



**INIDEP**

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACION  
Y DESARROLLO PESQUERO

# INFORME DE INVESTIGACIÓN

Número

024

Páginas

012

Fecha de aprobación

14 ABR 2015

Dirección

DIRECCIÓN DE PESQUERIAS PELAGICAS Y MEDIO AMBIENTE

Programa / Gabinete

Gabinete de Biología Molecular y Microbiología

Actividad

Desarrollo de marcadores moleculares para el estudio de genética de poblaciones de organismos marinos.

## LOS SNPS (*Single Nucleotide Polimorphisms*) COMO MARCADORES PARA ESTUDIOS DE BIOGEOGRAFÍA MOLECULAR Y TRAZABILIDAD EN *Mytilus edulis platensis*: RESULTADOS PRELIMINARES

En este informe se presentan los resultados preliminares de la aplicación de marcadores moleculares SNPs (polimorfismos de nucleótido único) en el género *Mytilus* con el objetivo de determinar el *status* taxonómico de los mejillones e identificar sus productos derivados así como la pureza de la especie y su origen biogeográfico. Este trabajo es resultado de la colaboración entre el INIDEP y el Instituto de Oceanología de la Academia de Ciencias Polaca (IO PAN) para el proyecto "Biogeografía molecular de mejillones marinos y trazabilidad de sus productos alimenticios importados a Polonia" dirigido por el Dr. R. Wenne. Los SNPs fueron identificados en secuencias codificantes y no codificantes en genes de la familia de las histonas, Hsp70, p53 y en ESTs (*expressed sequence tags*). Hasta ahora se analizaron 198 ejemplares de 7 muestras de la costa argentina con 55 SNPs que fueron también aplicados a otras especies de *Mytilus* de ambos hemisferios. Los índices de diferenciación, el análisis de correspondencia y estructura mostraron la discriminación entre *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, así como la cercanía de las muestras argentinas a *M. edulis*, si bien conformando una población diferenciada. Estos marcadores moleculares implican un gran avance ya que permitirá el control de importaciones, etiquetado y trazabilidad de los mejillones aumentando el valor de los productos finales.

Citar Indicando la fuente. El contenido no debe ser reproducido total o parcialmente sin la expresa conformidad del INIDEP

Institución

**SOLICITADO POR**

Marcela Costagliola

Cargo

Jefa de Gabinete de Biología Molecular y Microbiología

**PREPARADO POR**

Firma:

Nombre: TRUCCO, MARIA INES

**APROBADO POR**

Jefe de Programa / Gabinete

Director de área

Dr. OTTO C. WÖHLER  
DIRECTOR  
Dirección Nacional de Investigación  
INIDEP  
Director Nacional de Investigación

Director del INIDEP



# LOS SNPs (SINGLE NUCLEOTIDE POLIMORPHISMS) COMO MARCADORES PARA ESTUDIOS DE BIOGEOGRAFÍA MOLECULAR Y TRAZABILIDAD EN *Mytilus edulis platensis*: RESULTADOS PRELIMINARES

TRUCCO, MARÍA INÉS

Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero

## Introducción

En los últimos años se ha avanzado notablemente en la identificación de marcadores moleculares por medio de tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) que permite que la secuenciación completa de pequeños fragmentos del ADN (30-400 pb) sea realizada en centenares de reacciones paralelas para obtener datos de secuenciación en forma masiva. Se realiza mediante el uso de plataformas que automatizan el proceso de genotipado masivo, como GS FLX 454 de Roche y Genome Analyzer IIX de Illumina, reduciendo enormemente los costos del proceso de secuenciación (Landi y Valiente, 2011). Con la introducción de esta tecnología se desarrolló un marcador nuevo y poderoso que incluso permite comparaciones a nivel inter-individual, los polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs (*Single Nucleotide Polimorphisms*) (ICES, 2007). Un SNP es una variación en el genoma que se produce en una sola base de la secuencia codificante y no codificante del ADN. Puede incluso encontrarse próximo a un determinado gen alterado con el que segrega en forma conjunta, lo cual lo transforma en un indicador útil para detectar potenciales anomalías génicas o enfermedades.

El origen de un SNP se produce cuando ocurre una mutación puntual en el genoma, convirtiendo un nucleótido en otro (Figura 1). Si la mutación ocurre en las células reproductivas de un individuo, puede ser transmitida a la descendencia y luego de muchas generaciones, el SNP se establecería en la población. Son de herencia codominante, bialélicos, poseen menor tasa de error de genotipado que los microsatélites ó la amplificación aleatoria de polimorfismos de ADN (RAPDs, *Random amplification of polymorphic DNA*) y su baja tasa de mutación ( $10^{-8}$ - $10^{-9}$ ) los convierte en marcadores idóneos para estudios poblacionales y evolutivos (Brumfield *et al.*, 2003).

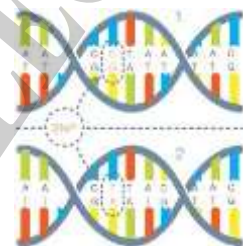


Figura 1. Origen de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).

El campo de aplicación de los SNPs es variado, por ejemplo, en acuicultura resultan importantes ya que permiten diferenciar individuos cultivados de salvajes o inferir parentesco, en estudios de adaptación permiten la identificación de regiones genómicas que puedan estar sujetas a selección, en estudios sobre el sistema inmune de bivalvos han sido identificados en genes que muestran susceptibilidad a patógenos y enfermedades, se usan en análisis de rastreabilidad genética y además constituyen el marcador de elección entre laboratorios que se ocupan de estudios de monitoreo migratorio o de evaluación de estructura poblacional (Allendorf y Seeb, 2000; Morin *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2009; Seeb *et al.*, 2011; Gallardo-Escárate *et al.*, 2013; Montes *et al.*, 2013; Núñez-Acuña y Gallardo-Escárate, 2013).



Existen distintas metodologías de identificación y genotipado de estos marcadores y la elección de una en particular dependerá de si el SNP es conocido o no, el tipo de estudios que se realizará con ellos y si se comprende el funcionamiento del sistema de obtención de los mismos (Ragoussis, 2006). Constituye una ventaja el hecho de que puedan ser detectados sobre paneles (*arrays* o *chips*) de fase sólida, sin necesidad del empleo de electroforesis en geles. Algunos de los métodos son, por ejemplo, mediante secuenciación directa de toda la región de interés, discriminación alélica mediante sondas Taqman, pirosecuenciación, micromatrices de ADN (*microarrays*), PCR en tiempo real y mediante espectrometría MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry*) (Kwok, 2001). En general todos hacen uso de etiquetado con fluorescencia no sólo por su alto rendimiento y bajo costo sino por el desarrollo de programas que automatizan todo el proceso y acortan el tiempo de finalización de proyectos a gran escala (Brumfield *et al.*, 2003).

Los mejillones del género *Mytilus* han sido estudiados con marcadores isoenzimáticos y de ADN (Mc Donald *et al.*, 1991; Inoue *et al.*, 1995; Daguin *et al.*, 2001; Riginos *et al.*, 2002; Bierne *et al.*, 2003) por su importancia económica, ya sea por explotación de sus bancos naturales o por ser extensivamente cultivados en distintas regiones de ambos hemisferios (Gardner y Westfall, 2012) dando lugar a una importante industria de alimento fresco, congelado y enlatado. De los extensos estudios realizados en el género ha quedado establecido que existe simpatria (las distintas especies comparten mismo hábitat) y siempre que el rango de distribución de dos especies de *Mytilus* solapan, se forman híbridos con distinto grado de introgresión de alelos (movimiento de genes de una especie a otra a través de la hibridación, seguida por retrocruzamiento con la especie parental) (Bulnheim y Gosling, 1988; Väinölä y Hvilsum, 1991; Rawson *et al.*, 1999). Además, la presencia actual de algunas especies de mejillón en regiones donde no existen sus registros fósiles, puede deberse a introducción por el hombre o por descarga del agua de lastre de barcos (Grant y Cherry, 1985; Lee y Morton, 1985; McDonald y Koehn, 1988; Geller *et al.*, 1994), lo cual habría facilitado su expansión. En general la distribución de las distintas especies está establecida en ambos hemisferios (Koehn, 1991; Gosling, 1992; Kijewski *et al.*, 2011), sin embargo la identificación correcta y el conocimiento de la extensión de la hibridación depende en gran medida de la potencia del marcador genético utilizado para diferenciar exactamente y de forma consistente las distintas especies.

Otra aplicación de los marcadores moleculares en mejillones es la identificación de especies para asegurar un correcto etiquetado del producto pesquero y la procedencia de las materias primas, por ejemplo, en una cadena alimentaria. La trazabilidad o rastreabilidad se define como la posibilidad de encontrar o seguir el rastro a través de todas las etapas de producción, transformación y distribución de un animal, alimento o sustancia (FAO/OMS, 2011). Los marcadores moleculares deben reunir una serie de características para ser usados en trazabilidad: ser repetibles e intercambiables en distintos laboratorios, de obtención rápida, que detecten mucha variabilidad, que tengan un bajo coste tanto en la obtención como en la aplicación y que sean fácilmente interpretables de una forma objetiva. Desde el 1 de Enero del 2005 es obligatorio en toda Europa disponer de un sistema de trazabilidad extensivo a todos los sectores alimentarios (Reglamento (CE) 178/2002 del Parlamento Europeo (COFI-FT-IX, 2004/5)).

El problema que presenta la comercialización de los bivalvos es que la mayoría de las especies son presentadas sin valvas o con sólo una de ellas y este hecho impide la identificación morfológica de las especies en el género *Mytilus*. Por lo tanto los mejillones podrían ser etiquetados en forma errónea debido a la falta de valvas, lo que hace necesario el desarrollo de métodos basados en técnicas no morfológicas para garantizar el requerimiento del etiquetado de cada etapa en la elaboración de sus productos (Santaclara *et al.*, 2006; Espiñeira *et al.*, 2009).

Uno de los países europeos, que en los últimos cinco años ha mostrado una mayor demanda de mariscos importados, es Polonia si bien el consumo de productos del mar sigue siendo relativamente bajo. El potencial del mercado para mejillones está determinado principalmente por el cambio positivo de la población a consumir productos de tipo *gourmet*, al aumento del poder adquisitivo y la oferta en el mercado, especialmente en áreas urbanas (ProChile, 2012).

En el marco del proyecto “Biogeografía molecular de mejillones marinos y trazabilidad de sus productos alimenticios importados a Polonia” dirigido por el Dr. Roman Wenne del Instituto de Oceanología de la Academia de Ciencias Polaca (IO PAN), se contó con la colaboración del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP) para descubrir nuevos marcadores moleculares basados en polimorfismos de nucleótido único (SNPs) y aplicarlos para estudios biogeográficos de mejillón. Como antecedente, ya se han localizado SNPs en secuencias codificantes y no codificantes de algunos genes funcionalmente importantes y aplicados en los taxones europeos de *Mytilus* a gran escala: fueron descubiertos nueve SNPs situados en los genes de la familia de las histonas, Hsp70, p53 y ESTs (*Expressed Sequence Tags*) y aplicados en *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus* (Zbawicka *et al.*, 2012).

El objetivo del proyecto es la identificación de las especies de *Mytilus* de distintas zonas biogeográficas mediante la aplicación de SNPs como marcadores moleculares. Esto permitirá determinar el *status* taxonómico de los mejillones y la identificación de sus productos derivados, así como la pureza de la especie y su origen biogeográfico. El objetivo específico de este trabajo fue la obtención de muestras de mejillón de la costa argentina y la colaboración en el análisis de resultados sobre el *status* taxonómico del *Mytilus* presente en Argentina.

## Materiales y métodos

Todos los mejillones fueron identificados previamente usando los marcadores nucleares ME 15/16 localizados en el gen de la proteína adhesiva (Inoue *et al.*, 1995) y que sirven para discriminar entre los tres taxones, *M. edulis*, *M. trossulus* y *M. galloprovincialis*. Las muestras correspondientes a estos taxones fueron procesadas en el Laboratorio de Genética de Organismos Marinos del Instituto de Oceanología en Polonia así como el descubrimiento de las secuencias en las cuales se identificaron los SNPs. Se utilizó la tecnología de secuenciación y genotipado del sistema Sequenom IPLEX *MassARRAY* (Gabriel *et al.*, 2009) para identificar SNPs en *Mytilus* spp. El método IPLEX se basa en un ensayo simple de extensión por cebador diseñado para detectar variaciones de una sola base nucleotídica. Consiste en una PCR *multiplex* (PCR en la cual se amplifica simultáneamente más de una secuencia de ADN) que primero amplifica una región corta de ADN (aprox. 80 pares de bases) cercana al SNP de interés. Posteriormente, una mezcla de diferentes cebadores de extensión (por lo menos uno para cada posición de SNP a ensayar) hibrida con el ADN amplificado de cada SNP objetivo y la reacción termina cuando la enzima polimerasa añade una base de término modificada adyacente a cada cebador, llevándose a cabo una reacción de extensión o fragmentación. Cada uno de los cebadores extendidos (analito) tendrá una diferencia alelo-específica de masa lo suficientemente grande para ser detectada por el sistema *MassARRAY*. Posteriormente, el software de análisis de datos (Typer 3.4) puede determinar qué terminador se añadió a cada cebador de extensión y, por tanto asignar el nucleótido en la posición de SNP. Una visión general del protocolo se proporciona en las Figuras 2 y 3.



Figura 2. Ensayo de genotipificación iPLEX® Gold con el sistema de *MassARRAY* (modificado de Agena Bioscience.)

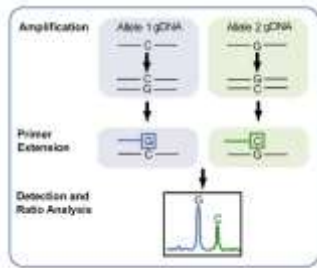


Figura 3. Detección de SNPs por análisis de proporción de masas del producto extendido.

El número de SNPs que se estudiaron en las muestras procedentes de distintos lugares de Europa y América fueron en total 55: 9 SNPs estudiados en *Mytilus* europeos (Zbawicka *et al.*, 2012), 24 estudiados en *Mytilus* del Mar Báltico y Mar del Norte (Zbawicka *et al.*, 2014) y 22 recientemente identificados a partir de EST (*expressed sequence tags*) (datos no publicados).

Las muestras de la Argentina fueron tomadas durante los años 2012 a 2014 en distintas zonas según se observa en la Figura 4. Las muestras denominadas ARG 30, 69 y 73 se obtuvieron de la campaña costera OB03-12 del buque de investigación Capitán Oca Balda realizada del 5 al 12 de diciembre del 2012. Durante octubre y diciembre del 2013 se obtuvieron las muestras correspondientes a Isla de Los Pájaros (ILP) y Puerto Madryn (PMD) en Chubut y Bahía Cauquén, en Ushuaia (UBC). Todas las muestras son de bancos naturales salvo la muestra proveniente de San Antonio Oeste (SAO) que corresponde a una muestra comercial y no se sabe exactamente si son de bancos naturales o de cultivo. Los datos procesados hasta el momento corresponden a las muestras que figuran en la Tabla 1.

Posteriormente, durante marzo y abril del 2014, se obtuvieron muestras de Rada Tilly (CR) y de Bahía Camarones (CAM) en Chubut y de Camet, en la costa de Mar del Plata (MDP). En total, 150 ejemplares, que al igual que las muestras anteriormente mencionadas, fueron diseccionados obteniéndose muestras de músculo aductor o borde del manto para la extracción de ADN, colocados en tubos con alcohol al 95% y enviados a Polonia para ser posteriormente analizados para los 55 SNPs. De éstas muestras aún no se tienen los resultados.

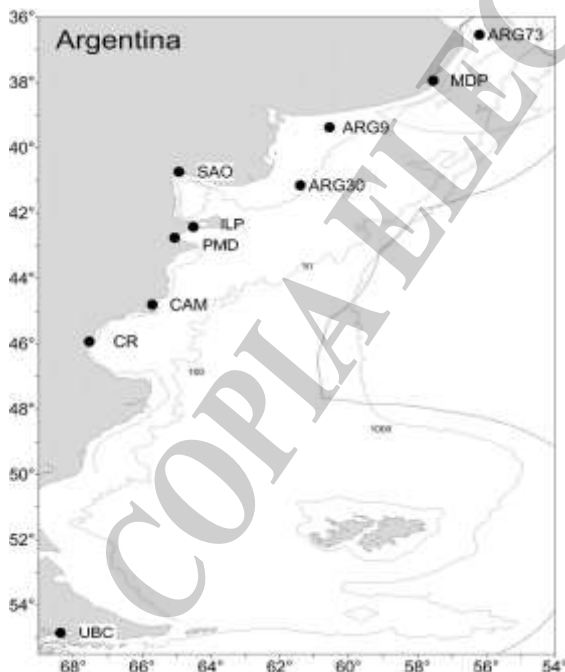


Figura 4. Localización de las muestras de *Mytilus edulis platensis* obtenidas de bancos naturales de la costa argentina.

Tabla 1. Especies de mejillón (*Mytilus*) analizadas mediante SNPs hasta el presente, zona de muestreo y número de ejemplares analizados para cada especie.

Muestras	Abreviac.	Localidad	Especie	Número
1	ARG30	Argentina	<i>M. edulis platensis</i>	30
2	ARG73	Argentina	<i>M. edulis platensis</i>	30
3	ARG69	Argentina	<i>M. edulis platensis</i>	30
4	ILP	Argentina	<i>M. edulis platensis</i>	30
5	SAO	Argentina	<i>M. edulis platensis</i>	20
6	PMD	Argentina	<i>M. edulis platensis</i>	28
7	UBC	Argentina	<i>M. edulis platensis</i>	30
8	PZC	Chile	<i>M. chilensis</i>	30
9	IRD	USA	<i>M. edulis</i>	30
10	NZA	Nueva Zelanda	<i>M. galloprovincialis</i>	30
11	SIS	Italia	<i>M. galloprovincialis</i>	32
12	PBAT	Canada	<i>M. trossulus</i>	10

El análisis de datos fue realizado en el laboratorio del Dr. Wenne. El programa Arlequin v3.5 (Excoffier y Lischer, 2010) se utilizó para calcular la matriz de diferenciación  $F_{ST}$  entre los lugares de muestreo la que fue usada para construir un árbol *neighbor-joining* para ilustrar la relación genética entre todas las muestras, usando el programa MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007).

Se realizó un análisis de correspondencia mediante un diagrama de dispersión donde los ejes representan la contribución de la inercia de la matriz de datos, equivalente a la contribución a la variabilidad total de las frecuencias alélicas. Cada punto en el diagrama representó un individuo. Mediante el programa Structure v. 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2007) se evaluó la estructura poblacional y se estableció la asignación de cada individuo a un agrupamiento genético. Se asumió el modelo de mezcla, ignorando la filiación de la muestra y permitiendo la correlación de las frecuencias alélicas entre los agrupamientos. El modelo de mezcla permite conocer la estructura individual con ascendencia mixta, es decir, conocer si las fracciones del genoma podrían provenir de diferentes ancestros, lo cual es importante para el análisis de muestras provenientes de zonas híbridas (Zbawicka *et al.*, 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El total de ejemplares argentinos procesados y enviados a Polonia en junio del 2013 y enero del 2014 fue de 198. Se identificaron y aplicaron 55 SNPs como marcadores moleculares para discriminar entre los taxones de *Mytilus* en 330 ejemplares de mejillón provenientes de 12 localidades de ambos hemisferios. Los SNPs fueron localizados en secuencias codificantes y no codificantes de genes funcionalmente importantes.

El árbol *neighbor-joining* construido a partir de la matriz  $F_{ST}$  y que muestra la relación genética entre las muestras se presenta en la Figura 5. Las tres especies de referencia de *Mytilus*, *M. edulis* (IRD), *M. trossulus* (PBAT) y *M. galloprovincialis* (SIS) fueron claras, y con buena resolución para *M. trossulus*. Esta mejor resolución para *M. trossulus* podría deberse, según Zbawicka *et al.* (2012), a la facilidad de encontrar SNPs que discriminan mejor a *M. trossulus* de los otros taxones de *Mytilus*. Por otro lado, se observó que cinco de las muestras argentinas son más cercanas a *M. edulis* (IRD) aunque diferenciadas, lo cual es concordante con estudios previos realizados con alozimas y que justifican el *status* de subespecie *platensis* (Trucco, 2001). Además, se observó que la muestra de Ushuaia (UBC) se corresponde con la muestra obtenida de Chile (PZC), clasificada como *M. chilensis*. Esta clasificación aún sigue siendo motivo de controversia, ya que algunos autores consideran que el mejillón presente en las costas de Chile está relacionado con



*M. edulis* y otros autores con *M. galloprovincialis* (Toro *et al.*, 2004; Cárcamo *et al.*, 2005; Borsa *et al.*, 2012; Larraín *et al.*, 2012).

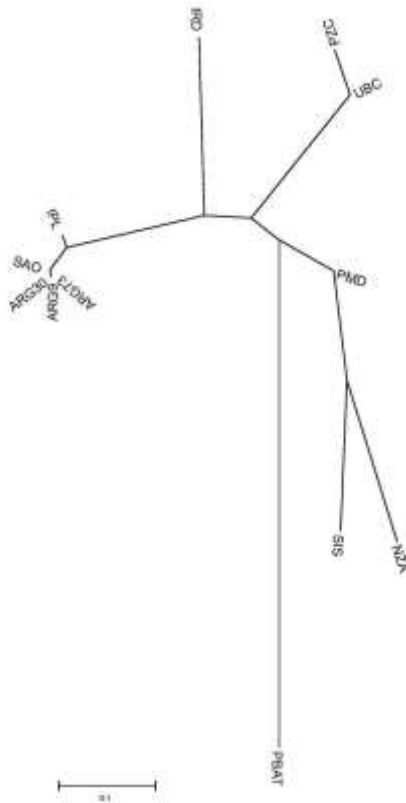
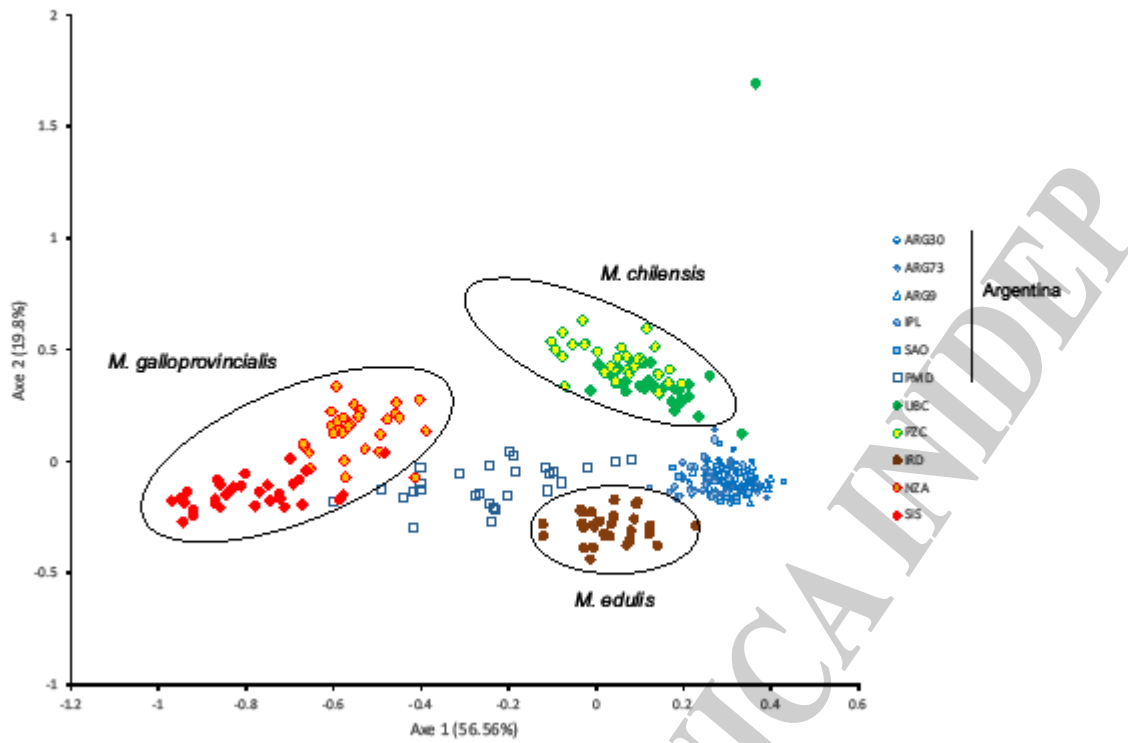
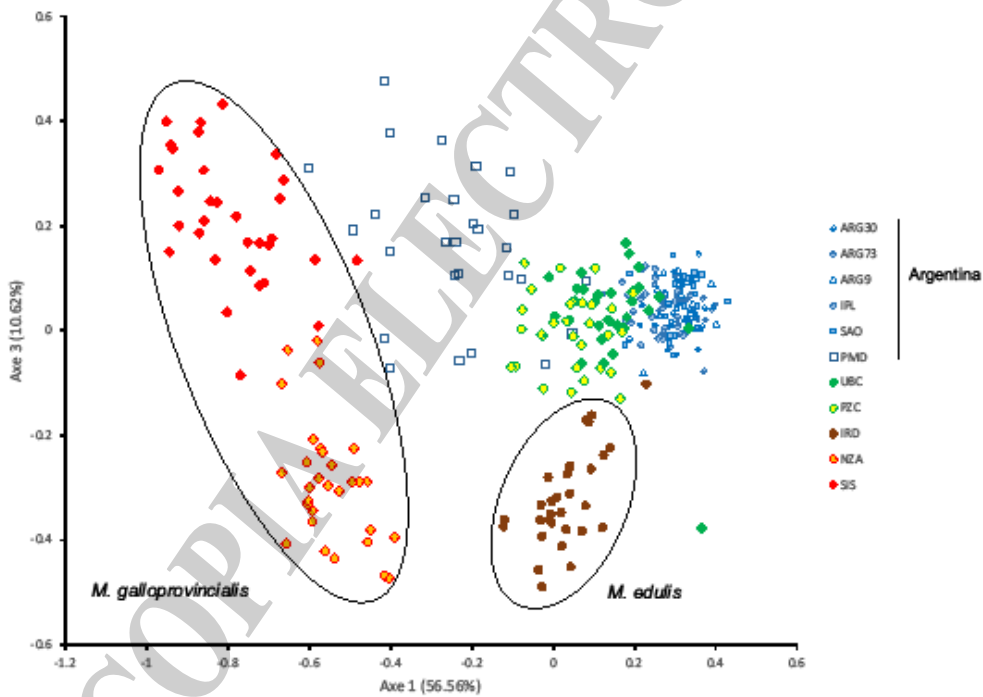


Figura 5. Árbol de *Neighbour-joining* de las muestras de *Mytilus* spp. de Argentina y muestras control de *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* y *M. chilensis* de America, Europa y Nueva Zelandia basado en la matriz de valores  $F_{ST}$ . Las muestras abreviadas como en la Tabla 1.

La estructuración revelada mediante el análisis de correspondencia se muestra en la Figura 6 (a y b). Los dos primeros ejes revelaron el 76,4% de la variación total donde el primer eje mostró la separación entre *M. edulis* y *M. galloprovincialis*, mientras que el segundo y tercer eje (10,62% de la variación) mostró la separación de los mejillones americanos, donde se observó las muestras argentinas más cercanas a *M. edulis*, y con una posición intermedia hacia *M. galloprovincialis* las provenientes de Puerto Madryn. La muestra de Ushuaia se distribuyó formando un grupo con *M. chilensis* (Figura 6 a) o con las restantes muestras argentinas pero con mayor dispersión (Figura 6 b). Los tres ejes revelaron 87,02% de la variación total.



a)



b)

Figura 6. Los dos ejes principales del análisis de correspondencia (CA) resultantes de los datos de SNPs de las muestras argentinas y muestras de referencia de *M. edulis* y *M. galloprovincialis* de America, Europa y Nueva Zelandia. Cada punto es un individuo. A) ejes 1 y 2, b) ejes 1 y 3.

El análisis de asignación individual, realizado con los datos de SNPs incluyendo todas las muestras, mostró un valor de  $K = 5$ , indicando una estructura genética potencial de probablemente cinco poblaciones (Figura 7). Tres de las poblaciones corresponden a *M. edulis* (IRD), *M. galloprovincialis* (SIS y NZA) y *M. trossulus* (PBAT). La cuarta corresponde a la mayoría de las muestras argentinas, donde se pudo observar que la muestra de Puerto Madryn (PMD) mostró una mezcla de alelos de *M. edulis* y *M. galloprovincialis*. Un quinto agrupamiento corresponde a las muestras de Chile (PZC) y Ushuaia (UBC).

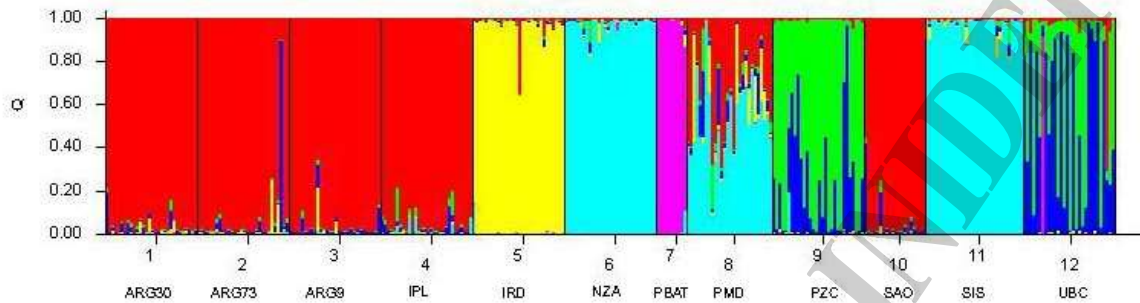


Figura 7. Estructura de 12 muestras de *Mytilus* estudiadas ( $K=5$ ). Cada individuo está representado por una línea vertical descompuesta en seis segmentos de color, con longitud proporcional a cada agrupamiento  $K$  inferido. El nombre de las muestras abreviadas como en la Tabla 1. Las líneas verticales negras muestran la separación de las muestras.

Ambos análisis mostraron estructura poblacional y una clara separación entre los tres taxones de *Mytilus*. Cinco de las siete muestras argentinas conforman un grupo cercano a *M. edulis*, aunque diferenciadas de este taxón. Las muestras de Puerto Madryn (PMD) y Ushuaia (UBC) mostraron altos niveles de mezcla, ya sea con *M. galloprovincialis* en la muestra de Puerto Madryn o *M. chilensis* en la muestra de Ushuaia.

Una vez obtenidos los datos de las muestras enviadas a Polonia en abril del presente año, seguramente se clarificarán las relaciones entre las distintas muestras con mayor exactitud.

## Conclusiones

- Los 55 SNPs identificados en genes de la familia de las histonas, hsp 70 y p 53 y en ESTs (*expressed sequence tags*) funcionaron como marcadores moleculares en mejillones del género *Mytilus*.
- Los datos obtenidos de los SNPs discriminaron entre *M. edulis*, *M. trossulus* y *M. galloprovincialis* y además mostraron la cercanía y leve diferencia de las muestras argentinas con *M. edulis*, lo que justificaría su rango taxonómico como *M. edulis platensis*.
- Los análisis de diferenciación, correspondencia y estructura mostraron diversidad entre y dentro de las muestras estudiadas, lo que convierte a los SNPs en marcadores útiles para estudios poblacionales.
- Estos marcadores moleculares implican un gran avance ya que permitirá el control de importaciones, etiquetado y trazabilidad de los mejillones aumentando el valor de los productos finales.

## Agradecimientos

Colaboraron en los muestreos Constanza Hozbor, Ronaldo Díaz, Ricardo Lopec, Pablo Izzo, Juan Pablo Simonazzi, Cristian Nivollet, Manuel García Penoni, Martín Díaz, Juan Pablo García y Stéphane Sorroche.



## BIBLIOGRAFÍA

- ALLENDORF, F.W. & SEEB, L.W. 2000. Concordance of genetic divergence among sockeye salmon populations at allozyme, nuclear DNA, and mitochondrial DNA markers. *Evolution* 54, 640–651.
- ARIAS, A., FREIRE, R., BOUDRY, P., HEURTEBISE, S., MÉNDEZ, J. & INSUA, A. 2009. Single nucleotide polymorphism for population studies in the scallops *Aequipecten opercularis* and *Mimachlamys varia*. *Conserv. Genet.*, 10: 1491–1495.
- BIERNE, N., DAGUIN, C., BONHOMME, F., DAVID, P. & BORSA, P., 2003. Direct selection on allozymes is not required to explain heterogeneity among marker loci across a *Mytilus* hybrid zone. *Mol. Ecol.*, 12: 2505–2510.
- BORSA, P., ROLLAND, V. & DAGUIN-THIÉBAUT, C. 2012. Genetics and taxonomy of Chilean smooth-shelled mussels, *Mytilus* spp. (Bivalvia: Mytilidae). *C. R. Biol.* 335: 51–61
- BRUMFIELD, R.T., BEERLI, P., NICKERSON, D. A. & EDWARDS, S. V. 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *TREE*, 18 (5): 249–256.
- BULNHEIM, H.P. & GOSLING, E. 1988. Population genetic structure of mussels from the Baltic Sea. *Helgoländer Meeresun.*, 42: 113–129.
- CARCAMO, C., COMESAÑA, A.S., WINKLER, F.M. & SANJUAN, A. 2005. Allozyme identification of mussels (bivalvia: mytilus) on the Pacific coast of South America. *J. Shellfish Res.*, 24 (4):1101-1115.
- COFI: FT-IX-2004/5.Traceability and labelling in fish.. Agenda ítem 7. Bremen, Alemania. 10-14 febrero
- DAGUIN, C., BONHOMME, F. & BORSA, P. 2001. The zone of sympatry and hybridization of *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*, as described by intron length polymorphism at locus *mac-1*. *Heredity*, 86, 342–354.
- ESPIÑEIRA, M., GONZÁLEZ-LAVÍN, N., VIEITES, J. M., & SANTA CLARA, F. J. 2009. Development of a method for the genetic identification of commercial bivalve species based on mitochondrial 18S rRNA sequences. *J. Agr. Food Chem.*, 57 (2): 495-502.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, 10: 564–567
- FALUSH, D., STEPHENS, M. & PRITCHARD, J. K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes*, 7: 574–578
- FAO/OMS, 2011. Comisión del *Codex Alimentarius*: Manual de Procedimientos (Vigésima edición). FAO, Roma. Pag.26
- GABRIEL, S., ZIAUGRA, L. & TABBAA, D. 2009. SNP genotyping using the Sequenom MassARRAY iPLEX platform. *Curr. Prot. Hum. Gen.* 60:2.12.11–12.12.18
- GALLARDO-ESCÁRATE, C., VALENZUELA-MUÑOZ, V., NÚÑEZ-ACUÑA, G., & HAYE, P., 2013. SNP discovery and gene annotation in the surf clam *Mesodesma donacium*. *Aquac. Res.*: 1-13.
- GARDNER, J. P. & WESTFALL, K. M. 2012. Geographic distribution and molecular identification of a metapopulation of blue mussels (genus *Mytilus*) in northeastern New Zealand. *J. Mollus. Stud.*, 78 (1): 66-73.
- GELLER, J.B., CARLTON, J.T. & POWER, D.A. 1994. PCR-based detection of mtDNA haplotypes of native and invading mussels on the northeastern Pacific coast: latitudinal pattern of invasion. *Mar. Biol.*, 119: 243–249.
- GOSLING, E.M. 1992. Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. En: *The mussel Mytilus: ecology, physiology, genetics and culture*. Vol. 25: *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* (Gosling, E.M., ed.), Elsevier, London: 1–20.
- GRANT, S. & CHERRY, I. 1985. *Mytilus galloprovincialis* Lmk. In *Southern Africa*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 90: 179–191.
- ICES, 2007. Report of the Working Group on the Application of Genetics in Fisheries and Mariculture (WGAGFM). ICES CM 2007/MCC:03, Ispra, Italy.



- INOUE, K., WAITE, J., MATSOUKA, M., ODO, S. & HARAYAMA, S. 1995. Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and *M. trossulus*. *Biol. Bull.*, 189: 370–375.
- KIJEWSKI, T., ŚMIETANKA, B., ZBAWICKA, M., GOSLING, E., HUMMEL, H. & WENNE, R. 2011. Distribution of *Mytilus* taxa in European coastal areas as inferred from molecular markers. *J. Sea Res.*, 65: 224-234
- KOEHN, R.K. 1991. The genetics and taxonomy of species in the genus *Mytilus*. *Aquaculture*, 94: 125–145.
- KWOK, P-Y. 2001. Methods for genotyping Single Nucleotide Polymorphisms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2: 235–258
- LANDI, V. & VALIENTE, J. Q. (2011). Los avances de las nuevas tecnologías genéticas y su aplicación en la selección animal. *AICA*, 1: 33-43.
- LARRAÍN, M. A., DÍAZ, N. F., LAMAS, C., VARGAS, C., & ARANEDA, C. 2012. Genetic composition of *Mytilus* species in mussel populations from southern Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 40 (4): 1077-1084.
- LEE, S. & MORTON, B. 1985. The introduction of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* into Hong Kong. *Malacol. Rev.*, 18: 107–109.
- MCDONALD, J.H. & KOEHN, R.K. 1988. The mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the Pacific coast of North America. *Mar. Biol.*, 99: 111–118
- MCDONALD, J., SEED, R. & KOEHN, R. 1991. Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the Northern and Southern Hemispheres. *Mar. Biol.*, 111: 323–333.
- MONTES, I., CONKLIN, D., ALBAINA, A., CREER, S., CARVALHO, G. R., SANTOS, M., & ESTONBA, A. 2013. SNP discovery in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*, L) by high-throughput transcriptome and genome sequencing. *PLoS one*, 8 (8), e70051.
- MORIN, P.A., LUIKART, G., & WAYNE, R. K. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *TREE*, 19 (4): 208-216.
- NÚÑEZ-ACUÑA, G. & GALLARDO-ESCÁRATE, C. 2013. Identification of immune-related SNPs in the transcriptome of *Mytilus chilensis* through high-throughput sequencing. *Fish Shellfish immun.*, 35 (6): 1899-1905.
- PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M. & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- PROCHILE. 2012. Estudio de Mercado de Mejillones Congelados para el Mercado de Polonia. Documento Oficina Comercial. Varsovia. 20 pp.
- RAGOISSIS, J. 2006. Genotyping technologies for all. *Drug Discoveries Today: Technologies*, 3 (2): 115-122.
- RAWSON, P., AGRAWAL, V. & HILBISH, T.J. 1999. Hybridization between the blue mussels *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* along the Pacific coast of North America: evidence for limited introgression. *Mar. Biol.*, 134: 201–211.
- RIGINOS, C., SUKHDEO, K. & CUNNINGHAM, C.W. 2002. Evidence for selection at multiple allozyme loci across a mussel hybrid zone. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 347–351
- SANTA CLARA, F.J., ESPÍNEIRA, M., CABADO, A.G., ALDASORO, A., GONZALEZ-LAVIN, N. & VIEITES, J.M. 2006. Development of a method for the genetic identification of species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *J. Agr. Food Chem.*, 54: 8461–8470.
- SEEB, J.E., CARVALHO, G., HAUSER, L., NAISH, K., ROBERTS, S. & SEEB, L.W. 2011. Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. *Mol. Ecol. Res.*, 11(Suppl. 1): 1–8.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M. & KUMAR, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.*, 24:1596–1599
- TORO, J.E., OJEDA, J. A. & VERGARA, A.M. 2004. The genetic structure of *Mytilus chilensis* (Hupé 1854) populations along the Chilean coast based on RAPDs analysis. *Aquac. Res.*, 35: 1466-1471
- TRUCCO, M.I. 2001. Diferenciación genética con polimorfismos alozímicos en *Mytilus* spp. del Atlántico Sudoccidental. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. Universidad de Vigo, España, 215 pp.



- VÄINÖLÄ, R. & HVILSOM, M.M. 1991. Genetic divergence and a hybrid zone between Baltic and North Sea *Mytilus* populations. *Biol. J. Linn. Soc.*, 43: 127–148.
- ZBAWICKA, M., DRYWA, A., SMIETANKA, B. & WENNE, R. 2012. Identification and validation of novel SNP markers in European populations of marine *Mytilus* mussels. *Mar Biol*, 159: 1347–1362.
- ZBAWICKA, M., SANKO, T., STRAND, J. & WENNE, R. 2014. New SNP markers reveal largely concordant clinal variation across the hybrid zone between *Mytilus* spp. in the Baltic Sea. *Aquat. Biol.*, 21: 25–36.

COPIA ELECTRÓNICA INIDEP