



## FACULTAD DE CIENCIAS

# PATRONES GENÉTICOS ESPACIALES EN POBLACIONES NATURALES Y DE CULTIVO DE *Mytilus chilensis* ASOCIADOS A LA VARIABILIDAD AMBIENTAL DEL SISTEMA RELONCAVÍ, PATAGONIA NORTE.

Por

CHAREL ROCÍO GONZÁLEZ SALINAS

TESIS PARA OPTAR AL  
GRADO DE MAGÍSTER EN ECOLOGÍA MARINA

Director de Tesis: CARLOS LARA

Co-Director de Tesis: NICOLÁS SEGOVIA

Co-Director de Tesis: BERNARDO BROITMAN

Concepción, Chile

2024



## FACULTAD DE CIENCIAS

PATRONES GENÉTICOS ESPACIALES EN POBLACIONES NATURALES Y DE CULTIVO DE *Mytilus chilensis*

ASOCIADOS A LA VARIABILIDAD AMBIENTAL DEL SISTEMA RELONCAVÍ, PATAGONIA NORTE.

Por

CHAREL ROCÍO GONZÁLEZ SALINAS

Tesis para optar al grado de Magíster en Ecología Marina

Charel González y Carlos Lara certifican que la investigación presentada es original y cumple con las normas establecidas para todo aspecto relativo a su ejecución.

Concepción, Chile

2024



Universidad Católica de la Santísima Concepción

## ACTA DE EXAMEN DE GRADO

En Concepción de Chile, a 17 de JUNIO de 2024 , vista y revisados los requisitos de Título/Grado presentados por:

Doña **CHAREL ROCÍO GONZÁLEZ SALINAS**

RUT 19189598-3

Alumna de la Carrera de **MAGISTER EN ECOLOGIA MARINA**

Sede **CONCEPCIÓN** Jornada **DIURNO**

De la Universidad Católica de la Santísima Concepción, la Comisión Examinadora ha otorgado las siguientes calificaciones:

**PATRONES GENÉTICOS ESPACIALES EN POBLACIONES NATURALES Y DE CULTIVO DE MYTILUS CHILENSIS ASOCIADOS A LA VARIABILIDAD AMBIENTAL DEL SISTEMA RELONCAVÍ, PATAGONIA NORTE.**

Nombre	Calificación
MARIBET GAMBOA MENDEZ MIEMBRO INTERNO COMISIÓN DE TESIS	6,50 (SEIS , CINCUENTA)
CLAUDIO GONZÁLEZ WEVAR MIEMBRO EXTERNO COMISIÓN DE TESIS	6,80 (SEIS , OCHENTA)
CARLOS LARA PEÑA DIRECTOR DE TESIS	
BERNARDO BROITMAN ROJAS CO-DIRECTOR DE TESIS	
IVAN HINOJOSA TOLEDO MINISTRO DE FE	
<b>CALIFICACION FINAL DE EXAMEN</b>	<b>6,65 (SEIS , SESENTA Y CINCO)</b>

  
SECRETARIO ACADÉMICO

  
DECANO

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido de forma directa e indirecta en este proceso. Primero, reconocer el apoyo de mis tutores, cuya guía y asesoramiento fueron fundamentales para la realización de esta investigación. En especial al Dr. Nicolás Segovia, quien me apoyó de principio a fin en este proceso. También agradezco a la Dra. Pilar Haye por recibirme en su laboratorio y por su valiosa contribución a mi formación académica, ética y personal, a pesar de no formar parte de mi comisión de tesis de Magíster.

Mi agradecimiento se extiende al programa, que me brindó su apoyo en varios ámbitos, especialmente a Mabel y al Dr. Iván Hinojosa, quienes estuvieron a mi lado durante situaciones pandémicas difíciles. A mis amigos de Concepción, Carla (amiga hermosa gracias por tanto), Leandra, Oscar, Genesis, Victor y Javier que hicieron de mi estadía en la ciudad y mi camino por el magister un momento muy agradable y de crecimiento personal. Una mención honrosa a mi amigo Felipe, quien no dejó de creer en mí y me alentó a seguir adelante en el camino de la investigación, también por su constante apoyo y compañía en los buenos momentos y en los no tan buenos. No puedo dejar de mencionar el apoyo de mi familia, en especial a mis padres, cuyo amor y aliento han sido mi fortaleza ahora y siempre, sin importar la distancia a la que nos encontremos. y a mi hermanita, que por el simple hecho de existir me alegra y fortalece el corazón. A mi segunda familia de Coquimbo, mis queridos Ladimares, profe Pilar, profe Julio, don Ruli, Nico, Niki, Carli y Carmen, se han ganado un lugar especial en mi corazón, además de apoyarme incondicionalmente en mi proceso formativo. Una mención especial para mi reciente compañero de vida, Niki, gracias por ser quién eres y por apoyarme emocional e intelectualmente en este proceso, *“te mar”*.

Por último, pero no menos importante, agradezco la colaboración del Laboratorio de Diversidad Marina (LADIMAR), UCN, que permitió la realización de mi tesis en sus espacios y que me apoyó intelectualmente en este proceso. También al proyecto FONDECYT iniciación 11220913 de Nicolás Segovia y al Instituto Milenio en Socio-Ecología Costera (SECOS) ICN2019-015 por financiar esta investigación (y a la investigadora).

## TABLA DE CONTENIDOS

Introducción .....	1
Hipótesis.....	5
Hipótesis 1.....	5
Hipótesis 2.....	5
Predicciones .....	5
Objetivos .....	6
Objetivo General .....	6
Objetivos Específicos.....	6
Métodos .....	7
Área de estudio .....	7
Obtención de datos genómicos .....	8
Obtención de Outliers .....	11
Análisis de diversidad y estructuración genética .....	11
Caracterización ambiental de los sitios de estudio.....	12
Asociación genómico-ambiental .....	13
Resultados .....	15
Discusión .....	23
Conclusiones.....	26
Referencias bibliográficas.....	27
Anexo.....	1

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de poblaciones de <i>Mytilus chilensis</i> en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile. N: número de individuos secuenciados. ....	10
Tabla 2. Diversidad genética de 97.704 SNPs neutrales y 18 SNPs Outliers de <i>Mytilus chilensis</i> en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile. Ar: Número efectivo de alelos; Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada y GIS: Coeficiente de consanguinidad. Las poblaciones fueron abreviadas de la siguiente manera: CHA_N: población natural de Chaparano; CHA_C: población cultivo de Chaparano; ILQ_N: población natural de Bahía Ilque; ILQ_C: población de cultivo de Bahía Ilque.....	16
Tabla 3. Contribución relativa de la temperatura máxima, la profundidad y el rango de la salinidad en el modelo optimizado de RDA para <i>Mytilus chilensis</i> del Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile. ....	21

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Desembarques de cultivos de *Mytilus chilensis* en la Región de los Lagos, Chile entre los años 2010-2022. ....1
- Figura 2. Sitios de colección de *Mytilus chilensis* en el Sistema de Reloncaví, Región de Los Lagos, Chile. .9
- Figura 3. Identificación de loci outliers de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile usando el programa Bayescan. Puntos representan 97.722 SNPs. El factor de Bayes provee una escala de evidencia donde los puntos rojos y burdeos corresponden a loci con evidencia fuerte y muy fuerte de selección de acuerdo con el criterio de Jeffrey's. ....15
- Figura 4. Mapa de calor que representa la diferenciación genética por pares entre localidades de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, mediante el índice de fijación  $F_{ST}$ . Los valores sobre la diagonal gris corresponden al conjunto de datos neutrales (72.704 SNPs), mientras que los de abajo, corresponden al conjunto de datos Outliers (18 SNPs). Los \* muestran diferencias significativas ( $p\text{-value} < 0.05$ ). ....17
- Figura 5. Resultados de delta K estimados según el método de Evanno et al. 2005 e implementados en Structure Harvester, utilizando 97.704 SNP neutrales (Panel izquierdo) y 18 SNPs outliers (panel derecho) de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile. Delta K = media ( $|L'(K)|$ ) / sd (L(K)). ....18
- Figura 6. Estructuración genética espacial determinada en STRUCTURE basado en 97.704 SNPs neutrales (panel superior) y 18 SNPs Outliers (panel inferior) de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile. Cada barra representa a un individuo y los colores a la proporción de correspondencia a uno de los grupos ancestrales. En ambos casos el K óptimo = 2 según el método de Evanno et al. 2005. Se presenta además la primera derivada sub-óptima (k=3). ....18
- Figura 7. Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) utilizando 97.704 SNPs neutrales (Panel superior) y 18 SNPs outliers (Panel inferior) de poblaciones naturales y de cultivo de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile. ILQ\_C: Bahía Ilque cultivo, ILQ\_N: Bahía Ilque natural, CHA\_C: Chaparano cultivo y CHA\_N: Chaparano natural.....20
- Figura 8. Caracterización ambiental de la columna de agua de localidades de muestreo; Se grafica el promedio de temperatura, salinidad y densidad entre los años 2013-2022 en Chaparano (línea azul) y Bahía Ilque (línea roja).....21

Figura 9. Análisis Parcial de Redundancia (p-RDA) basado en 18 SNPs outliers de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile.....22

## RESUMEN

La acuicultura de *Mytilus chilensis* en Chile constituye un importante sistema socio-ecológico que se sustenta a partir de la captación de semillas desde los bancos naturales de la especie. Estas semillas, son posteriormente trasladadas a zonas de cultivo extensivo, donde se “engordan” en alta densidad, lo que implica una mayor competencia por recursos, resultando posibles procesos selectivos diferenciales respecto de las poblaciones naturales. Esta actividad se emplaza en Patagonia norte, Región de los Lagos, un ambiente altamente heterogéneo y dinámico, incluso a una pequeña escala geográfica (~ 50 km). Este método tradicional, en conjunto con las variables ambientales diferenciales, podría provocar una supervivencia diferencial impulsada por procesos de selección natural en distintas zonas de cultivo. Dada la importancia de los bancos naturales para el sistema, es importante comprender las dinámicas genético-poblacionales que existen entre las poblaciones naturales y de cultivo de esta especie. Hasta ahora, los estudios en torno a la especie se han concentrado en caracterizar los patrones de diversidad genética neutral de poblaciones naturales, considerándola una gran unidad panmíctica, altamente diversa, con una baja diferenciación genética espacial y algo de variación genética interanual dada por cambios en el éxito reproductivo de la especie. Pero, no se han estudiado los patrones de diversidad genética espacial de poblaciones de cultivo de la especie y el efecto diferencial que la heterogeneidad ambiental podría ejercer sobre estos. En el presente estudio, se intentó avanzar en el conocimiento de las dinámicas poblacionales que existen entre las poblaciones naturales y el cultivo de esta especie en una zona geográfica acotada. Para esto, usando el Sistema Reloncaví como área de estudio, se secuenciaron un total de 92 individuos de poblaciones naturales y cultivo del seno (Bahía Ilque) y fiordo de Reloncaví (Chaparano). Se obtuvieron 97.722 SNPs mediante GBS alineados con el genoma de referencia. De los cuales, se detectaron 18 SNPs putativamente adaptativos, sugiriendo un efecto discreto de la selección natural sobre estas poblaciones. Además, la población de cultivo en Chaparano muestra diferenciación genética, incluso con la población natural de su misma localidad. Estos resultados son una primera evidencia de que condiciones de cultivo pueden estar ejerciendo presiones selectivas que promueven la diferenciación genética en algunas zonas de cultivo incluso cuando están expuestas a condiciones similares a las poblaciones naturales.

**Palabras claves:** miticultura, heterogeneidad ambiental, estructura genética, selección natural.

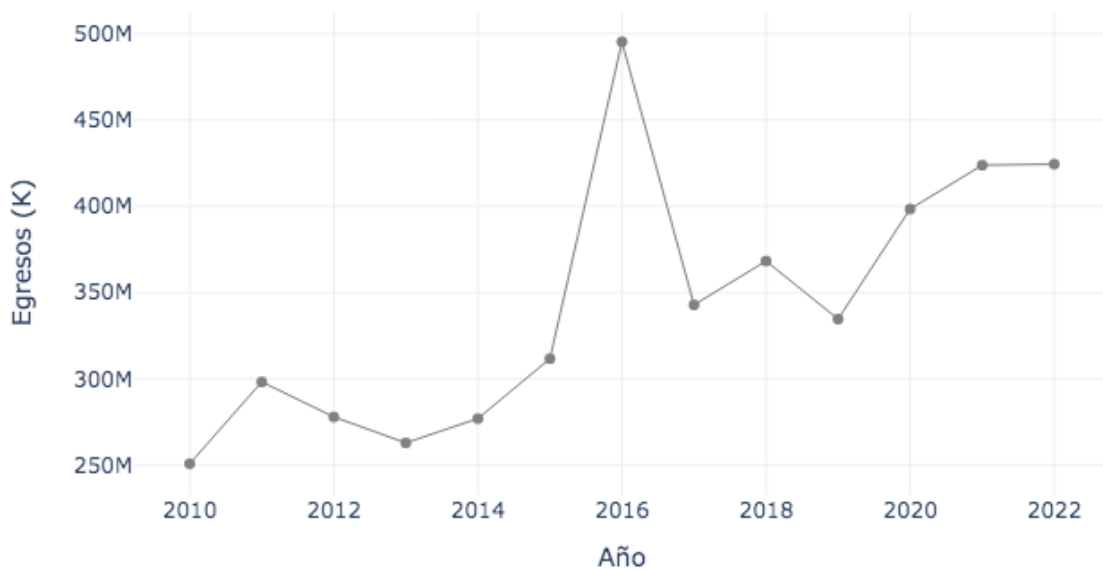
## ABSTRACT

Mytiliculture is a relevant socio-ecological system sustained exclusively by the capture of seeds from the natural environment, which are then moved to growing areas, where they are cultivated in high density, implying greater competition for resources, which could imply differential selective processes with respect to wild populations. This activity is mainly located in the Chilean northern Patagonia, Región de los Lagos, a highly heterogeneous and dynamic environment at a small geographic scale (~50 km). This traditional method, in conjunction with differential environmental variables, could lead to differential survival driven by natural selection processes in different growing areas. Given the importance of wild populations (natural beds) to the system, it is important to understand the population-genetic dynamics that exist between wild and cultured populations of this species. However, so far studies have concentrated on characterizing the neutral genetic diversity patterns of natural populations of the species, considering it as a large panmictic unit, highly diverse, with low spatial genetic differentiation and some interannual genetic variation due to changes in the reproductive success of the species. While cultivated populations and the differential effect of environmental heterogeneity on spatial diversity patterns have not been studied. In the present study, an attempt was made to advance in the knowledge of the population dynamics that exist between wild populations and the cultivation of this species in a limited geographical area. For this purpose, using the Reloncaví system as a study area, they sequenced a total of 92 individuals from natural and cultivated populations in the sound (Bahía Ilque) and Reloncaví fjord (Chaparano). Reloncaví fjord, located in an area of high freshwater inflow, is an important seedbed that sustains a large part of the crops in the sector, including Bahía Ilque. A total of 97,722 SNPs were obtained by GBS aligned with the reference genome. Of these, 18 putatively adaptive SNPs were detected, suggesting a discrete effect of natural selection on these populations. In addition, the cultured population in Chaparano shows genetic differentiation, even with the wild population of the same locality. These results are the first evidence that cultivation conditions may be exerting selective pressures that promote genetic differentiation in some cultivation areas even when they are exposed to conditions similar to those from natural populations.

**Key words:** mytiliculture, environmental heterogeneity, genetic structure, natural selection.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Mytilus chilensis* Hupé, 1854 conforma un importante Sistema Socio-Ecológico en Chile que se emplaza casi en su totalidad en Patagonia norte, específicamente en la región de Los Lagos, donde se concentra alrededor del 99% de la producción (SERNAPESCA 2000-2022). En las últimas décadas, esta actividad ha experimentado un notable crecimiento, reflejado en los desembarques que han alcanzado alrededor de 400.000 toneladas en los últimos años, consolidando así a Chile como uno de los principales productores y exportadores de mitílidos a nivel mundial (FAO 2018) (Figura 1). Además, dada la variabilidad de actividades que se requieren para la producción de este recurso, este sector genera alrededor de 17.000 empleos directos e indirectos a nivel nacional (Dresdner *et al.* 2017).



Fuente: Sernapesca. Elaboración: Datacenter SECOS

Figura 1. Desembarques de cultivos de *Mytilus chilensis* en la Región de los Lagos, Chile entre los años 2010-2022.

Los cultivos de *M. chilensis* son sustentados a partir de la captación de semillas (juveniles de la especie), provenientes de poblaciones naturales, mediante la instalación de cultivos en suspensión (Contreras & Godoy 2021). El proceso de captación se lleva a cabo en unas pocas Áreas de Manejo de Recursos Bentónicos (AMERBs) ubicadas en zonas de menor salinidad, como el fiordo de Reloncaví y la costa este del mar interior de Chiloé. Una vez que las semillas alcanzan una talla entre los 1.5 a 3 cm, aproximadamente alrededor de 2 meses después de la instalación de colectores, son trasladadas a centros

de engorda ubicados en otras localidades, las cuales se encuentran ubicadas en las cercanías de la Isla grande de Chiloé y a la costa oeste del seno de Reloncaví. En los centros de engorda, las semillas son reposicionadas en “cuelgas”, dentro de una malla de algodón para facilitar que los individuos vuelvan a fijarse al sustrato (Contreras & Godoy 2021). Esto es facilitado por el ciclo de vida que abarca una fase de vida libre y una fase sésil. Durante su desarrollo temprano presenta una larva planctotrófica la cual se ha registrado que puede permanecer en la columna de agua alrededor de 40-45 días (Toro *et al.* 2004), otorgándole a la especie un alto potencial de dispersión. Cuando encuentra un sustrato adecuado para asentarse, esta larva se fija a través de la producción de estructuras proteicas llamadas visos, para metamorfosear a su estado adulto y sésil. Estas estructuras proteicas se pueden volver a producir en caso de desprenderse del sustrato (Laursen 1992, Silverman & Roberto 2012).

La mayoría de los cultivos de *M. chilensis*, se concentran en la Patagonia Norte, desde el seno de Reloncaví hasta el Golfo de Corcovado (entre los 41.5°S, 43°S). Esta área se caracteriza por tener condiciones ambientales altamente heterogéneas, incluso a cortas distancias. Se trata de una zona semi cerrada que comprende un extenso mar interior, conocido como mar interior de Chiloé, el cual posee una geomorfología compleja compuesta por la gran presencia de fiordos, canales e islas y se compone por cuatro microcuencas: seno de Reloncaví, fiordo de Reloncaví, Golfo de Ancud y Golfo de Corcovado (Silva *et al.* 2009). Se encuentra influenciado por el aporte de agua dulce de varios ríos patagónicos que desembocan en la costa este y por el intercambio de aguas oceánicas que ingresan a través del canal de Chacao y la boca del Guafo (Sievers 2008, Narváez *et al.* 2019, Vásquez *et al.* 2021). Condiciones geográficas y oceanográficas generan fuertes gradientes horizontales en variables ambientales como la temperatura y salinidad (Saldías *et al.* 2021, Vásquez *et al.* 2021). Además, se desarrolla una circulación estratificada, que es aún más marcada en los fiordos, donde las diferencias ambientales pueden observarse incluso dentro de una misma localidad, asociadas a la profundidad (Sievers 2008, Cáceres & Valle-Levinson 2010).

En invertebrados marinos, se ha reconocido al potencial de dispersión, facilitado por huevos, larvas y/o adultos móviles, como un factor importante en la configuración de patrones espaciales de diversidad genética (Cowen & Sponaugle 2009). Se observa un mayor flujo genético en aquellas especies con un mayor potencial de dispersión, lo que se traduce en poblaciones más conectadas y con una menor diferenciación genética entre ellas (Kinlan & Gaines 2003, Haye *et al.* 2014). Dicho esto, el alto potencial de dispersión natural de la especie dado por las características de su desarrollo temprano, que contempla una larva planctónica con alta duración en la columna de agua (Toro *et al.* 2004), podría aumentar el flujo genético entre las poblaciones de Patagonia Norte, manteniendo sus poblaciones conectadas.

Diversos estudios han proporcionado evidencia de que especies con alta capacidad de dispersión pueden exhibir señales adaptativas en respuesta a las presiones selectivas generadas por gradientes ambientales o mosaicos espaciales complejos de condiciones bióticas y abióticas (revisados por Palumbi 2004, Levin 2006, Sanford & Kelly 2011, Segovia *et al.* 2020). En estos casos, la diferenciación adaptativa persiste por una fuerte selección después de la dispersión, repercutiendo en la mortalidad selectiva de migrantes por efecto de desajustes fenotipo-ambiente (Marshall *et al.* 2010). Por lo tanto, las condiciones ambientales heterogéneas presentes en Patagonia Norte podrían actuar como presiones selectivas locales, abriendo la posibilidad de que existan patrones de diferenciación genética de *M. chilensis* en una escala geográfica reducida, tal como se ha observado en otros bivalvos asociados a ambientes heterogéneos (Lehnert *et al.* 2023, Ropp *et al.* 2023). Una escala geográfica reducida puede abarcar desde unos pocos metros (Selander & Kaufman 1975) hasta cientos de kilómetros (Benestan *et al.* 2015, Canales-Aguirre *et al.* 2022), dependiendo del potencial de dispersión de la especie estudiada. Aquí la definimos como un área donde las poblaciones naturales se encuentran hipotéticamente muy conectadas por flujo génico, basado en lo esperado por su potencial de dispersión.

Los avances en las técnicas de secuenciación han permitido la obtención de gran cantidad de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) repartidos a lo largo de todo el genoma, los cuales son útiles para detectar variación genética entre poblaciones, estructuras genéticas discretas y regiones del genoma bajo la influencia de la selección natural (Davey *et al.* 2011, Woodings *et al.* 2018). Los SNPs se pueden encontrar en regiones del genoma codificantes y no codificantes, los que se consideran putativamente adaptativos (outliers), y neutrales respectivamente. Loci neutrales pueden mostrar señales de como fuerzas evolutivas como el flujo genético y/o la deriva génica influyen en los patrones de diversidad de las poblaciones (revisado por Selkoe *et al.* 2016), mientras que loci outliers pueden entregar señales de adaptación local (Segovia *et al.* 2020, Mendiola *et al.* 2021).

Hasta ahora, los estudios moleculares en torno a *M. chilensis* se han enfocado en evaluar la estructura genética espacial neutral únicamente de las poblaciones naturales en su rango de distribución, utilizando diversos marcadores moleculares como aloenzimas (Cárcamo *et al.* 2005, Toro *et al.* 2006), microsatélites (Larraín *et al.* 2014, Astorga *et al.* 2020), marcadores mitocondriales (Astorga *et al.* 2020, Haye & Segovia 2023) y SNPs (Araneda *et al.* 2016). En estos estudios, independiente del marcador utilizado, encuentran un patrón similar de baja diferenciación genética entre poblaciones naturales, sugiriendo una población panmíctica en el área de Patagonia Norte, respaldado por un alto flujo genético asociado a su potencial de dispersión otorgado por la dispersión larval. Además, un estudio sugiere que la diversidad genética de la especie posee una variación interanual asociada con fluctuaciones en el éxito

reproductivo (Haye & Segovia 2023). Por otro lado, un estudio enfocado en comprender los patrones espaciales de la diversidad genética adaptativa de las poblaciones naturales de *M. chilensis* utilizando SNPs outliers, encontró dos grupos diferenciados en Patagonia Norte, asociados al seno de Reloncaví y al Mar interior de Chiloé, lo que sugiere una alta influencia del ambiente sobre los patrones genéticos adaptativos espaciales en Patagonia Norte (Araneda *et al.* 2016).

Los desembarques de la acuicultura industrial de *M. chilensis* dependen completamente del cultivo de larvas recién asentadas que son recolectadas desde el medio natural. Dada la fuerte dependencia de este socio-ecosistema del reclutamiento de semillas del medio natural (Molinet *et al.* 2021), es imperioso comprender las dinámicas genético-poblacionales que existen entre las poblaciones naturales y de cultivo de esta especie. Los sistemas de cultivo proporcionan un ambiente diferencial para el establecimiento de semillas, donde la alta densidad implica una mayor competencia por recursos disponibles (Cubillo *et al.* 2012). En la almeja *Coelomastra antiqua*, se ha registrado una erosión en la diversidad genética provocada por las condiciones de cultivo, encontrando una menor diversidad genética en las poblaciones de cultivo en comparación con las poblaciones naturales (Kong & Li 2007). Esta pérdida de diversidad está dada por la densidad de los asentamientos en los hatchery, la cual está acompañada de una posterior mortalidad, debilitando la capacidad de las poblaciones de cultivo de responder a los cambios ambientales. En mitílidos, se ha registrado que diversas actividades asociadas a los cultivos, como el transporte de individuos (Simon *et al.* 2019), el uso de estructuras artificiales sobre poblaciones naturales (Coolen *et al.* 2020) y el “spill-over” larval desde poblaciones de cultivo (Norrie *et al.* 2020) podrían estar potenciando el flujo genético antropogénico entre las poblaciones naturales de la especie y entre las poblaciones naturales con las del cultivo, pudiendo provocar cambios en la diversidad genética. Hasta ahora, no existen estudios que evalúen los patrones genéticos espaciales de las poblaciones de cultivo de *M. chilensis*, ni la influencia que ejerce el ambiente sobre estos patrones. Este estudio busca avanzar en el conocimiento de estos socio-ecosistemas caracterizando los patrones genéticos de esta especie, asociados a las diferencias ambientales que existen en un sector altamente productivo del seno y fiordo de Reloncaví. Para esto, caracterizamos la estructura genómica espacial neutra y putativamente adaptativa, utilizando marcadores SNPs, en poblaciones naturales y de cultivo de *M. chilensis* provenientes de las localidades de Bahía Ilque (seno) y Chaparano (fiordo). Además, los loci putativamente adaptativos fueron asociados con variables ambientales contrastantes e importantes para el desarrollo de la especie, para evaluar la posible influencia de la selección natural sobre los patrones genéticos de *M. chilensis* en el Sistema Reloncaví.

# HIPÓTESIS

## Hipótesis 1

Las poblaciones naturales y de cultivo de *Mytilus chilensis* forman una única unidad panmíctica, caracterizada por un patrón de baja diferenciación genética neutral intrapoblacional en el seno y fiordo de Reloncaví.

## Hipótesis 2

Las poblaciones naturales y de cultivo de *Mytilus chilensis* están diferenciadas genéticamente por la heterogeneidad ambiental del Sistema Reloncaví, las cuales están actuando como factores selectivos sobre los migrantes provenientes de localidades foráneas, ya sea por dispersión natural o translocación para cultivo.

## Predicciones

1. Se observará un único grupo genético neutral entre poblaciones naturales y de cultivo en localidades ambientalmente diferentes en el fiordo y seno Reloncaví.
2. Se observarán diferencias genéticas adaptativas entre poblaciones naturales y de cultivo en localidades ambientalmente diferentes en el fiordo y seno Reloncaví.
3. Se observarán diferencias genéticas adaptativas entre poblaciones naturales y de cultivo translocadas expuestas a la misma fluctuación ambiental de la misma localidad geográfica en el fiordo y seno Reloncaví.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Caracterizar los patrones geográficos de diversidad genética neutral y adaptativa entre poblaciones naturales y de cultivo de *Mytilus chilensis*, asociada a diferencias ambientales en el seno y el fiordo de Reloncaví.

### Objetivos Específicos

- Detectar la presencia de loci putativamente sujetos a selección diversificadora en poblaciones naturales y de cultivo de *M. chilensis*, en el seno y fiordo de Reloncaví, usando polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).
- Caracterizar ambientalmente dos localidades del seno y fiordo de Reloncaví mediante el uso de datos in situ, para análisis de asociación genómico-ambiental.
- Comparar la diversidad y diferenciación genética neutral y adaptativa entre poblaciones naturales y de cultivo de *M. chilensis* en el fiordo y seno de Reloncaví.
- Evaluar asociación entre los patrones geográficos de diversidad genética adaptativa con variables ambientales de importancia para *Mytilus chilensis*, en el seno y fiordo de Reloncaví.

# MÉTODOS

## Área de estudio

El estudio fue emplazado en el seno y fiordo de Reloncaví que, en su conjunto, de ahora en adelante será referido como Sistema Reloncaví (SR). Se consideraron dos localidades de muestreo: Chaparano (41,62°S; 73,08°O), ubicado en la ribera sur y en las cercanías de la boca del fiordo, y Bahía Ilque (41,75°S; 72,57°O), ubicada en el extremo poniente del seno (Figura 2). El seno Reloncaví es una bahía semicerrada localizada en la Región de los Lagos, Chile. Posee una línea de costa circular que conecta por el este con el fiordo Reloncaví y por el sur con el golfo de Ancud. Las características hidrográficas del SR son muy dinámicas dadas por la interacción entre las aguas oceánicas, que ingresan principalmente por el Canal de Chacao, y las aguas continentales provenientes de ríos que desembocan en el fiordo y finalmente en el seno, generando gradientes de salinidad a medida se aleja de las fuentes de agua dulce (Iriarte *et al.* 2014). El fiordo Reloncaví recibe descargas de aguas continentales de dos ríos con caudales estacionalmente variables. Cercano a la cabeza del fiordo, se encuentra el río Petrohué y en el medio recibe la descarga del Río Puelo con un caudal medio anual de  $650\text{m}^3\text{s}^{-1}$  (León-Muñoz *et al.* 2013). Mientras que el agua marina proveniente del seno Reloncaví ingresa por debajo de la superficie al fiordo, provocando fuertes gradientes de salinidad superficial y diferencias en la estratificación de la columna de agua a lo largo de esta zona (Acha *et al.* 2004). El régimen de marea, de gran amplitud en la zona, se ve atenuado por la profundidad del fiordo impidiendo la mezcla vertical y manteniendo la estratificación de las masas de agua, lo que provoca que existan diferentes variables ambientales en la columna de agua según la profundidad (Valle-Levinson *et al.* 2007). Aunque la estructuración de la temperatura en la columna de agua suele ser más marcada (máximas) en primavera-verano y menos marcada (mínimas) en otoño-invierno (Saldías *et al.* 2021). Por otra parte, el Sistema Reloncaví posee una alta fluctuación estacional, observando temperaturas más altas en temporada de primavera-verano con máximas en febrero, las cuales disminuyen de forma gradual hasta alcanzar temperaturas mínimas en agosto (Tello & Rodríguez-Benito 2009). Asimismo, se pueden observar aguas menos salinas en temporadas cálidas y más salinas en temporadas frías (Castillo *et al.* 2016).

## Obtención de datos genómicos

Se obtuvieron 50 individuos provenientes de bancos naturales y 50 de centros de cultivo de *Mytilus chilensis* en cada uno de los sitios de muestreo (Chaparano y Bahía Ilque) (Figura 1, Tabla 1) en diciembre del año 2022. Aquellos provenientes de bancos naturales fueron recolectados durante la marea baja desde la zona intermareal, en cercanía a las poblaciones de cultivo, en un área de alrededor de 50 m. Mientras que aquellos provenientes de centros de cultivo fueron muestreados con la ayuda de miticultores locales, directamente desde los cultivos suspendidos, seleccionando individuos localizados a una profundidad de ~5 m. Una vez obtenida las muestras, estas fueron mantenidas vivas en agua de mar con aireación continua hasta el procesamiento, para evitar una eventual degradación del ADN.

Se extrajo el músculo aductor de cada uno de los especímenes con material de disección, el cuál fue limpiado entre cada individuo con una batería de cloro al 10%, alcohol al 70% y agua destilada para evitar contaminación cruzada. El tejido de interés fue fijado en etanol al 96%, el cual fue reemplazado por etanol absoluto después de 24 horas. Una vez en el laboratorio, las muestras en etanol absoluto fueron almacenadas a -20°C.

De las muestras colectadas, se extrajo el ADN genómico a partir de 25 mg de tejido utilizando el kit de extracción DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cantidad y pureza del ADN fue evaluada con dos instrumentos: (i) Un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher scientific, USA) para determinar la concentración total y observar las curvas de pureza del ADN y (ii) un fluorímetro Qubit 4 (Thermo Fisher scientific, USA) para tener una medición más sensible de la concentración del ADN íntegro obtenido.

Una vez cuantificado el ADN de cada uno de los individuos, se seleccionaron 23 muestras por población que tuvieran concentraciones sobre 20 ng/uL medido en Qubit 4, de acuerdo con las indicaciones del servicio de secuenciación. Estas, fueron sometidas a una prueba de actividad enzimática, en donde fueron digeridas con la enzima *EcoRI* a 37° C durante seis horas, para asegurar que no hubiera inhibidores presentes que pudieran afectar el proceso de secuenciación. Tanto el ADN genómico total, como las muestras digeridas con enzima de restricción, fueron visualizadas mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, para observar las bandas de alto peso molecular y las bandas digeridas de ADN.

Una vez comprobada la calidad del ADN, las muestras fueron enviadas al Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, USA para ser secuenciadas con el método de representación reducida

Genotyping by Sequencing (GBS), que utiliza enzimas de restricción para secuenciar múltiples muestras de ADN repartidas en todo el genoma, reduciendo la complejidad de este (De Donato *et al.* 2013). Esta es una técnica ampliamente utilizada en estudios de genómica de poblaciones (Araneda *et al.* 2016; Segovia *et al.* 2020; Nam *et al.* 2021; Segovia *et al.* 2022; Tan *et al.* 2023) por su replicabilidad, rapidez y calidad de los datos. Además, al tener una mayor cobertura en el genoma, permite detectar miles de Polimorfismos de un Solo Nucleótido (SNPs) que pudieron haber experimentado selección natural, a diferencia de los marcadores tradicionales (Narum *et al.* 2013).

La secuenciación fue llevada a cabo utilizando la enzima de restricción *ApeKI*, optimizada para *Mytilus chilensis* por Segovia *et al.* (Sometido). Posterior a la digestión, cada fragmento de ADN fue ligado a un adaptador único tipo barcode, para identificar de manera precisa cada individuo posterior al proceso de secuenciación, en posteriores análisis. La secuenciación se efectuó en una plataforma NovaSeq6000 (Illumina, USA) y la calidad de las lecturas resultantes fueron visualizadas y analizadas en FastQC (Andrews 2010).

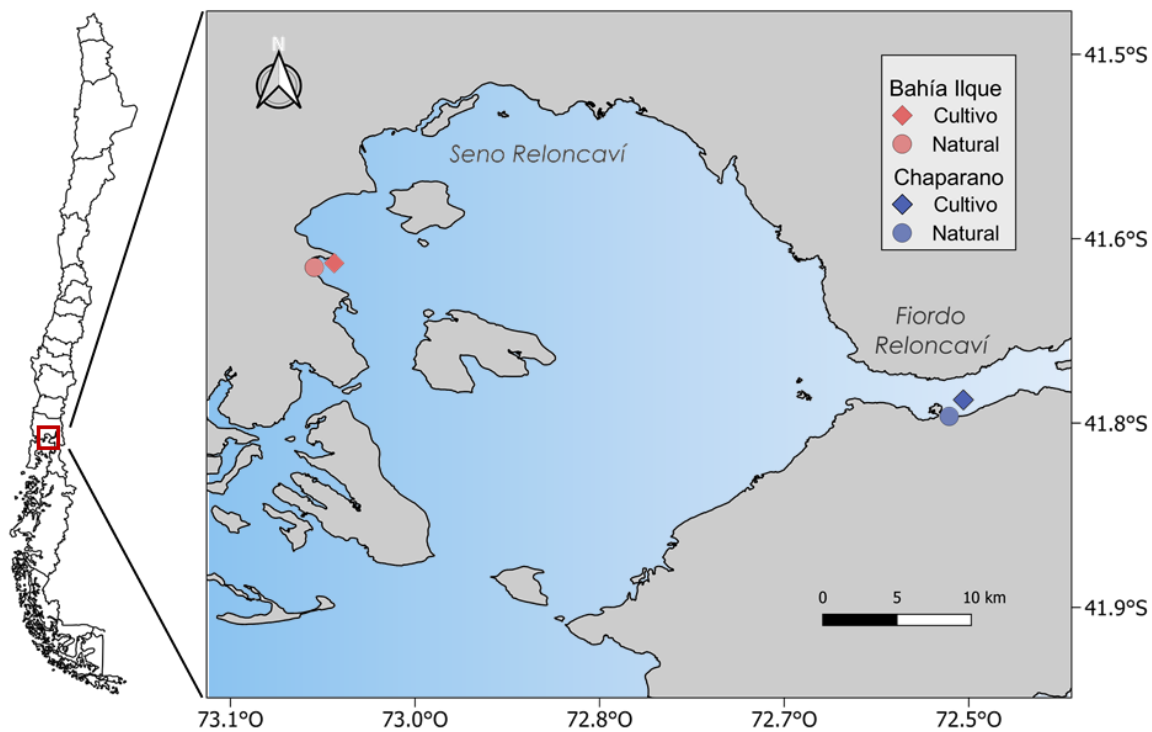


Figura 2. Sitios de colección de *Mytilus chilensis* en el Sistema de Reloncaví, Región de Los Lagos, Chile.

La detección de SNPs dispersos por el genoma se realizó mediante el pipeline STACKS 2.6 (Catchen *et al.* 2013), que incorpora un modelo de máxima verosimilitud para identificar polimorfismos en las secuencias y distinguirlos de errores de secuenciación. Primero, mediante el módulo ‘*process\_radtags*’ del pipeline, se ordenaron las lecturas por muestras individuales, mediante la identificación de la secuencia barcode, desde la librería de Illumina. Luego fueron preparadas para su posterior alineamiento, eliminando los barcodes y filtrando aquellas secuencias de baja calidad. Las lecturas ya identificadas y ordenadas fueron alineadas utilizando el genoma de referencia de *Mytilus chilensis* (Gallardo-Escarate *et al.* 2023) mediante el software Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (Li & Durbin 2009). Los archivos de salida generados por BWA, fueron procesados utilizando Samtools (Danecek *et al.* 2021), donde fueron ordenados, indexados y filtrados, permitiendo la eliminación de datos defectuosos y/o duplicados. Utilizando el módulo ‘*ref\_map.pl*’ de STACKS, se agruparon secuencias similares de cada individuo en pilas, a partir de los archivos alineados y estas se compararon entre individuos para identificar SNPs. Finalmente, se genotipó a cada individuo por locus utilizando el módulo ‘*gstacks*’ y se aplicaron filtros para eliminar SNPs poco confiables con el módulo ‘*populations*’ utilizando una frecuencia mínima de alelo menor de 0,03 (MAF), para garantizar que cada SNP esté presente en al menos el 3% de los individuos.

Tabla 1. Información de poblaciones de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile. N: número de individuos secuenciados.

Proveniencia	Acrónimo	N	Coordenadas
Chaparano banco natural	CHA_N	23	41,62°S; 73,08°O
Chaparano cultivo	CHA_C	23	
Bahía Ilque banco natural	ILQ_N	23	41,75°S; 72,57°O
Bahía Ilque cultivo	ILQ_C	23	

Del conjunto de datos resultante, se excluyeron aquellos individuos que contenían más de 80% de *missing data*. Además, se excluyeron aquellos SNPs con una tasa mínima de llamada del sitio (mnC) de 0,85, para garantizar de que al menos el 85% de los individuos en cada SNP hayan tenido una determinación genotípica exitosa y aquellos con una MAF inferior al 3%, con el fin de garantizar una representación mínima del 3% en cada alelo. Los valores de los filtros fueron determinados con base empírica, después de varias rondas de filtros.

Posteriormente, estimamos las desviaciones del Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) por locus con el software Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer 2010) usando 100.000 permutaciones. Los p-value resultantes, se sometieron a una corrección de tasa de descubrimiento falso o FDR (Haynes 2013) (q-value = 0,05), y se eliminó de la base de datos los SNPs que estaban en desequilibrio en al menos el 75% de los sitios considerados, para evitar incluir estructura dada por artefactos de secuenciación en los siguientes análisis (Pearman *et al.* 2022).

## Obtención de Outliers

De los SNPs ya filtrados, se detectaron los loci putativamente sujetos a selección natural, utilizando el análisis basado en la diferenciación poblacional, Bayescan 2.1 (Foll & Gaggiotti 2008).

Bayescan emplea un enfoque bayesiano basado en un modelo de regresión logística. Este método puede distinguir loci que podrían estar experimentando selección natural de aquellos afectados por procesos neutrales, utilizando diferencias en frecuencias alélicas entre las poblaciones. El análisis se llevó a cabo utilizando un *prior odds* de 10 para simplificar la modelización de  $F_{ST}$ , dado el número limitado de poblaciones. Aunque se recomienda aumentar el *prior odds* al analizar un gran número de loci, se sugiere disminuirlo cuando la cantidad de poblaciones es reducida (Foll 2012). Se ejecutaron 550.000 iteraciones con un burn-in del 10% para asegurar la convergencia de las MCMC. Se aplicó una corrección FDR del 5% para evitar la aparición de falsos positivos. Se consideraron como candidatos sólo aquellos loci con evidencia de selección fuerte o muy fuerte según el criterio de Jeffrey, basado en los valores del Bayes Factor ( $bf > 10$ ).

## Análisis de diversidad y estructuración genética

Se realizaron estimaciones de diversidad y análisis de diferenciación genética utilizando dos conjuntos de datos: uno neutral y otro de loci outliers, putativamente adaptativos, previamente identificados mediante Bayescan.

Para evaluar la diversidad genética de cada población en cada conjunto de datos, se estimó el número efectivo de alelos ( $A_r$ ), la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y el índice de fijación ( $G_{IS}$ ) en el software GenoDive 3.05 (Meirmans 2020).

Por otro lado, para evaluar si existe diferenciación poblacional, se estimó el índice de fijación  $F_{ST}$  entre pares de poblaciones en el software Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer 2010), evaluando la significancia de los resultados a través de 10.000 permutaciones. Para evaluar posibles agrupamientos

genético-poblacionales entre sitios, y entre poblaciones naturales y de cultivo, se utilizó Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2000), Este software utiliza un enfoque bayesiano para estimar la probabilidad de asignación de un individuo a un grupo genético en particular sin considerar la información de la procedencia geográfica de éstos. Se realizaron 10 réplicas utilizando Strauto v1.0 (Chhatre & Emerson 2018), con un total de 500.000 MCMC y un 10% de *burn-in*. El número óptimo de grupos genéticos se determinó mediante el método de Evanno *et al.* (2005), mediante las estimaciones de delta K implementadas en STRUCTURE HARVESTER (Earl & VonHoldt 2012). Los resultados fueron graficados en Clumpak (Kopelman *et al.* 2015).

Para obtener más información sobre la estructura genética, considerando el origen geográfico de cada individuo, se aplicó un enfoque poblacional a través de un Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) mediante el paquete *adegenet* 2.1.0 (Jombart *et al.* 2017) implementado en el software R studio (R studio team 2021). El número óptimo de grupos para el análisis DAPC se estimó utilizando el agrupamiento de k-means con el criterio de información bayesiana (BIC), a través de la función *find.clusters*. Este proceso se realizó con 10.000 iteraciones, considerando, luego de optimización, 14 componentes principales (PC) en el conjunto de datos de outliers y 35 PC en el conjunto de datos neutral, reteniendo para ambos sets de datos 3 funciones discriminantes.

### Caracterización ambiental de los sitios de estudio

Para caracterizar ambientalmente los dos sitios de estudio, se realizaron perfiles de la columna de agua para la temperatura, salinidad y densidad, que se han reportado como variables importantes para el desarrollo de *M. chilensis* (Robert *et al.* 1988, Manoj Nair & Appukutan 2003, Lazo & Pita 2012, Yuan *et al.* 2016). Se obtuvieron mediciones mensuales *in situ* de la temperatura y la salinidad de Chaparano y Bahía Ilque en un periodo de nueve años (2013-2022). Estos datos fueron obtenidos de la base de datos del Instituto de Fomento Pesquero (IFOP), la cual está disponible para el público, según lo establecido por la ley de transparencia de Chile. Las mediciones fueron tomadas mediante lances de CTD, lo que permite un registro continuo de la temperatura y la salinidad junto con la profundidad, utilizando los datos desde la superficie hasta los 20 metros. La densidad fue calculada a partir de la salinidad y la presión hidrostática asociada a la profundidad. Los datos ambientales se disgregaron 15 parámetros: 1) temperatura media, 2) temperatura mínima, 3) temperatura máxima, 4) rango de temperatura, 5) varianza temperatura, 6) salinidad media, 7) salinidad mínima, 8) salinidad máxima, 9) rango de salinidad, 10) varianza salinidad, 11) densidad media, 12) densidad mínima, 13) densidad máxima 14) rango de densidad y 15) varianza densidad (Tabla A1).

Si bien, se han registrado otras variables ambientales importantes para invertebrados marinos, como la disponibilidad de alimento (Connor *et al.* 2016), el sistema de carbonatos (Navarro *et al.* 2013, Jhansen-Guzman *et al.* 2021) y el oxígeno disuelto (Ouillon *et al.* 2021), estas no fueron consideradas en este estudio. Es posible obtener información pública de estas variables a través de repositorios de datos de satélites, sin embargo, estos poseen una resolución espacial muy gruesa (i.e. 1 km) y dado que sólo registran el agua superficial, no nos permitía distinguir ambientalmente las condiciones ambientales que experimentan las poblaciones naturales y las de cultivo.

### Asociación genómico-ambiental

Con el conjunto de datos ambientales, más el conjunto de datos de SNPs outliers, se realizó un Análisis parcial de Redundancia (p-RDA), para analizar el efecto de la estructura ambiental sobre los patrones geográficos de la diversidad genética. Para diferenciar ambientalmente a las poblaciones naturales de las de cultivo en una misma localidad, se utilizó la profundidad a la cual fueron obtenidos los individuos. Para las poblaciones naturales, se promediaron los valores de los primeros tres metros de profundidad, mientras que para las poblaciones de cultivo se promediaron los valores entre cuatro y seis metros de profundidad. Esto se realizó para cada una de las variables. Posteriormente, se estandarizaron las variables ambientales para asegurar una comparación adecuada entre ellas. Este proceso se realizó usando la siguiente fórmula:

$$Z = \frac{X - \mu}{\sigma}$$

Siendo X el valor original,  $\mu$  la media de los valores de X,  $\sigma$  la desviación estándar de los valores de X y Z el valor estandarizado. Esto resultó en una escala común para todas las variables, con una media de cero y una desviación estándar de uno, para que todas contribuyeran de manera equitativa al análisis, independiente de sus unidades originales. Los datos genotípicos fueron estandarizados con el método Hellinger utilizando la función 'decostand' del paquete *Vegan* (Oksanen *et al.* 2014). Debido a la cantidad de variables, el modelo final fue optimizado utilizando la función 'ordistep' en *Vegan*. Para esto, primero se ajustó un modelo con todas las variables ambientales como factores fijos, seguido por un modelo que solo incluía el intercepto, es decir estructura de los genotipos sin influencia de ningún factor ambiental. Este método realizó 50 pasos de selección utilizando 10.000 permutaciones con un nivel de significancia de entrada de 0,05 y un nivel de significancia de salida de 0,1. Con el modelo optimizado se empleó un modelo parcial p-RDA utilizando la profundidad como variable condicional, para controlar el efecto de este sobre las variables ambientales. Finalmente se realizó un ANOVA para evaluar la importancia relativa y la

significancia de las distintas variables sobre el modelo. Todos los pasos del p-RDA fueron realizados en el paquete *Vegan* (Oksanen *et al.* 2014) en el software Rstudio (R studio team 2021).

## RESULTADOS

Se obtuvieron un total de 97.750 SNPs a partir de un total de 91 individuos de *Mytilus chilensis* recolectados en Bahía Ilque y Chaparano, del Sistema Reloncaví. Uno de los individuos tuvo que ser eliminado del conjunto de datos ya que presentaba más del 80% de missing data. Luego de estimar el EHW por locus, se excluyeron 28 loci que se encontraron fuera de EHW en al menos tres de las cuatro poblaciones, lo que resultó en un conjunto final de 97.722 SNPs. Mediante la identificación de outliers utilizando Bayescan 2.1, se detectaron 18 SNPs outliers (representando 0,018% del total de loci) con evidencia fuerte o muy fuerte de estar sujetos a selección natural de acuerdo con el criterio de Jeffrey's (Figura 3).

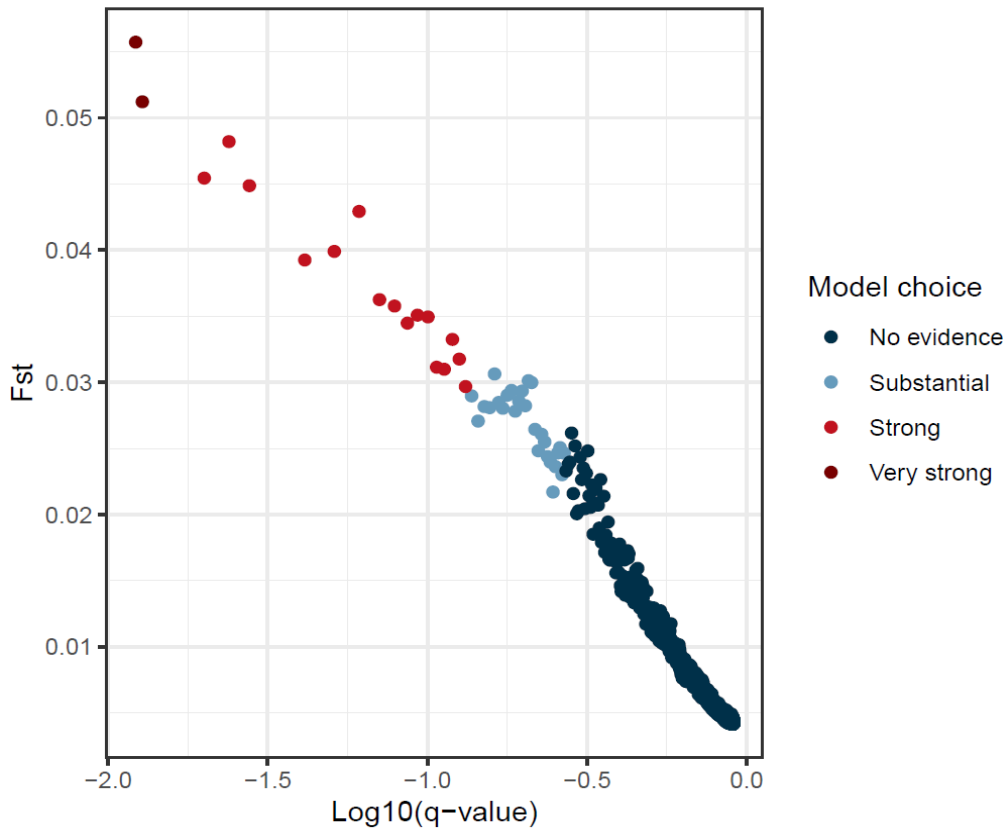


Figura 3. Identificación de loci outliers de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile usando el programa Bayescan. Puntos representan 97.722 SNPs. El factor de Bayes provee una escala de evidencia donde los puntos rojos y burdeos corresponden a loci con evidencia fuerte y muy fuerte de selección de acuerdo con el criterio de Jeffrey's.

En el conjunto de datos neutrales, el número efectivo de alelos fueron similares entre todas las poblaciones (1,239-1,247), al igual que los valores de heterocigosidad observada y esperada (0,145-0,150; 0,171-0,176 respectivamente), reflejando una distribución homogénea de la diversidad genética, coincidente con los valores de  $G_{IS}$ , que fueron similares entre poblaciones (0,142-0,151). En el conjunto de datos putativamente adaptativos (outliers), los valores de número efectivo de alelos variaron levemente entre poblaciones, aunque sin un patrón aparente (1,310-1,575), la heterocigosidad observada y esperada más altos fueron observados en la población de cultivo del sitio Chaparano (0,237; 0,342 respectivamente), seguidos de la población natural de Chaparano (0,194; 0,259) y la población de cultivo de Bahía Ilque (0,159; 0,199). La población natural de Bahía Ilque presentó el valor de heterocigosidad observada más bajo (0,145), pero un valor de heterocigosidad esperada más alto (0,277) en comparación con las poblaciones de cultivo de Bahía Ilque y natural de Chaparano. Por otro lado, la población natural de Bahía Ilque presentó el valor de  $G_{IS}$  más alto (0,476) en relación con el resto de las poblaciones (0,200-0,305) (Tabla 2).

Tabla 2. Diversidad genética de 97.704 SNPs neutrales y 18 SNPs Outliers de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile. Ar: Número efectivo de alelos; Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada y GIS: Coeficiente de consanguinidad. Las poblaciones fueron abreviadas de la siguiente manera: CHA\_N: población natural de Chaparano; CHA\_C: población cultivo de Chaparano; ILQ\_N: población natural de Bahía Ilque; ILQ\_C: población de cultivo de Bahía Ilque.

SET DE DATOS	SITIO	A <sub>r</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	G <sub>IS</sub>
Neutral	CHA_N	1,246	0,150	0,175	0,146
	CHA_C	1,239	0,145	0,171	0,151
	ILQ_N	1,243	0,148	0,173	0,142
	ILQ_C	1,247	0,149	0,176	0,150
Outliers	CHA_N	1,435	0,194	0,259	0,252
	CHA_C	1,575	0,237	0,342	0,305
	ILQ_N	1,470	0,145	0,277	0,476
	ILQ_C	1,310	0,159	0,199	0,200

Los valores de diferenciación genética estimados con  $F_{ST}$ , para el conjunto de datos neutrales, fueron bajos (0-0,0012) y no significativos. Por otro lado, se observó una diferenciación entre la población de cultivo de Bahía Ilque con todas las poblaciones y entre la población natural de Chaparano con ambas

poblaciones de Bahía Ilque que no resultó significativa. En el conjunto de datos outliers, los valores de  $F_{ST}$ , como es de esperarse, valores más altos, y además una diferenciación significativa entre la población de cultivo de Chaparano con la población natural de su misma localidad (0,035), con la población natural de Bahía Ilque (0,125) con la población de cultivo de Bahía Ilque (0,274). Además, se observa una diferenciación entre las poblaciones naturales de las distintas localidades (0,055) que no resultó significativa (Figura 4).

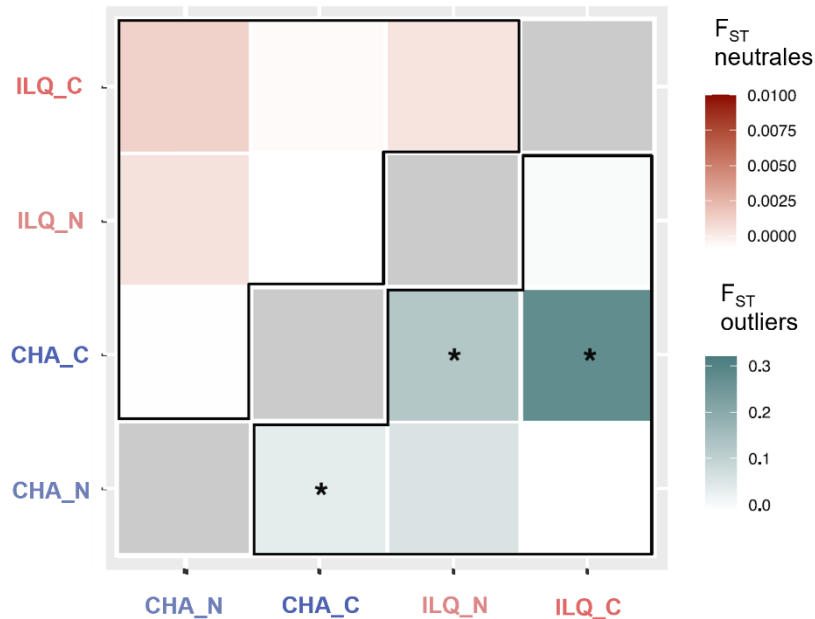


Figura 4. Mapa de calor que representa la diferenciación genética por pares entre localidades de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, mediante el índice de fijación  $F_{ST}$ . Los valores sobre la diagonal gris corresponden al conjunto de datos neutrales (72.704 SNPs), mientras que los de abajo, corresponden al conjunto de datos Outliers (18 SNPs). Los \* muestran diferencias significativas ( $p$ -value < 0.05).

Mediante el método de Evanno *et al.* (2005), se determinó que el número óptimo de grupos genéticos. Para el conjunto de datos neutral fué  $K=2$ . Para el conjunto de datos de outliers, el resultado fue análogo, con  $K=2$  identificado como óptimo (Figura 5). Sin embargo, el análisis de STRUCTURE para el conjunto de datos neutrales no reveló un patrón geográfico evidente de estructuración genética, con la excepción de una sutil diferenciación observada en la población de cultivo de Bahía Ilque, consistente con los resultados de  $F_{ST}$ . Esta última mostró una proporción menor de ascendencia del grupo genético ancestral (rosado) en  $K=2$ , en comparación con el resto de las poblaciones. En contraste, el conjunto de datos de outliers mostró diferenciación en la población de cultivo de Chaparano, con una mayor asignación al grupo genético más abundante y ampliamente distribuido espacialmente (celeste). Incluso se observaron individuos con una asignación del 100% a este grupo (Figura 6).

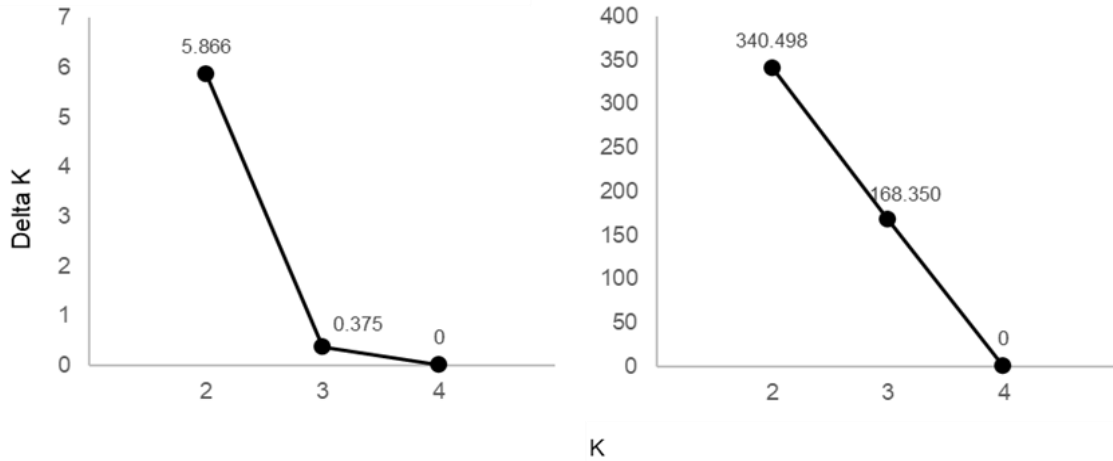


Figura 5. Resultados de delta K estimados según el método de Evanno et al. 2005 e implementados en Structure Harvester, utilizando 97.704 SNP neutrales (Panel izquierdo) y 18 SNPs outliers (panel derecho) de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile. Delta K = media ( $|L''(K)|$ ) / sd (L(K)).

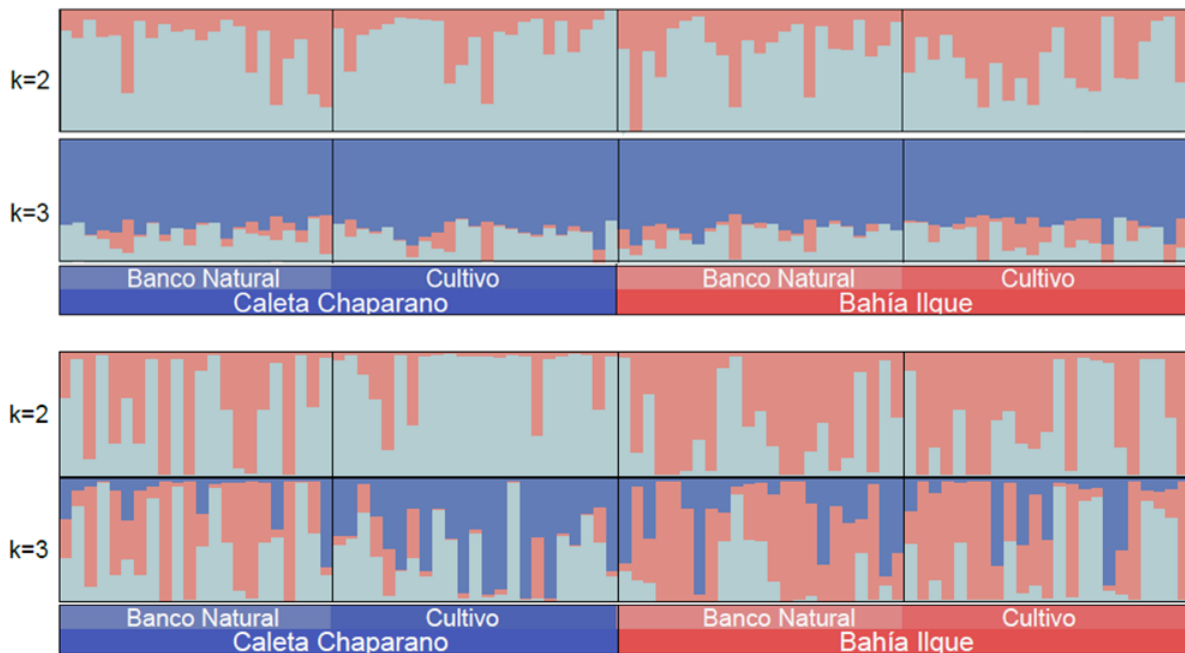


Figura 6. Estructuración genética espacial determinada en STRUCTURE basado en 97.704 SNPs neutrales (panel superior) y 18 SNPs Outliers (panel inferior) de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile. Cada barra representa a un individuo y los colores a la proporción de correspondencia a uno de los grupos ancestrales. En ambos casos el K óptimo = 2 según el método de Evanno et al. 2005. Se presenta además la primera derivada sub-óptima (k=3).

En análisis discriminante de componentes principales (DAPC) no detectó agrupamientos significativos para el set de datos neutral, determinando un valor óptimo de  $K=1$ , según el criterio de información BIC. Sin embargo, utilizando la información de origen y los ejes discriminantes, se puede observar en el eje uno (46,03%), una diferenciación de la población de cultivo de Bahía Ilque con respecto a la población de cultivo de Chaparano y la población natural de su misma localidad, y en el eje dos (28,82%) una diferenciación menos marcada entre Bahía Ilque y Chaparano. En el conjunto de datos outliers, se identificaron cuatro grupos genéticos mediante el criterio BIC. Se observó una diferenciación de la población de cultivo de Chaparano con respecto al resto de poblaciones en el eje uno (56,24%) y una diferenciación de las poblaciones naturales de Chaparano y Bahía Ilque en el eje dos (27,59%) (Figura 7).

Los resultados obtenidos en la caracterización ambiental de la columna de agua en Chaparano y Bahía Ilque revelan diferencias en la salinidad y densidad promedio entre los dos sitios. Se observó que Bahía Ilque presenta niveles de salinidad más bajos y una menor estratificación en comparación con Chaparano. Las variaciones en la temperatura no son notables entre los sitios, pero se observan diferencias a lo largo de la profundidad. Estas disparidades en las condiciones ambientales pueden permitir la diferenciación entre las poblaciones naturales y de cultivo en estas localidades (Figura 8).

El modelo óptimo obtenido para el análisis de redundancia (pRDA) para el conjunto de datos outliers, determinó que las variables de mayor importancia para la estructura genotípica fueron la temperatura máxima como factor más importante ( $F=5,17$ ;  $p=0,001$ ) y rango de la salinidad ( $F=2,34$ ,  $p=0,032$ ) (Tabla 3). El modelo general, también fue significativo, con un valor de  $F = 3,75$  y un valor de  $p = 0,001$ . Los primeros dos ejes explicaron el 83,61% de la varianza total y no se observa una separación marcada entre las poblaciones. Sin embargo, se observa una sutil segregación de la población de cultivo de Chaparano, asociándose negativamente con la temperatura máxima y en menor medida una separación entre las poblaciones naturales de Chaparano y Bahía Ilque asociada con el rango de la salinidad (Figura 9).

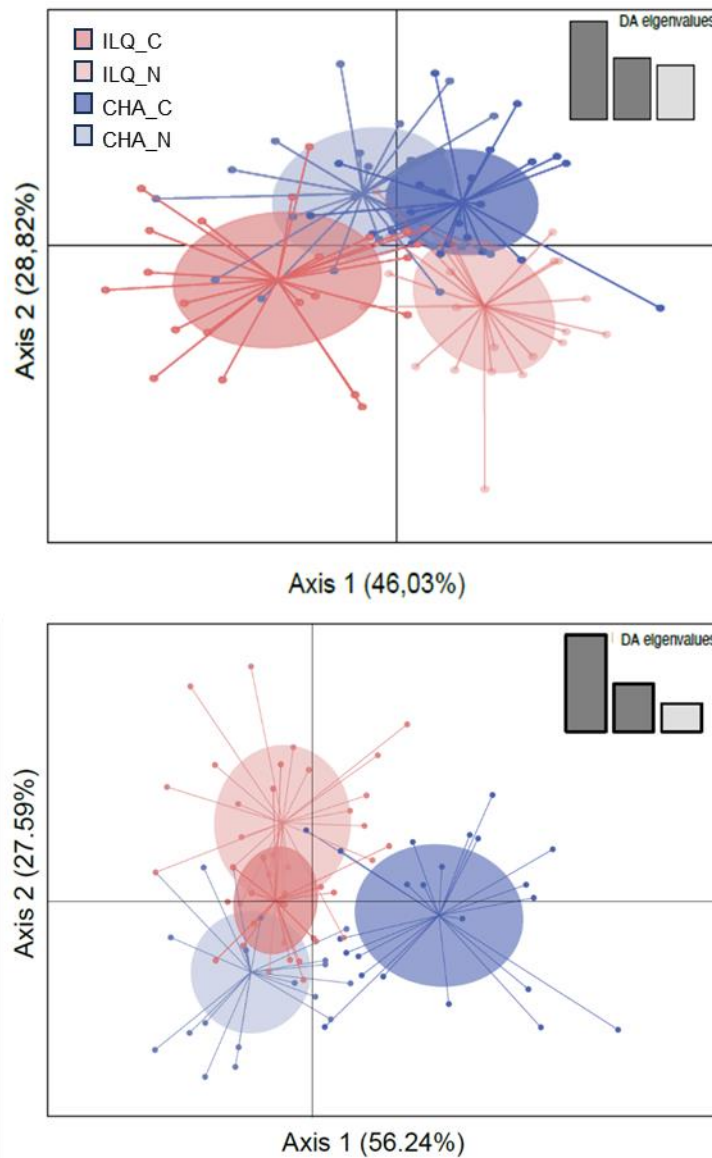


Figura 7. Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) utilizando 97.704 SNPs neutrales (Panel superior) y 18 SNPs outliers (Panel inferior) de poblaciones naturales y de cultivo de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile. ILQ\_C: Bahía Ilque cultivo, ILQ\_N: Bahía Ilque natural, CHA\_C: Chaparano cultivo y CHA\_N: Chaparano natural.

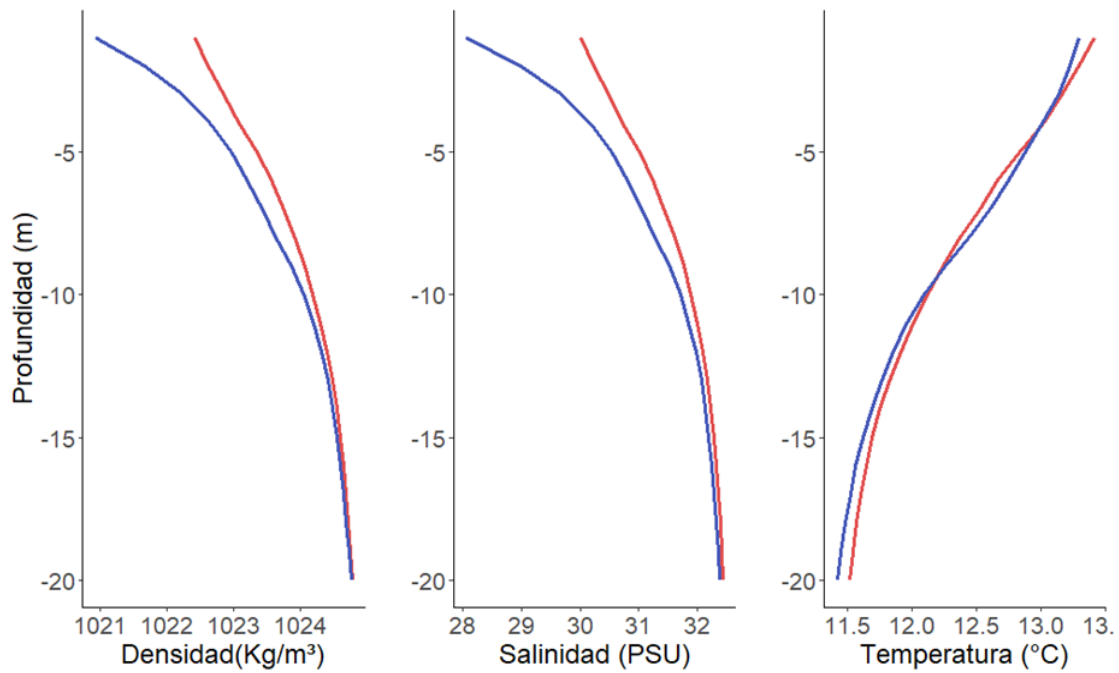


Figura 8. Caracterización ambiental de la columna de agua de localidades de muestreo; Se grafica el promedio de temperatura, salinidad y densidad entre los años 2013-2022 en Chaparano (línea azul) y Bahía Ilque (línea roja).

Tabla 3. Contribución relativa de la temperatura máxima, la profundidad y el rango de la salinidad en el modelo optimizado de RDA para *Mytilus chilensis* del Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile.

Variable	GL	Varianza	F	Pr(>F)
Temperatura Máx.	1	0,0334	5,1731	0,001
Rango salinidad	1	0,0151	2,3418	0,032
Residuales	87	0,5612		

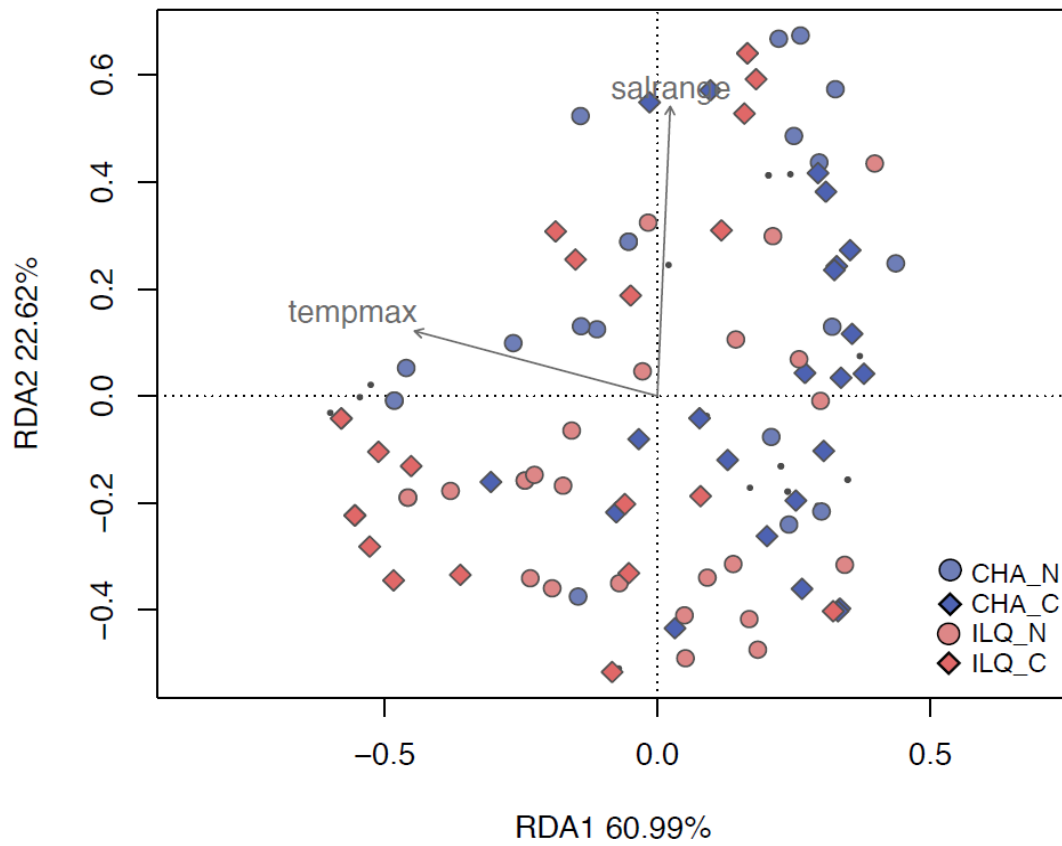


Figura 9. Análisis Parcial de Redundancia (p-RDA) basado en 18 SNPs outliers de *Mytilus chilensis* en el Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran homogeneidad genética a nivel neutral entre todas las poblaciones analizadas independiente si son naturales o de cultivo, lo que corrobora estudios en la especie, sugiriendo a *M. chilensis* como a una especie panmíctica (Larraín *et al.* 2014, Astorga *et al.* 2020, Segovia *et al.* sometido). Sin embargo, también se detectaron diferencias genéticas entre las poblaciones naturales y de cultivo de *Mytilus chilensis* que podrían estar asociadas a procesos selectivos en el Sistema Reloncaví.

Los datos putativamente neutrales muestran que no existe un patrón geográfico evidente en la diversidad genética entre las poblaciones de *M. chilensis* del Sistema Reloncaví, lo que es consistente con los registrados previamente en poblaciones naturales de esta especie utilizando marcadores SNPs (Araneda *et al.* 2016, Segovia *et al.* sometido) y con otros marcadores genéticos (Larraín *et al.* 2014, Astorga *et al.* 2020) en los que se observa una gran diversidad genética en la especie y una nula diferenciación genética entre las poblaciones del Sistema Reloncaví y el mar interior de Chiloé. Estos patrones, se han observado en distintas especies de invertebrados marinos con larvas planctónicas de larga duración (Cárdenas *et al.* 2009, Haye *et al.* 2014, Larraín *et al.* 2014) y se ajusta al paradigma de la conectividad marina, donde organismos con estadios larvales pelágicos prolongados tienden a mostrar un patrón de menor diferenciación entre sus poblaciones (Paulay & Meyer 2006, Selkoe & Toonen 2011). Cabe mencionar que en este estudio se evidenció una sutil diferencia, aunque no significativa, de la población de cultivo de Bahía Ilque con respecto a las otras poblaciones, lo que no ha sido reportado con anterioridad, aunque esto puede ser indicativo de la variación interanual que se ha reportado que en *M. chilensis* en poblaciones naturales (Haye & Segovia 2023).

En general, se ha detectado que *M. chilensis*, es una especie con una alta diversidad genética y una baja diferenciación entre sus poblaciones, dado por el alto flujo genético mediado por las larvas y por la translocación de individuos por la acuicultura (Toro *et al.* 2004, Astorga *et al.* 2010, Haye & Segovia 2023). La diversidad genética desempeña un papel fundamental en la plasticidad fenotípica, que permite a los organismos enfrentar la variabilidad ambiental a través de cambios morfológicos y fisiológicos (Vásquez *et al.* 2023). Se ha sugerido que, en poblaciones naturales de *M. chilensis*, la plasticidad fenotípica parece ser la estrategia predominante para enfrentar la variabilidad ambiental, más que la adaptación local (Haye & Segovia 2023, Segovia *et al.* sometido). En contraste, en este estudio encontramos evidencia discreta de

adaptación local explicada principalmente por la población de cultivo de Chaparano, siendo esta la primera evidencia de un filtro genotípico dado en poblaciones de cultivos en suspensión. Además, encontramos una diferenciación adaptativa, aunque menos marcada, entre las poblaciones de Bahía Ilque y Chaparano, independiente de si son o no de cultivo. En un estudio anterior, en el que exploraron los patrones de diversidad genética adaptativa de *M. chilensis*, utilizando SNPs, no detectaron diferencias entre las poblaciones del Sistema Reloncaví (Araneda *et al.* 2016), lo que contrasta con los hallazgos de este estudio. Cabe destacar que los sitios evaluados tienen una mayor proximidad geográfica con respecto a los del presente estudio, por lo que podrían no ser suficientemente contrastantes como para ejercer presiones selectivas diferenciales. Además, en este estudio, a diferencia del anteriormente mencionado, se utilizó el genoma de referencia de la especie (Gallardo-Escarate *et al.* 2023) para la obtención de SNPs, lo que resultó en la evaluación de una mayor cantidad de loci repartidos en el genoma, que podrían significar un aumento en la resolución, evidenciando señales de estructuración discreta.

Los análisis de asociación genómico-ambiental sugieren que la diferenciación de la población de cultivo de Chaparano con respecto al resto de las poblaciones analizadas, estaría dada por diferencias en las máximas de temperaturas registradas entre ambas localidades (Chaparano y Bahía Ilque) y entre las profundidades a las cuales se colectaron las muestras (naturales y cultivo). Por otro lado, las diferencias entre las poblaciones de Chaparano y Bahía Ilque parecen estar dadas por las diferencias entre el rango de la salinidad de ambas localidades. Se ha detectado diferenciación genética a una escala geográfica reducida, en especies marinas que además están presentes en zonas estuarinas, siendo la heterogeneidad ambiental la que implica esta estructuración (Canales-Aguirre *et al.* 2022, Ropp *et al.* 2023). La temperatura y la salinidad a menudo impulsan los patrones generales de distribución de invertebrados marinos (Blanchette *et al.* 2008) y parecen ser agentes selectivos que impulsan la divergencia adaptativa de varios invertebrados marinos (Sandford & Kelly 2011). Además, han sido reportadas como unas de las variables ambientales más importantes en el crecimiento (Robert *et al.* 1988, Manoj Nair & Appukuttan 2003) y sobrevivencia (Lazo & Pita 2012, Yuan *et al.* 2016) de larvas de bivalvos. Además, se ha observado en *M. edulis* un efecto de la temperatura en la tasa de filtración, la cual disminuye a temperaturas más bajas (Kittner & Riisgård 2005). Un estudio de *M. galloprovincialis* evidencia que la temperatura es uno de los factores que podrían estar modulando los patrones genéticos adaptativos de las poblaciones naturales de la especie en el mar Mediterráneo, no así la salinidad. Sin embargo, los gradientes salinos entre las localidades estudiadas en el mar Mediterráneo no eran tan marcados como los del Sistema Reloncaví (Wenne *et al.* 2022). Por otro lado, en un estudio donde realizaron trasplante recíproco en poblaciones

naturales de *M. chilensis* en localidades ambientalmente contrastantes, sugieren una potencial adaptación local de los rasgos ecofisiológicos asociados a la salinidad (Osores *et al.* 2017).

En otros estudios se ha registrado que los sistemas de cultivo, de mitílicos de otra especie, podrían estar subsidiando a las poblaciones naturales (Norrie *et al.* 2020), que las estructuras artificiales utilizadas para el cultivo estarían funcionando como “stepping stones” (Coolen *et al.* 2020) y que la alta mezcla antropogénica mediada por la translocación de individuos entre localidades puede facilitar la conectividad entre poblaciones naturales y cultivadas (Simon *et al.* 2009). Esto es consistente con los resultados obtenidos en este estudio para la estructura genética neutral. En mitílicos también se ha evidenciado una disminución de heterocigosidad en los sistemas de cultivo (Myrand *et al.* 2009). En este estudio, no se logra evidenciar cambios en la diversidad de poblaciones naturales y de cultivo, dado que nuestros resultados no muestran significancia estadística. Aunque, si evidenciamos una diferenciación de la composición genética en una de las poblaciones de cultivo, la que podría ser explicada por un filtro selectivo causado por el ambiente. Sin embargo, debemos ser cuidadosos con estos resultados, ya que esta diferenciación podría ser parte de la variabilidad temporal que se ha reportado anteriormente en *M. chilensis* (Haye & Segovia 2023).

Este conocimiento puede ser fundamental para desarrollar estrategias de manejo que promuevan la conservación de la diversidad genética y la salud de las poblaciones, garantizando así una gestión sostenible del Sistema Socio-Ecológico asociado al cultivo de esta especie. Además, resaltan la importancia de considerar tanto los factores naturales como los antropogénicos al estudiar la genética de las poblaciones de *M. chilensis*.

Sin embargo, se requieren estudios adicionales para comprender de mejor manera los mecanismos que subyacen esta diferenciación, como realizar monitoreos continuos de la diversidad genética adaptativa, para evaluar si la variación genética temporal de la especie puede afectar esta diferenciación a lo largo del tiempo. Además, sería importante ampliar el número de localidades a estudiar, para evaluar si esta diferenciación es algo exclusivo de la localidad de Chaparano, o se puede evidenciar en otras localidades con condiciones ambientales similares.

## CONCLUSIONES

Los patrones espaciales de diversidad genética de poblaciones naturales y de cultivo de *M. chilensis* parecen estar modulados por un alto flujo genético natural y antropogénico que mantienen a las poblaciones homogeneizadas. Sin embargo, este es el primer estudio que evidencia una diferenciación genética espacial adaptativa en cultivos en suspensión de *M. chilensis*, que podría estar modulada por diferencias entre las condiciones ambientales contrastantes del fiordo y seno de Reloncaví, asociadas con las máximas de temperatura y el rango de salinidad. Estas diferencias ambientales se explican por la influencia directa de las aguas continentales proveniente de los ríos en el fiordo de Reloncaví, que hacen de éste un ambiente dinámico y estratificado, con amplios rangos de salinidad y con variaciones incluso dentro de un mismo punto a diferentes profundidades.

Este estudio corresponde a la primera evidencia de estructuración genética adaptativa de las poblaciones de cultivo de *M. chilensis*, por lo que representa un avance en el entendimiento de los patrones genético-poblacionales de este socio-ecosistema y de cómo las variaciones ambientales podrían afectarles.

Sin embargo, es importante realizar monitoreos constantes de los patrones de diversidad genética que incluyan poblaciones naturales y de cultivo, ya que se ha observado en poblaciones naturales de la especie que puede existir variación temporal de los patrones genéticos espaciales, a causa de una disponibilidad diferencial de semillas. Además, es importante abarcar una mayor cantidad de localidades, para así entender de mejor manera la dinámica de este sistema y elaborar planes de manejo más informados que ayuden a mantener la salud genética de la especie y que la actividad sea sostenible a lo largo del tiempo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha, E. M., Mianzan, H. W., Guerrero, R. A., Favero, M., & Bava, J. (2004). Marine fronts at the continental shelves of austral South America: physical and ecological processes. *Journal of Marine Systems*, 44(1-2), 83-105.

Andrews, S. (2010). FastQC: una herramienta de control de calidad para datos de secuencia de alto rendimiento [en línea]. Disponible en línea en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Araneda, C., Larraín, M. A., Hecht, B., & Narum, S. (2016). Adaptive genetic variation distinguishes Chilean blue mussels (*Mytilus chilensis*) from different marine environments. *Ecology and Evolution*, 6(11), 3632-3644.

Astorga, M. P., Cárdenas, L., Pérez, M., Toro, J. E., Martínez, V., Farías, A., & Uriarte, I. (2020). Complex spatial genetic connectivity of mussels *Mytilus chilensis* along the Southeastern Pacific coast and its importance for resource management. *Journal of Shellfish Research*, 39(1), 77-86.

Benestan, L., Gosselin, T., Perrier, C., Sainte-Marie, B., Rochette, R., & Bernatchez, L. (2015). RAD genotyping reveals fine-scale genetic structuring and provides powerful population assignment in a widely distributed marine species, the American Lobster (*Homarus americanus*). *Molecular ecology*, 24(13), 3299-3315.

Blanchette, C. A., Melissa Miner, C., Raimondi, P. T., Lohse, D., Heady, K. E., & Broitman, B. R. (2008). Biogeographical patterns of rocky intertidal communities along the Pacific coast of North America. *Journal of Biogeography*, 35(9), 1593-1607.

Cáceres, M., & Valle-Levinson, A. (2010). Variabilidad transversal del flujo y salinidad en paso Nao. *Ciencia y Tecnología del Mar*, 33(2), 45-58.

Canales-Aguirre, C. B., Larson, W. A., McKinney, G. J., Claire, C. E., Rocha, J. D., Ceballos, S. G., ... & Gomez-Uchida, D. (2022). Neutral and adaptive loci reveal fine-scale population structure in *Eleginops maclovinus* from north Patagonia. *Ecology and Evolution*, 12(10), e9343.

Cárcamo, C., Comesana, A. S., Winkler, F. M., & Sanjuan, A. (2005). Allozyme identification of mussels (Bivalvia: *Mytilus*) on the Pacific coast of South America. *Journal of Shellfish Research*, 24(4), 1101-1115.

Castillo, M. I., Cifuentes, U., Pizarro, O., Djurfeldt, L., & Cáceres, M. (2016). Seasonal hydrography and surface outflow in a fjord with a deep sill: the Reloncaví fjord, Chile. *Ocean Science*, 12(2), 533-544.

Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., & Cresko, W. A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11), 3124-3140.

Chhatre, V. E., & Emerson, K. J. (2017). StrAuto: Automation and Parallelization of STRUCTURE Analysis. *BMC Bioinformatics*, 18:192. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s12859-017-1593-0>

Connor, K. M., Sung, A., Garcia, N. S., Gracey, A. Y., & German, D. P. (2016). Modulation of digestive physiology and biochemistry in *Mytilus californianus* in response to feeding level acclimation and microhabitat. *Biology Open*, 5(9), 1200-1210.

Contreras, J. y Godoy, C. (2021). Manual de procedimientos y buenas prácticas para la captación de semillas de chorito (*Mytilus chilensis*) en Áreas de Manejo y Explotación de Recursos Bentónicos. Fortalecimiento de la capacidad de adaptación en el sector pesquero y acuícola chileno al cambio climático. Santiago de Chile, 1-16.

Coolen, J. W., Boon, A. R., Crooijmans, R., Van Pelt, H., Kleissen, F., Gerla, D., ... & Luttikhuisen, P. C. (2020). Marine stepping-stones: Connectivity of *Mytilus edulis* populations between offshore energy installations. *Molecular Ecology*, 29(4), 686-703.

Cowen, R. K., & Sponaugle, S. (2009). Larval dispersal and marine population connectivity. *Annual Review of Marine Science*, 1, 443-466.

Cubillo, A. M., Peteiro, L. G., Fernández-Reiriz, M. J., & Labarta, U. (2012). Influence of stocking density on growth of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in suspended culture. *Aquaculture*, 342, 103-111.

Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., ... & Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, 10(2), giab008.

Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. Q., Catchen, J. M., & Blaxter, M. L. (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12(7), 499-510.

De Donato, M., Peters, S. O., Mitchell, S. E., Hussain, T., & Imumorin, I. G. (2013). Genotyping-by-sequencing (GBS): a novel, efficient and cost-effective genotyping method for cattle using next-generation sequencing. *PloS one*, 8(5), e62137.

Dresdner, J., O. Barriga, Y. Figueroa, N. González, K. Yubini. (2017). Estimación de empleo asociado a la industria miticultora nacional. Informe Final. Fondo de Investigación Pesquera y de la Acuicultura. Proyecto FIPA 2016-56, 230 pp.

Earl, D. A., & VonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4, 359-361.

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.

FAO, Ed. (2018). Meeting the sustainable development goals. Rome. 210 pp.

Foll, M., and O.E. Gaggiotti (2008). A genome scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics* 180: 977-993

Foll, M. (2012). BayeScan v2. 1 user manual. *Ecology*, 20(10), 1450-1462.

Gallardo-Escárate, C., Valenzuela-Muñoz, V., Nuñez-Acuña, G., Valenzuela-Miranda, D., Tapia, F. J., Yévenes, M., ... & Gerdol, M. (2023). Chromosome-level genome assembly of the blue mussel *Mytilus chilensis* reveals molecular signatures facing the marine environment. *Genes*, 14(4), 876.

Haye, P. A., Segovia, N. I., Muñoz-Herrera, N. C., Gálvez, F. E., Martínez, A., Meynard, A., ... & Faugeron, S. (2014). Phylogeographic structure in benthic marine invertebrates of the southeast Pacific coast of Chile with differing dispersal potential. *PLoS One*, 9(2), e88613.

- Haye, P. A., & Segovia, N. I. (2023). Shedding light on variation in reproductive success through studies of population genetic structure in a Southeast Pacific Coast mussel. *Heredity*, 130(6), 402-413.
- Haynes, W. (2013). Benjamini–hochberg method. *Encyclopedia of systems biology*, 78.
- Iriarte, J. L., Pantoja, S., & Daneri, G. (2014). Oceanographic processes in Chilean fjords of Patagonia: from small to large-scale studies. *Progress in Oceanography*, 129, 1-7.
- Jahnsen-Guzmán, N., Lagos, N. A., Lardies, M. A., Vargas, C. A., Fernández, C., San Martín, V. A., ... & Duarte, C. (2021). Environmental refuges increase performance of juvenile mussels *Mytilus chilensis*: implications for mussel seedling and farming strategies. *Science of the Total Environment*, 751, 141723.
- Jombart, T., & Collins, C. (2017). A tutorial for Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC) using adegenet 2.1.0. Imperial College, London, United Kingdom.
- Kinlan, B. P., & Gaines, S. D. (2003). Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. *Ecology*, 84(8), 2007-2020.
- Kittner, C., & Riisgård, H. U. (2005). Effect of temperature on filtration rate in the mussel *Mytilus edulis*: no evidence for temperature compensation. *Marine Ecology Progress Series*, 305, 147-152.
- Kong, L., & Li, Q. (2007). Genetic comparison of cultured and wild populations of the clam *Coelomactra antiquata* (Spengler) in China using AFLP markers. *Aquaculture*, 271(1-4), 152-161.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, 15(5), 1179-1191.
- Larraín, M. A., Díaz, N. F., Lamas, C., Uribe, C., & Araneda, C. (2014). Traceability of mussel (*Mytilus chilensis*) in southern Chile using microsatellite molecular markers and assignment algorithms. *Exploratory survey. Food Research International*, 62, 104-110.
- Laursen, R. A. (1992). Reflections on the structure of mussel adhesive proteins. *Structure, Cellular Synthesis and Assembly of Biopolymers*, 55-74.
- Lazo, C. S., & Pita, I. M. (2012). Effect of temperature on survival, growth and development of *Mytilus galloprovincialis* larvae. *Aquaculture Research*, 43(8), 1127-1133.
- Lehnert, S. J., DiBacco, C., Van Wyngaarden, M., Jeffery, N. W., Ben Lowen, J., Sylvester, E. V., ... & Bradbury, I. R. (2019). Fine-scale temperature-associated genetic structure between inshore and offshore populations of sea scallop (*Placopecten magellanicus*). *Heredity*, 122(1), 69-80.
- León-Muñoz, J., Marcé, R., & Iriarte, J. L. (2013). Influence of hydrological regime of an Andean river on salinity, temperature and oxygen in a Patagonia fjord, Chile. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 47(4), 515-528.
- Levin, L. A. (2006). Recent progress in understanding larval dispersal: new directions and digressions. *Integrative and Comparative Biology*, 46(3), 282-297.
- Li H. and Durbin R. (2009) Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics*, 25:1754-60.

Manoj Nair, R., & Appukuttan, K. K. (2003). Effect of temperature on the development, growth, survival and settlement of green mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, 34(12), 1037-1045.

Marshall, D. J., Monro, K., Bode, M., Keough, M. J., & Swearer, S. (2010). Phenotype–environment mismatches reduce connectivity in the sea. *Ecology Letters*, 13(1), 128-140.

Meirmans, P. G. (2020). Genodive version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 1126-1131.

Mendiola, M. J. R., & Ravago-Gotanco, R. (2021). Genetic differentiation and signatures of local adaptation revealed by RADseq for a highly dispersive mud crab *Scylla olivacea* (Herbst, 1796) in the Sulu Sea. *Ecology and Evolution*, 11(12), 7951-7969.

Molinet, C., Astorga, M., Cares, L., Diaz, M., Hueicha, K., Marín, S., ... & Soto, D. (2021). Vertical distribution patterns of larval supply and spatfall of three species of Mytilidae in a Chilean fjord used for mussel farming: Insights for mussel spatfall efficiency. *Aquaculture*, 535, 736341.

Myrand, B., Tremblay, R., & Sévigny, J. M. (2009). Decreases in multi-locus heterozygosity in suspension-cultured mussels (*Mytilus edulis*) through loss of the more heterozygous individuals. *Aquaculture*, 295(3-4), 188-194.

Nam, B. H., Kim, H., Seol, D., Kim, H., Noh, E. S., Kim, E. M., ... & Kwak, W. (2021). Genotyping-by-Sequencing of the regional Pacific abalone (*Haliotis discus*) genomes reveals population structures and patterns of gene flow. *Plos one*, 16(4), e0247815.

Narum, S. R., Buerkle, C. A., Davey, J. W., Miller, M. R., & Hohenlohe, P. A. (2013). Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. *Molecular ecology*, 22(11), 2841.

Narváez, D. A., Vargas, C. A., Cuevas, L. A., García-Loyola, S. A., Lara, C., Segura, C., ... & Broitman, B. R. (2019). Dominant scales of subtidal variability in coastal hydrography of the Northern Chilean Patagonia. *Journal of Marine Systems*, 193, 59-73.

Navarro, JM, Torres, R., Acuña, K., Duarte, C., Manriquez, PH, Lardies, M., ... & Aguilera, V. (2013). Impacto de la exposición a mediano plazo a niveles elevados de pCO<sub>2</sub> en la energía fisiológica del mejillón *Mytilus chilensis*. *Quimiosfera*, 90 (3), 1242-1248.

Norrie, C., Dunphy, B., Roughan, M., Weppe, S., & Lundquist, C. (2020). Spill-over from aquaculture may provide a larval subsidy for the restoration of mussel reefs. *Aquaculture Environment Interactions*, 12, 231-249.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H. and Wagner, H. (2014) *Vegan: Community Ecology Package*. R Package Version 2.2-0. <http://CRAN.Rproject.org/package=vegan>

Osores, S. J., Lagos, N. A., San Martin, V., Manriquez, P. H., Vargas, C. A., Torres, R., ... & Lardies, M. A. (2017). Plasticity and inter-population variability in physiological and life-history traits of the mussel *Mytilus chilensis*: a reciprocal transplant experiment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 490, 1-12.

Ouillon, N., Sokolov, E. P., Otto, S., Rehder, G., & Sokolova, I. M. (2021). Effects of variable oxygen regimes on mitochondrial bioenergetics and reactive oxygen species production in a marine bivalve, *Mya arenaria*. *Journal of Experimental Biology*, 224(4), jeb237156.

Palumbi, S. R. (2004). Marine reserves and ocean neighborhoods: the spatial scale of marine populations and their management. *Annual Review of Environmental Resources*, 29, 31-68.

Paulay, G., & Meyer, C. (2006). Dispersal and divergence across the greatest ocean region: do larvae matter? *Integrative and Comparative Biology*, 46(3), 269-281.

Pearman, W. S., Urban, L., & Alexander, A. (2022). Commonly used Hardy–Weinberg equilibrium filtering schemes impact population structure inferences using RADseq data. *Molecular Ecology Resources*, 22(7), 2599-2613.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

Robert, R., His, E., & Dinet, A. (1988). Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the European flat oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*, 97, 95-100.

Ropp, A. J., Reece, K. S., Snyder, R. A., Song, J., Biesack, E. E., & McDowell, J. R. (2023). Fine-scale population structure of the northern hard clam (*Mercenaria mercenaria*) revealed by genome-wide SNP markers. *Evolutionary Applications*, 16(8), 1422-1437.

Saldías, G. S., Hernández, W., Lara, C., Muñoz, R., Rojas, C., Vásquez, S., ... & Soto-Mardones, L. (2021). Seasonal variability of SST fronts in the Inner Sea of Chiloé and its adjacent coastal ocean, northern Patagonia. *Remote Sensing*, 13(2), 181.

Sanford, E., & Kelly, M. W. (2011). Local adaptation in marine invertebrates. *Annual Review of Marine Science*, 3, 509-535.

Segovia, N. I., González-Wevar, C. A., & Haye, P. A. (2020). Signatures of local adaptation in the spatial genetic structure of the ascidian *Pyura chilensis* along the southeast Pacific coast. *Scientific Reports*, 10(1), 14098.

Segovia, N. I., González-Wevar, C. A., Naretto, J., Rosenfeld, S., Brickle, P., Hüne, M., ... & Poulin, E. (2022). The right tool for the right question: contrasting biogeographic patterns in the nototheniid fish *Harpagifer* spp. along the Magellan Province. *Proceedings of the Royal Society B*, 289(1972), 20212738.

Segovia, N.I., Coral-Santa Cruz, D., Haye P.A. (2023). Genetic homogeneity and lack of signatures of local adaptation makes it unlikely to genetically trace geographic origin of a marine mussel [Manuscript submitted for publication].

Selander, R. K., & Kaufman, D. W. (1975). Genetic structure of populations of the brown snail (*Helix aspersa*). I. Microgeographic variation. *Evolution*, 385-401.

Selkoe, K. A., & Toonen, R. J. (2011). Marine connectivity: a new look at pelagic larval duration and genetic metrics of dispersal. *Marine Ecology Progress Series*, 436, 291-305.

SERNAPESCA (2000-2022) Anuario estadístico de pesca, 2000-2022. Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía Fomento y Reconstrucción, Santiago, Chile.

Sievers, H. A. (2008). Water masses and circulation in austral Chilean channels and fjords. Progress in the oceanographic knowledge of Chilean interior waters, from Puerto Montt to Cape Horn, 53-58.

Silva, N., Haro, J., & Prego, R. (2009). Metals background and enrichment in the Chiloé Interior Sea sediments (Chile). Is there any segregation between fjords, channels and sounds? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 82(3), 469-476.

Silverman, H.G., Roberto, F.F. (2010). Byssus Formation in *Mytilus*. In: von Byern, J., Grunwald, I. (eds) *Biological Adhesive Systems*. Springer, Vienna. [https://doi-org.dti.sibucsc.cl/10.1007/978-3-7091-0286-2\\_18](https://doi-org.dti.sibucsc.cl/10.1007/978-3-7091-0286-2_18).

Simon, A., Arbiol, C., Nielsen, E. E., Couteau, J., Sussarellu, R., Burgeot, T., ... & Bierne, N. (2020). Replicated anthropogenic hybridisations reveal parallel patterns of admixture in marine mussels. *Evolutionary Applications*, 13(3), 575-599.

Tan, B., Zhang, D., Tian, Y., Mao, J., Wang, X., Wang, L., ... & Hao, Z. (2023). Genetic structure and local adaptation of *Neptunea cumingii* crosse populations in China based on GBS technology. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 11, 1154781.

Alfredo Tello, G., & Rodriguez-Benito, C. (2009). Characterization of mesoscale spatio-temporal patterns and variability of remotely sensed Chl a and SST in the Interior Sea of Chiloe (41.4-43.5° S). *International Journal of Remote Sensing*, 30(6), 1521-1536.

Toro, J.E., Alcapán, A.C., Vergara, A.M., Ojeda, J.A. (2004). Heritability estimates of larval and spat shell height in the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) produced under controlled laboratory conditions. *Aquaculture Research* 35(1): 56-61. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2004.00985.x.

Toro, J.E., Castro, G.C., Ojeda, J.A., Vergara, A.M. (2006). Allozymic variation and differentiation in the Chilean blue mussel, *Mytilus chilensis*, along its natural distribution. *Genetics and Molecular Biology* 29(1): 174-179. DOI: 10.1590/S1415-47572006000100031.

Valle-Levinson, A., Sarkar, N., Sanay, R., Soto, D., & León, J. (2007). Spatial structure of hydrography and flow in a Chilean fjord, Estuario Reloncaví. *Estuaries and Coasts*, 30, 113-126.

Vásquez, S. I., de la Torre, M. B., Saldías, G. S., & Montecinos, A. (2021). Meridional changes in satellite chlorophyll and fluorescence in optically-complex coastal waters of northern Patagonia. *Remote Sensing*, 13(5), 1026.

Vásquez, C., Quiñones, R. A., Brante, A., & Hernández-Miranda, E. (2023). Genetic diversity and resilience in benthic marine populations. *Revista Chilena de Historia Natural*, 96(1), 4.

Wenne, R., Zbawicka, M., Prądzińska, A., Kotta, J., Herkül, K., Gardner, J. P. A., ... & Kent, M. P. (2022). Molecular genetic differentiation of native populations of Mediterranean blue mussels, *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819, and the relationship with environmental variables. *The European zoological journal*, 89(1), 755-784.

Yuan, W. S., Walters, L. J., Brodsky, S. A., Schneider, K. R., & Hoffman, E. A. (2016). Synergistic effects of salinity and temperature on the survival of two nonnative bivalve molluscs, *Perna viridis* (Linnaeus 1758) and *Mytella charruana* (d'Orbigny 1846). *Journal of Marine Sciences*, 2016.

## ANEXO

Tabla A 1. Parámetros de variables ambientales utilizados en el p-RDA en *Mytilus chilensis* del Sistema Reloncaví, Región de los Lagos, Chile. CHA\_N: Chaparano natural, CHA\_C: Chaparano cultivo, ILQ\_N: Bahía Ilque natural y ILQ\_C: Bahía Ilque cultivo.

Acrónimo	Temperatura (°C)					Salinidad (PSU)					Densidad (Kg/m3)				
	Media	Mínima	Máxima	Rango	Varianza	Media	Mínima	Máxima	Rango	Varianza	Media	Mínima	Máxima	Rango	Varianza
CHA_N	13.222	8.189	21.642	13.453	5.901	28.905	10.750	33.394	22.644	7.986	1021.618	1008.147	1025.456	17.309	5.424
CHA_C	12.879	9.889	18.241	8.352	3.924	30.505	23.153	33.730	10.577	2.707	1022.944	1016.953	1025.875	8.922	2.256
ILQ_N	13.291	9.160	20.959	11.799	6.331	30.237	22.819	34.278	11.459	4.131	1022.633	1017.221	1026.299	9.078	3.428
ILQ_C	12.843	9.366	19.940	10.574	4.258	30.998	24.490	34.289	9.799	2.242	1023.330	1018.417	1026.305	7.888	2.023

