ikenoue 1983) de 10 pisos con una densidad de 50 individuos por piso, reduciéndose a 25 ostiones por piso a los 9 meses de edad. Los datos de peso vivo y longitud de la valva se obtuvieron a los 6, 9 y 12 meses de edad, analizándose mediante un modelo de regresión lineal simple con el paquete estadístico SAS. Para este análisis se utilizaron los valores iniciales de autofecundación de cada una de las hembras. Se estimó también la productividad del peso y la talla, medidos como el incremento en mg o mm respectivamente, correspondiente a los 90 días entre cada muestreo. El análisis de varianza permitió determinar si los efectos de la autofecundación fueron estadísticamente significativos. Junto con lo anterior y luego de obtener el porcentaje de mortalidad por familia a los 9 y 12 meses, se llevó a cabo un análisis de varianza (con datos transformados a arcoseno) con el fin de establecer si los porcentajes iniciales de autofecundación en las familias de cruzamiento tuvieron un efecto significativo sobre la mortalidad.

Para los análisis genético-moleculares se obtuvieron muestras de larvas de 10 días de cada uno de los estanques ( $N = 50$ ), juveniles de 3 meses de edad ( $N = 50/\text{familia}$ ) y adultos de 10 meses de edad ( $50/\text{familia}$ ), las cuales fueron fijadas en etanol al 95% y almacenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis genético. Además, los reproductores que dieron origen a estas familias también fueron muestreados luego del desove, tomando una muestra de músculo, borde del manto y gónada, tejidos que también fueron fijados en etanol al 95%. De cada muestra fijada se tomó un trozo de tejido (30-60 mg), el que fue trozado finamente y puesto en tubos Eppendorf conteniendo tampón de lisis (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 20 mM NaCl), al que se agregaron SDS al 20% y 200  $\mu\text{g}$  de proteinasa K, incubado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 12 h. Luego se llevó a cabo la extracción de ADN con 500  $\mu\text{L}$  de una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol Isoamílico (25:24:1). Los tubos se centrifugaron a 6.500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y el ADN fue precipitado con 800  $\mu\text{L}$  de etanol 95% (a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Posteriormente se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , descartándose el sobrenadante. Para el secado del sedimento, los tubos se pusieron invertidos sobre papel absorbente hasta la completa evaporación del etanol. El ADN se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril y se mantuvo a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su amplificación. En el caso de la extracción de las muestras de larvas, el sedimento de ADN fue resuspendido en 50  $\mu\text{L}$ .

La amplificación de cada muestra (48 iniciadores) se realizó en un volumen de reacción de 25  $\mu\text{L}$  que contenía:

PCR-Buffer (Invitrogen), 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2  $\mu\text{M}$  de la mezcla de dNTP's, 0,4 mM de cada iniciador y 1 unidad de Taq polimerasa (Invitrogen), más 2  $\mu\text{L}$  de la correspondiente dilución 1:10 de ADN genómico. Para las amplificaciones se utilizó un Termociclador AmpliTron II (ThermoLyne) y un programa cuyos parámetros cíclicos de temperatura fueron: un período de desnaturalización del ADN a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 s, seguido de 35 ciclos de:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 s,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 s,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min. En cada reacción se incorporó una escala estándar de 1Kb (Promega) y un control negativo (sin ADN). Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1,2% utilizando un buffer TBE 0,5X (44,5 mM tris base, 44,5 mM ácido bórico, 1M EDTA, pH 8) por aproximadamente 2 horas, a 80 V. La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio, la visualización de las bandas se llevó a cabo en un transiluminador UV y el gel se fotografió con una cámara digital.

La identificación de individuos autofecundados dentro de las familias obtenidas por cruzamiento se llevó a cabo según: a) los patrones de banda de las hembras progenitoras, utilizando un mismo partidador y en las mismas condiciones de PCR, con una réplica para cada muestra; b) los patrones de banda de 12 individuos de cada una de las siete familias autofecundadas, y c) los patrones de banda de 40 individuos en su etapa larval y semilla (para cada familia) y los patrones de banda de 30 individuos de cada una de las 10 familias obtenidas mediante cruzamiento, escogidas al azar en el último muestreo. Con esta información se estableció que un individuo era autofecundado cuando presentaba todas las bandas escogidas como marcadores (Vernon y col 1995). Posteriormente, se calculó el porcentaje de autofecundados en cada familia y en cada una de las etapas de muestreo (larvas, semillas y 10 meses de edad).

## RESULTADOS

### CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA

El porcentaje inicial de ovocitos fecundados por hembra correspondió a 14,16%, 45,76%, 14,50%, 18,03%, 17,90%, 23,20% y 9,96% para las hembras 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente (cuadro 1). La obtención de familias a través del diseño factorial permitió llegar al término del estudio (12 meses) con suficientes ejemplares en 25 familias, cuatro de las cuales fueron autofecundadas. En la figura 1 se grafica el comportamiento de la longitud de la valva durante tres etapas de desarrollo (6, 9 y 12 meses de edad). Se observó una disminución en la longitud de la valva a medida que aumentaron los porcentajes de autofecundación. Sin embargo, esta disminución sólo fue significativa a los 9 meses ( $P < 0,05$ ). Además, la productividad a la misma edad fue también significativa con una disminución que se correlaciona con el aumento en los porcentajes de autofecundación (figura 1). En la figura 1, además, se observa el comportamiento que

tuvo la ganancia de longitud de la valva en cada muestreo, donde el incremento debido al efecto en el aumento de la autofecundación fue significativo a los 6 y 9 meses de edad ( $P < 0,05$ ). En la figura 2 se grafica el carácter peso vivo del ostión, el cual disminuyó con el aumento de la

autofecundación, aunque este efecto sólo fue significativo a los 9 meses de edad ( $P < 0,05$ ). Este mismo comportamiento se observa en la figura 2 para la productividad del carácter peso vivo, para el cual el efecto que produce un aumento en el porcentaje de autofecundación sólo fue significativo a los 9 meses de edad ( $P < 0,05$ ). El efecto de la autofecundación sobre la mortalidad sólo fue significativo a los 9 meses de edad ( $P < 0,05$ ), a los 12 meses de edad este efecto dejó de ser significativo ( $P > 0,05$ ).

**Cuadro 1.** Porcentaje de individuos autofecundados (%) dentro de las familias de *A. purpuratus* producidas por cruzamiento en diferentes estadios de su ciclo de vida.

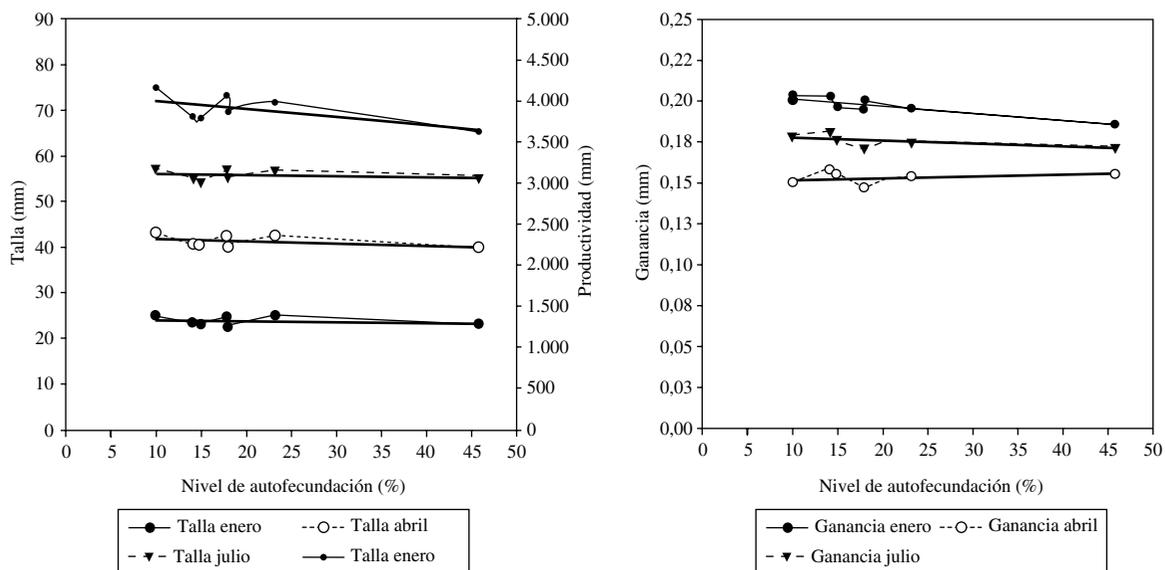
Percentage of self fertilization (%) within *A. purpuratus* families produced by crossing at different stages of their life cycle.

| Familia  | Hembra | % de Autofecundación |        |         |         |
|----------|--------|----------------------|--------|---------|---------|
|          |        | Inicial              | Larvas | Juvenil | Adultos |
| 8        | 2      | 45,8                 | 18,75  | 4,76    | 2,20    |
| 10       | 2      | 45,8                 | 20,00  | 6,60    | 0,00    |
| 15       | 3      | 14,9                 | 8,30   | 0,00    | 0,00    |
| 16       | 3      | 14,9                 | 14,28  | 7,28    | 5,13    |
| 19       | 3      | 14,9                 | 4,00   | 0,00    | 0,00    |
| 20       | 3      | 14,9                 | 14,28  | 8,30    | 0,00    |
| 28       | 5      | 17,9                 | 7,69   | 0,00    | 0,00    |
| 36       | 6      | 23,2                 | 0,00   | 0,00    | 2,56    |
| 38       | 6      | 23,2                 | 14,28  | 5,00    | 3,23    |
| 39       | 6      | 23,2                 | 0,00   | 0,00    | 0,00    |
| Promedio |        | 23,8                 | 7,20   | 4,94    | 1,56    |

MARCADORES MOLECULARES

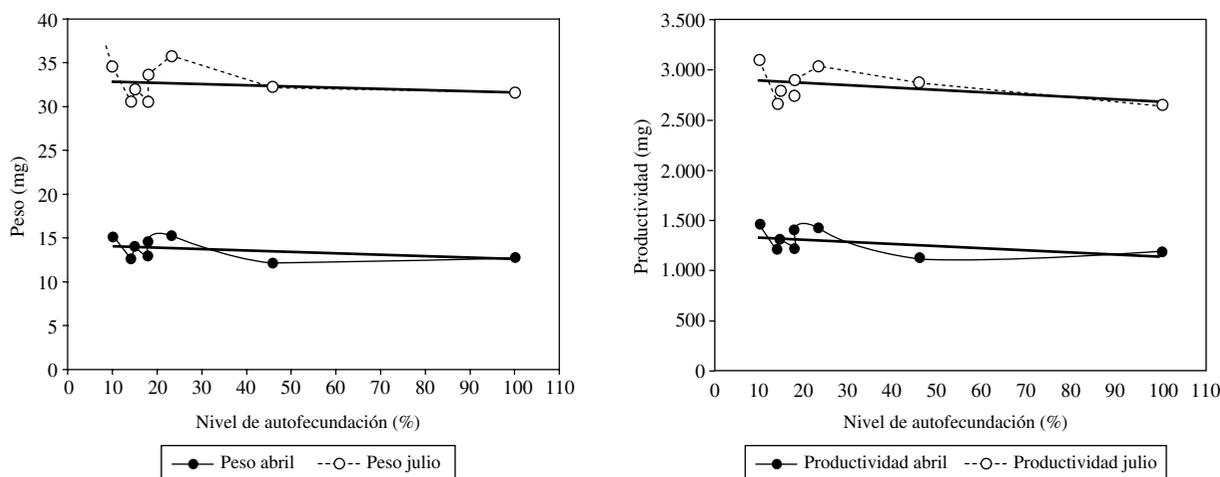
De los iniciadores analizados se seleccionó uno (5'-CCGGCCCCAA-3') para llevar a cabo los análisis de las muestras obtenidas en cada etapa del ciclo de vida del ostión. Este iniciador permitió discriminar con claridad los patrones de bandas y presentó una alta repetibilidad. Las muestras amplificadas de las familias permitieron determinar el patrón de bandas de la hembra progenitora y el patrón de los autofecundados. El cuadro 1 muestra los porcentajes de autofecundación en cada una de las 10 familias y para cada una de las hembras progenitoras, observándose una reducción de los porcentajes de autofecundación en las distintas etapas del ciclo de vida. El análisis de varianza estableció que la disminución de los autofecundados dentro de las familias obtenidas por cruzamiento fue estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

Los análisis de varianza para comparar la longitud de la valva y el peso vivo del ostión entre las familias de autofecundados y las obtenidas a través de cruzamiento indican diferencias significativas para la longitud de la valva,



**Figura 1.** Productividad y ganancia en longitud de la valva (mm) a los 6, 9 y 12 meses de edad en relación al nivel de autofecundación en las familias de *A. purpuratus* provenientes de cruzamiento.

Productivity and gain in shell length (mm) at 6, 9 and 12 months of age in relation to the self fertilization level within families of *A. purpuratus* produced by crossing.



**Figura 2.** Comportamiento del peso vivo (mg) y su productividad a los 9 y 12 meses de edad, en relación al nivel de autofecundación en familias de *A. purpuratus* producidas por cruzamiento.

Behaviour of the live weight (mg) and its productivity at 9 and 12 months of age in relation to the self fertilization level within families *A. purpuratus* produced by crossing.

mientras que para el peso vivo sólo mostró un F significativo a los 9 meses de edad (Toro y col 2009). Estas diferencias indican que el crecimiento (peso vivo y longitud de la valva) y supervivencia de los individuos autofecundados es menor ( $P < 0,05$ ). La diferencia entre la tasa de supervivencia de las familias autofecundadas, comparada con la de las familias provenientes de cruzamiento es significativa, e indica a su vez que la supervivencia se ve negativamente afectada por la autofecundación ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

Los porcentajes de autofecundación obtenidos en los ejemplares utilizados en los cruzamientos durante el presente estudio variaron entre 9,96% y 45,76% en los ostiones N° 7 y N° 2 respectivamente, valores que están dentro de los rangos descritos en la literatura para esta especie (Winkler y Estévez 2003). Lo interesante es que a pesar de haber tenido altos porcentajes de autofecundación iniciales, las familias formadas con estos ovocitos presentaron porcentajes cercanos al 1% a los 12 meses de edad (estado adulto). Debido a que el presente estudio involucró mantener los organismos experimentales hasta la etapa adulta, fue posible establecer que hubo una mortalidad específica asociada a las larvas y juveniles producidos por autofecundación. Ello permite inferir que al momento de realizar con esta misma cohorte cruzamientos para producir una segunda generación, el número de individuos autofecundados sería menor al 1%. Cabe destacar que la mayoría de los estudios en moluscos hermafroditas que se han realizado hasta ahora sólo han cuantificado diferencias para la tasa de crecimiento y supervivencia entre las familias generadas por autofecundación y las producidas por cruzamiento en los primeros estadios larvales o en etapas juveniles iniciales. Los efectos de

la autofecundación sobre distintos caracteres fenotípicos descritos en la literatura (Beaumont y Budd 1983, Ibarra y col 1995, Tuan y Simões 1998, Winkler y Estévez 2003, Martínez y col 2007, Martínez y Di Giovanni 2007, Zheng y col 2008) son muy variables, observándose que la edad de los organismos al momento de ser evaluados tiene un efecto significativo. Winkler y Estévez (2003) estudiaron los efectos de la autofecundación en los primeros estadios de desarrollo (140 d) de *A. purpuratus* y concluyeron que no existe diferencia en el crecimiento y la supervivencia de larvas y juveniles de ostiones al comparar familias producidas por cruzamiento versus las producidas por autofecundación. Los resultados del presente estudio concuerdan con los resultados obtenidos por Winkler y Estévez (2003) ya que en juveniles de hasta 180 días no se observaron diferencias en longitud de la valva y peso vivo entre las familias de autofecundados y las provenientes de cruzamientos. En el caso de *Pecten maximus* (Beaumont y Budd 1983) y *Argopecten circularis* (Ibarra y col 1995), la autofecundación afectó la tasa de crecimiento durante la etapa larval en *P. maximus* y la tasa de crecimiento y supervivencia en larvas de *A. circularis*. Zheng y col (2008) en *A. irradians irradians*—otra especie de ostión hermafrodita—observaron también que las familias producidas por autofecundación presentaron menores tasas de crecimiento y supervivencia que aquellas producidas por cruzamiento en las diferentes etapas del ciclo de vida, incluyendo las formas larvales y hasta los 160 días de edad. El presente estudio, a diferencia de los citados anteriormente, logró identificar por medio de marcadores moleculares los individuos autofecundados dentro de las familias producidas por cruzamiento, y además mantuvo los individuos de las familias experimentales hasta los 360 días de edad, lo cual permitió observar cómo los porcentajes de autofecundación en

esas familias fueron disminuyendo durante las distintas etapas de su ciclo de vida.

Al revisar la literatura científica es posible observar que existen muy pocos trabajos destinados a identificar a los individuos autofecundados dentro de familias generadas por cruzamiento en organismos hermafroditas. Vernon y col (1995) realizaron un estudio para identificar los individuos producidos por cruzamiento dentro de familias del caracol (también hermafrodita funcional) *Biomphalaria glabrata* utilizando marcadores RAPDs. Los autores en ese estudio lograron identificar los patrones de bandas que eran propios de cada uno de los individuos provenientes de cruzamiento. En el presente trabajo, el marcador RAPD permitió amplificar ADN a partir de muy pequeñas cantidades de tejido, incluso utilizando las larvas de ostión, cuyos tamaños están alrededor de los 120  $\mu\text{m}$ . Las amplificaciones logradas fueron de muy buena calidad y repetibles en todas las familias analizadas. Los demás iniciadores analizados fueron descartados de los análisis debido a que presentaron un polimorfismo muy reducido o, por el contrario, revelaron un número muy elevado de bandas, resultando muy difíciles de interpretar.

Al comparar los resultados de crecimiento y supervivencia, los análisis de varianza muestran diferencias significativas entre las familias autofecundadas y las de cruzamiento a partir de los 270 días de edad para la mayoría de los rasgos medidos. El análisis estadístico que se llevó a cabo para observar los efectos de la autofecundación dentro de las familias generadas por cruzamiento sobre el peso y la talla del ostión permitió concluir que el mayor efecto significativo ocurre a la edad de 9 meses. Este efecto negativo de los autofecundados dentro de las familias generadas por cruzamiento permite inferir que mientras mayores son los niveles de autofecundación dentro de una familia, menor es el crecimiento promedio de los ostiones y mayor la mortalidad de los mismos (figuras 1 y 2). La mortalidad larval inicial en este estudio no fue únicamente consecuencia de la autofecundación, ni tampoco del método de cultivo. Según Avendaño y col (2001) existen graves problemas que enfrenta actualmente la producción artificial de juveniles de *A. purpuratus*, uno de los cuales se expresa como un estancamiento en el crecimiento de las larvas entre los 122 y 135  $\mu\text{m}$ , que va acompañado de una alta tasa de mortalidad, cercana al 100%. Este tipo de larvas con bajo crecimiento se observó también en el presente estudio. Estas tienen apariencia globosa y se asocian a ovocitos que no han alcanzado una madurez plena. Otro problema detectado es la aparición de larvas anormales a las 48 horas de edad, las que se caracterizan por presentar valvas desiguales y ondulaciones en su contorno, impidiendo su cierre. La aparición de estas larva podría estar relacionada con la utilización de una muy alta concentración de espermios (poliespermia) que causaría un daño estructural en ovocitos maduros de apariencia

normal (Avendaño y col 2001). Ambos problemas serían los responsables de la baja producción de juveniles en laboratorio en esta especie actualmente (Avendaño y col 2001). Esta información es importante para no sobrestimar la mortalidad causada por autofecundación en esa etapa del ciclo de vida del ostión.

En estos organismos la autofecundación provoca un aumento en el número de loci en estado homocigoto, aumentando en rigor la endogamia que provoca efectos negativos sobre el crecimiento y supervivencia de los organismos. Ello como resultado de la expresión de alelos deletéreos parcialmente recesivos, con lo cual habría una pérdida de la ventaja que otorga la heterocigosidad (Falconer y Mackay 1996). En este contexto existen trabajos cuyo objetivo ha sido determinar la relación que existe entre la heterocigosidad y caracteres tales como supervivencia, fecundidad y crecimiento. Rodhouse y col (1986) observaron en *Mytilus edulis* que a edad temprana la correlación entre grado de heterocigosidad multilocus y tasa de supervivencia es positiva y significativa, mientras que en el estado adulto se observa una correlación positiva con la producción de gametos. Lo anterior se explica por el hecho de que una vez alcanzada la madurez sexual la energía que los individuos utilizan en crecimiento estaría enfocada hacia parámetros reproductivos (Toro y Vergara 1998). Blot y Thiriot-Quievreux (1988) correlacionaron la tasa de supervivencia relativa de *Mytilus desolationis* con la heterocigosidad y observaron que la supervivencia fue mayor en los individuos más heterocigotos. Toro y col (1996) en *Ostrea chilensis* y Álvarez y col (1989) en *Ostrea edulis* demostraron también que la tasa de crecimiento está positivamente correlacionada con la heterocigosidad multilocus. Estos estudios muestran evidencia que la constitución genética de los organismos producidos por autofecundación, con un reducido grado de heterocigosidad individual, tendría un efecto negativo en variables tales como su tasa de crecimiento y tasa de supervivencia (Kristensen y Sorensen 2005).

Los resultados obtenidos en el presente estudio corroboran lo observado en estudios previos en pectínidos hermafroditas, en los cuales se evidenció un efecto negativo entre las familias generadas por autofecundación y las obtenidas por cruzamiento. En el presente estudio que mantuvo los ejemplares experimentales hasta la etapa adulta se pudo observar que los efectos de la autofecundación dentro de las familias generadas por cruzamiento no fueron significativos en los estadios adultos, lo cual es corroborado por medio de los análisis de los marcadores moleculares y los análisis estadísticos. Lo anterior se fundamenta en una disminución significativa y gradual de individuos autofecundados dentro de estas familias y, por ende, de sus efectos sobre el crecimiento, supervivencia y parámetros genéticos (Martínez y Di Giovanni 2007) a medida que se avanza en el ciclo de vida de *A. purpuratus*.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al personal del Centro Hueihue del Instituto de Fomento Pesquero y a la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile. Estudio financiado por los proyectos FDI 02C8PT-05 y Fondecyt 1095061.

## RESUMEN

El ostión del norte, *Argopecten purpuratus*, es una especie hermafrodita de gran interés comercial en Chile. Se han desarrollado técnicas para la producción de juveniles en laboratorio, lo cual permite utilizar a esta especie para estudios de los potenciales efectos que tendría la autofecundación en los cultivos del ostión del norte. En el presente trabajo se generaron en el laboratorio varias familias de *A. purpuratus* utilizando una matriz factorial de cruzamientos, lo que permitió realizar un análisis estadístico de datos de longitud de valva, peso vivo y supervivencia de cada una de las familias, con distintos porcentajes de autofecundación inicial. Por otra parte, se desarrollaron marcadores moleculares basados en la reacción PCR (RAPD), que permitieron identificar a los individuos autofecundados dentro de cada una de las familias producidas. Se estimó el porcentaje de autofecundados a los 6, 9 y 12 meses de edad, observando una reducción significativa de éstos en cada una de las familias experimentales. Los resultados permiten concluir que si bien la autofecundación afecta de manera negativa el desarrollo del ostión del norte, este efecto se refleja directamente en forma individual, afectando la aptitud biológica de los individuos producidos bajo dicha condición. Sin embargo, las familias generadas por cruzamiento, que tienen porcentajes de autofecundación variables dentro de ellas, no se ven significativamente afectadas, ya que éste disminuye en forma gradual con la edad.

## REFERENCIAS

- Aagaard JE, KV Kruttovski, SH Strauss. 1998. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. *Heredity* 81, 69-78.
- Álvarez G, C Zapata, R Amaro, A Guerra. 1989. Multilocus heterozygosity at protein loci and fitness in the European Oyster *Ostrea edulis* L. *Heredity* 63, 359-372.
- Andre C, M Lindgarth, PR Johnson, P Sundberg. 1999. Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD) differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. *J Mar Biol Ass*, UK 79, 563-565.
- Avendaño M, M Le Pennec, M Cantillán. 2001. Anormalidades en larvas de *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Pectinidae), uno de los problemas en la producción artificial de semilla. *Estud Oceanol* 20, 33-42.
- Beaumont AR, MD Budd. 1983. Effects of self-fertilisation and other factors on the early development of the scallop *Pecten maximus*. *Mar Biol* 76, 285-289.
- Behera TK, AB Gaikward, AK Singh, JE Staub. 2008. Relative efficiency of DNA markers (RAPD, ISSR and AFLP) in detecting genetic diversity of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *J Sci Food Agr* 88, 733-737.
- Blot M, C Thiriot-Quievreux. 1988. Multiple locus fitness in a transfer of adult *Mytilus desolationis* (Mollusca, Bivalvia). *23 European Marine Symposium*, University of Wales, UK, Pp 259-264.
- Falconer DS, T Mackay. 1996. Introduction to quantitative genetics. 4<sup>th</sup> ed. Longman Group Limited, London, UK.
- García DK, JAH Benzie. 1995. RAPD markers of potential use in penaid prawn (*Penaeus monodon*) breeding program. *Aquaculture* 130, 137-144.
- Geniti MR, AR Beaumont. 1988. Environmental stress, heterozygosity, and growth rate in *Mytilus edulis* L. *J Exp Mar Biol Ecol* 120, 145-153.
- Hassanien HA, M Elnady, A Obeida, H Itriby. 2004. Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Aquac Res* 35, 587-593.
- Ibarra AM, P Cruz, B Romero. 1995. Effects of inbreeding on growth and survival of self-fertilized catarina scallop larvae, *Argopecten circularis*. *Aquaculture* 134, 37-47.
- Illanes JE. 1988. Experiencias de captación de larvas de ostión (*Argopecten purpuratus*) en Chile. En: Uribe E (ed). *Producción de larvas y juveniles de especies marinas*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile, Pp 53-57.
- Kafucu T, H Ikenoue. 1983. *Modern methods of aquaculture in Japan. Development in Aquaculture and Fisheries Science 11*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Keyvanshokoo S, MR Kalbassi. 2006. Genetic variation of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew 1879) populations in Iran based on random amplified polymorphic DNA markers: a preliminary study. *Aquac Res* 37, 1437-1440.
- Koehn RK, WJ Diehl, TM Scott. 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.
- Kristensen TN, AC Sorensen. 2005. Inbreeding - lessons from animal breeding, evolutionary biology and conservation genetics. *Anim Sci* 80, 121-133.
- Liu ZJ, JF Cordes. 2004. DNA markers technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1-37.
- Martínez G, LA Cáceres, E Uribe, H Pérez. 1995. Effects of different feeding regimens on larval growth and the energy budget of juvenile Chilean scallop, *Argopecten purpuratus* Lamarck. *Aquaculture* 132, 313-323.
- Martínez G, L Mettifofo, MA Pérez, C Callej. 2007. A method to eliminate self-fertilization in a simultaneous hermaphrodite scallop. 1. Effects on growth and survival of larvae and juveniles. *Aquaculture* 273, 459-469.
- Martínez V, S Di Giovanni. 2007. Breeding programmes of scallops: effect of self-fertilization when estimating genetic parameters. *Aquaculture* 272, 287.
- Montoya MP. 2005. Estudios genético moleculares y cuantitativos de la autofecundación en el ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck 1819). *Tesis Magister*, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.
- Patwary MU, EL Kenchington, CJ Bird, E Zouros. 1994. The use of random amplified polymorphic DNA markers in genetics studies of the sea scallop *Placopecten magellanicus* (Gmelin, 1791). *J Shellfish Res* 13, 547-553.
- Pearson CVM, AD Rogers, M Shearer. 2002. The genetic structure of the rare lagoonal sea anemone, *Nematostella vectensis* Stephenson (Cnidaria; Anthozoa) in the United Kingdom based on RAPD analysis. *Mol Ecol* 11, 2285-2293.
- Rego I, A Martínez, A González-Tizón, J Veites, F Leiva, J Méndez. 2002. PCR technique for identification of mussel species. *J Agric Food Chem* 50, 1780-1784.
- Rodhouse PG, JH McDonald, TIR Newell, RK Koehn. 1986. Gamete production, somatic growth and multiple-locus enzyme heterozygosity in *Mytilus edulis*. *Mar Biol* 90, 209-214.
- SERNAPESCA, Servicio Nacional de Pesca. 2007. *Anuario estadístico de pesca*. Ministerio de Economía Fomento y Reconstrucción, Santiago, Chile.
- Star B, S Apte, JPA Gardner. 2003. Genetic structuring among populations of the greenshell mussel *Perna canaliculus* revealed by analysis of randomly amplified polymorphic DNA. *Mar Ecol PS* 249, 171-182.
- Sundberg P, S Andersson. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intraspecific variation in *Oerstedtia dorsalis* (Hoploneurthea, Nemertea). *J Mar Biol Ass UK* 75, 483-490.
- Tarazona J, R Espinoza, M Solís, W Arntz. 2007. Crecimiento y producción somática de la concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en

- la Bahía Independencia, Pisco (Perú) comparados entre eventos El Niño y La Niña. *Rev Biol Mar Oceanog* 42, 275-285.
- Taud S, S Palacios. 2003. *La acuicultura en Chile*. Technopress SA, Salmon Chile, Santiago, Chile.
- Toro JE, MA Sanhueza, JE Winter, P Aguila, AM Vergara. 1995. Selection response and heritability estimates for growth in the Chilean oyster (*Ostrea chilensis* Philippi 1845). *J Shellfish Res* 14, 87-92.
- Toro JE, AM Vergara, R Galleguillos. 1996. Multiple-locus heterozygosity and physiology of the growth in different stages of the life cycle of the Chilean oyster *Ostrea chilensis* Philippi 1845. *Mar Ecol P S* 134, 151-158.
- Toro JE, AM Vergara. 1998. Growth and heterozygosity in a 12-month-old cohort of *Ostrea chilensis* obtained by mass spawning in the laboratory. *Mar Ecol* 19, 311-323.
- Toro JE, AC Alcapán, AM Vergara, JA Ojeda. 2003. Heritability estimates of larval and spat shell height in the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) produced under controlled laboratory conditions. *Aquac Res* 35, 56-61.
- Toro JE, JA Ojeda, AM Vergara. 2004. The genetic structure of *Mytilus chilensis* (Hupé 1854) populations along the Chilean coast based on RAPDs analysis. *Aquac Res* 35, 1466-1471.
- Toro JE, AC Alcapán, RA Stead. 2008. Pure mating and crosses between two geographically isolated populations of *Mytilus chilensis*: heterosis evaluation for the trait "shell length" during the larval period. *Arch Med Vet* 40, 299-303.
- Toro JE, MP Montoya, V Martínez. 2009. Efectos de la autofecundación sobre las varianzas aditiva, ambiental y fenotípica, y sobre el valor de la heredabilidad para el rasgo "longitud de la valva" en *Argopecten purpuratus*, utilizando un modelo animal. *Arch Med Vet* 41, 247-255.
- Tuan R, LCG Simões. 1998. Effect of self-fertilization on *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835) (Pulmonata: Planorbidae). *Gen Mol Biol* 21, 477-478.
- Vernon JG, C Jones, LR Noble. 1995. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers reveal cross-fertilisation in *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata: Basommatophora). *J Moll Stud* 61, 455-465.
- Winkler FM, B Estévez. 2003. Effects of self-fertilization on growth and survival of larvae and juveniles of the scallop *Argopecten purpuratus* L. *J Exp Mar Biol Ecol* 292, 93-102.
- Zheng H, G Zhang, X Guo, X Liu. 2008. Inbreeding depression for various traits in two cultured populations of the American bay scallop, *Argopecten irradians irradians* Lamarck (1819) introduced into China. *J Exp Mar Biol Ecol* 364, 42-47.