

Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura

Marcela P. Astorga

Instituto de Acuicultura, Universidad Austral de Chile

CIEN Austral

Puerto Montt, Chile

E-mail: marcelaastorga@uach.cl

Astorga, M.P. 2008. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. En A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. *FAO Actas de Pesca y Acuicultura*. No. 12. Roma, FAO. pp. 277–287.

RESUMEN

Los marcadores moleculares corresponden a una amplia gama de herramientas para análisis directo e indirecto del ácido desoxirribonucleico (ADN), las cuales han sido desarrolladas en las últimas décadas, generando un desarrollo de la genómica estructural. Dentro de las diversas herramientas moleculares podemos destacar, RFLP (Restriction fragment length polymorphic), RAPD (Random amplified polymorphic DNA), AFLP (Amplified fragment length polymorphism), Microsatélites, Secuenciación, SNP (Single nucleotide polymorphism) y EST (Expressed sequence tags). La aplicación de estas herramientas ha llegado a ser muy amplia y la adecuada elección de alguno de estos métodos moleculares esta dada por el tipo de problemática a resolver. Los marcadores moleculares han sido utilizados en la gran mayoría de las áreas biológicas como ecología, evolución, sistemática y acuicultura. En este último ámbito, los marcadores moleculares han permitido llegar a resolver problemáticas como: caracterizar la variabilidad genética de un grupo, identificar especies y cepas, asignar paternidad o parentesco, apoyar la trazabilidad, identificar loci asociados a caracteres cuantitativos y realizar selección asistida por marcadores, entre las principales. En la presente revisión se muestran las líneas desarrolladas en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura de América Latina, mediante la utilización de marcadores moleculares y las problemáticas resultas en estas especies. Se plantean las áreas menos desarrolladas y que requieren de una mayor inversión en investigación para lograr alcanzar los niveles de otras especies o grupos. Por último, se plantean las proyecciones del desarrollo de la genómica y la necesidad de generar redes de interacción latinoamericanas para la formación de equipos de trabajo multidisciplinarios en la resolución de problemáticas esenciales para el desarrollo de la acuicultura en América Latina.

ABSTRACT

Molecular markers correspond to a wide range of tools, which have been developed over the last few decades, for direct and indirect analysis of the deoxyribonucleic acid (DNA),

in order to bring about the development of structural genomics. The Restriction fragment length polymorphic (RFLP), Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Amplified fragment length polymorphism (AFLP), Microsatellites, Sequencing, Single nucleotide polymorphism (SNP) and Expressed sequence tags (EST) are among these tools. The application of DNA marker technologies and the choice of some of these molecular methods are determined by the type of research conducted. The molecular markers have been used in areas such as ecology, evolution, systematic and also in aquaculture. In the latter area, the molecular markers have allowed resolving problems such as analyses of genetic variability, species identification, parental assignments or kinship, traceability, quantitative traits loci identification for marker assisted selection, and so on. This review summarizes the main lines developed for commercially important bivalve species in Latin America by means of molecular markers and the problems that resulted. Finally, a projection of the structural genomic development is outlined. The increasing need to generate Latin American networks of multidisciplinary teams is an important component for the future development of aquaculture in Latin America.

INTRODUCCIÓN

La genómica en forma general ha sido definida como el estudio de los genes y su función, la cual tiene por objetivo entender la estructura del genoma, el mapeo de genes y la secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN). La genómica examina los mecanismos moleculares y la interacción de la genética y los factores ambientales (McKusick y Ruddle, 1987). Esta gran línea de investigación ha sido dividida en genómica estructural y genómica funcional. En esta revisión nos enfocaremos principalmente a la primera de estas. La genómica estructural corresponde al conocimiento de las características estructurales de los cromosomas, genes y ADN. Para llegar a lograr el gran avance de la genómica, ha sido necesario el desarrollo de una amplia variedad de técnicas moleculares las que han sido utilizadas como herramientas de información. Estas técnicas moleculares son las que han permitido un desarrollo exponencial en el conocimiento de las bases genéticas de diversas respuestas y procesos presentes en los organismos. La aplicación de estas técnicas ha impactado diversos ámbitos de la biología incluyendo la biología marina y la acuicultura, lo cual ha sido revisado por diferentes autores (Liu y Cordes, 2004; Wilson *et al.*, 2005; Saavedra y Bachere, 2006; Dupont *et al.*, 2007). La siguiente revisión intenta dar a conocer en forma ordenada las herramientas utilizadas para la obtención de marcadores moleculares y su aplicación en acuicultura, para lo cual se hará un análisis general de cada tipo de marcador de ADN indicando sus principios genéticos, sus ventajas y desventajas. Posteriormente se presentarán los diferentes ámbitos de aplicación de estos marcadores moleculares y su impacto en la acuicultura. Por último, se hará una revisión del estado actual y las proyecciones futuras de la utilización de estos marcadores en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura con un fuerte énfasis en la acuicultura de América Latina.

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares corresponden a un conjunto de técnicas que permiten visualizar o indicar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de mutación establecida en las poblaciones a través del tiempo evolutivo. Esta variación genética detectada es conocida como polimorfismo y es lo que nos permite separar grupos, poblaciones, cepas, especies o grupos taxonómicos mayores. El objetivo de la obtención de marcadores moleculares es establecer variantes polimórficas que nos permitan discriminar entre grupos de estudio al nivel que este sea necesario. Estas medidas nos permiten obtener una marca que diferencia un grupo de otro.

Tipos de marcadores moleculares

- **RFLP (*Restriction fragment length polymorphic*)**: Este método consiste en la obtención de fragmentos de ADN, debido al uso de endonucleasas capaces de reconocer sitios de unión altamente específicos. Las endonucleasas de restricción son enzimas que cortan el ADN en secuencias específicas presentes en el organismo, generando fragmentos. Estos fragmentos pueden variar en tamaño y número entre los grupos analizados. Estos fragmentos son analizados mediante southern blot, en el cual el ADN digerido, es separado mediante electroforesis, transferido a una membrana y visualizado mediante sondas específicas.
- **PCR-RFLP**: Este método corresponde a una variante de obtención más rápida que la mencionada anteriormente. Debido al aumento en el conocimiento del genoma de diversos organismos, junto con el diseño de diversos partidores universales, actualmente es posible obtener miles de copias del fragmento de ADN, mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Por lo cual en este proceso se realiza la digestión en forma posterior a la obtención de las copias por PCR del fragmento de interés, los fragmentos son visualizados mediante electroforesis simple en gel de agarosa. Este marcador entrega información codominante.
- **RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*)**: Este método fue desarrollado en los 90' y consiste en la amplificación al azar de secuencias cortas de nucleótidos, mediante la utilización de un par de pequeños partidores de 8 a 10 bp que reconocen sitios anónimos en el genoma total, los que son amplificados por PCR. Mediante este método es posible obtener una alta cantidad de fragmentos que son visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Este tipo de marcadores amplifica regiones anónimas por lo cual se define como un marcador dominante a diferencia de los marcadores antes descritos y se considera que cada fragmento corresponde a un locus bi-alélico, que es leído como presencia o ausencia de un producto amplificado. Debido a su rapidez puede ser utilizado para análisis poblacional en un alto número de individuos, pero con la certeza de la mantención de las condiciones de amplificación para evitar cambios en los patrones de amplificación.
- **AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*)**: Este método consiste en la utilización de enzimas de restricción junto a amplificación por PCR. En esta técnica se utilizan adaptadores de secuencias conocidas, que se unen a fragmentos de ADN generados por digestión del ADN genómico total. Los adaptadores se unen a los extremos de fragmentos de ADN de secuencias conocidas y son usados como sitios de unión de los partidores para amplificación por PCR, los fragmentos obtenidos son visualizados mediante electroforesis. Estos resultados son analizados mediante presencia-ausencia de un locus dado, por lo cual corresponden a un marcador dominante. Este método se ha llegado a usar en forma más amplia debido al alto polimorfismo capaz de detectar y al bajo costo de su aplicación en relación a la información obtenida. Su desventaja esta dada en la dificultad de la lectura manual o el requerimiento de equipo automatizado para su rápida lectura.
- **Microsatélites SSR (*Simple sequence repeats*)**: Estos consisten en unidades de 2 a 5 nucleótidos los cuales se encuentran repetidos en tándem. Las regiones adyacentes a estas zonas generalmente son conservadas, por lo cual es posible diseñar partidores que permitan obtener miles de copias de estas zonas mediante amplificación por PCR. Los resultados de este análisis pueden ser visualizados mediante gel de agarosa de alta resolución o mediante lectura automatizada en un secuenciador de ADN. El polimorfismo de los microsatélites es basado en la variación en el número de repeticiones en tándem de los alelos de un locus. Estos han llegado a ser muy utilizados por su alta abundancia en el genoma, la alta variabilidad debido a su elevado número de alelos por locus y por su forma de herencia codominante, lo que permite aplicar una variedad de análisis estadísticos poblacionales.

- **Secuenciación:** Consiste en la lectura de las bases nucleotídicas presentes en un gen o fragmento de ADN. Este método requiere de amplificación por PCR de múltiples copias del fragmento de ADN objetivo para la realización de una lectura automatizada mediante un secuenciador de ADN. La gran ventaja de este método es que alcanza la mayor resolución posible en la obtención de la información genética y su desventaja se relaciona con los costos y los requerimientos de equipos automatizados.
 - **ADN nuclear:** Es posible realizar secuenciación de genes nucleares de copia única, como las repeticiones del ADN ribosomal, el cual ha sido ampliamente utilizado por presentar múltiples copias en el genoma, alta variabilidad y por poseer regiones adyacentes conservadas que ha permitido definir partidores.
 - **ADN mitocondrial:** Este ADN posee una tasa mutacional mayor que el ADN nuclear, lo cual lo hace presentar una mayor resolución para resolver relaciones entre grupos más cercanos y además existen en múltiples copias en el citoplasma, las cuales son idénticas entre si por su ausencia de recombinación y herencia uniparental (solo herencia maternal). El genoma mitocondrial en su mayoría posee genes codificantes, sin embargo presenta un fragmento donde se inicia la replicación y transcripción, el cual presenta una alta tasa de mutación principalmente por ser no codificante, este corresponde a la región control o *D-loop*, para el cual se han diseñado partidores universales o específicos en un diverso número de taxa.
- **SNP (*Single nucleotide polymorphism*):** este marcador corresponde a la detección de un cambio en una sola base nucleotídica por otra base alternativa en una posición en la secuencia de ADN. Dicha posición de la base nucleotídica con secuencias alternativas en el ADN genómico corresponde a un SNP (Vignal *et al.*, 2002). Este marcador ha mostrado ser mayoritariamente bi-alelico, determinado por la baja tasa de mutación de las sustituciones únicas que originan los SNP. Las ventajas de este marcador son su herencia codominante y su gran abundancia en el genoma. Sus desventajas se encuentran asociadas a los métodos de genotipificación, los cuales incluyen equipamiento de alto costo como microchips, espectrometría de masa, PCR cuantitativa o secuenciación.
- **EST (*Expressed sequence tags*):** Secuencias de genes expresados que son generadas desde secuenciación al azar de clones de ADN complementario (Adams *et al.*, 1991). Este método permite identificar genes y analizar su expresión por medio de perfiles de expresión de genes a partir de algún tejido específico. Este tipo de marcador permite el desarrollo de microarreglos de ADN complementario que se utiliza para el análisis de genes expresados diferencialmente. Los microarreglos se basan en la unión de bases complementarias que permiten identificar los genes activos del tejido de un organismo en base a su unión dentro de la placa que contienen todos los genes conocidos de una especie. De esta forma es posible detectar mediante el «encendido/apagado» de cada gen la transcripción dentro de las células del tejido específico.

El resumen de las características de los diferentes tipos de marcadores moleculares se observa en la Cuadro 1.

CUADRO 1

Características de los diferentes tipos de marcadores moleculares

Tipo	Variabilidad	Herencia	Genoma	Reproducibilidad	Costo
RFLP	Media	Codominante	Completo	Alta	Medio
PCR-RFLP	Media	Codominante	Parcial	Alta	Medio
RAPD	Alta	Dominante	Completo	Baja	Bajo
AFLP	Alta	Dominante	Completo	Media	Medio
Microsatélites	Alta	Codominante	Parcial	Alta	Medio
Secuenciación	Media	Codominante	Parcial	Alta	Alto
SNP	Alta	Codominante	Parcial	Alta	Alto
EST	Media	Codominante/Dominante	Parcial	Alta	Alto

Aplicación de los marcadores moleculares

Actualmente es posible utilizar los marcadores de ADN en todas las áreas de las ciencias biológicas, debido a que han llegado a transformarse en una poderosa herramienta, encontrando su utilización en áreas como: taxonomía y sistemática, ecología, biología evolutiva y acuicultura entre otras (ver revisiones en Parker *et al.*, 1998; Feral, 2002; Vignal *et al.*, 2002; Zhang y Hewitt, 2003; Liu y Cordes, 2004). Sin embargo, se hace más relevante entender la aplicación de los marcadores moleculares en base a las problemáticas que permite resolver, lo cual será desarrollado a continuación.

Problemáticas a resolver en acuicultura

- a) Medición de la variabilidad genética. En acuicultura es de gran utilidad conocer la variabilidad genética de las poblaciones y de los grupos de reproductores. Muchos grupos de reproductores son líneas resultantes de procesos de mejoramiento genético, lo cual puede llevar a la disminución de la variabilidad genética a niveles críticos, por lo cual es necesario realizar monitoreos de la diversidad genética y poder establecer relaciones con aquellos grupos no sometidos a selección, con el fin de poder diseñar nuevos cruzamientos para re-establecer los niveles de variabilidad genética. Por otro lado, el conocer la variabilidad genética nos entrega estimadores para la caracterización de las cepas, los grupos o las poblaciones que nos permita discriminar entre ellos, identificar las poblaciones fuentes, estimar divergencias poblacionales e identificar el flujo génico entre bancos naturales o semilleros. Para lograr estimar adecuados niveles de variabilidad se requiere de marcadores de alta resolución y que muestren un nivel de variabilidad suficiente para diferenciar grupos. Para este tipo de problemáticas se han utilizado RFLP, RAPD y secuenciación de regiones altamente variables, sin embargo, los tipos de marcadores más adecuados debido al alto nivel de variabilidad detectada corresponden a los AFLP y microsatélites.
- b) Asignación de paternidad, parentesco o procedencia. En la obtención de grupos de semillas, es requerido conocer su procedencia o la identificación de sus parentales, esto con el fin de asegurar la calidad de las semillas obtenidas. Actualmente esto es posible de obtener mediante la construcción de pedigrí y el establecimiento de las relaciones de parentesco entre grupos de semillas y grupos de reproductores. Para este tipo de análisis la utilización de microsatélites llega a ser uno de los marcadores mas apropiado, debido a la alta variabilidad registrada, lo cual permite marcar diferencias entre grupos muy cercanos. Debido a su herencia codominante también permite identificar y deducir los genotipos observados y esperados. La asignación de parentesco molecular también ha sido de utilidad en los planes de mejoramiento genético clásico, debido a que permite identificar el nivel de parentesco entre los individuos que serán seleccionados como reproductores y de esta forma se evita el aumento en los valores de endogamia, también permite realizar la confirmación de los cruzamientos realizados.
- c) Identificación de especies y cepas (barcoding): La identificación de una cepa o especie es algo fundamental en el inicio de cualquier investigación. Esta consiste en la identificación de una especie, cepa o híbrido, ya sea para reconocer la posible presencia de más de una especie dentro de un grupo, la identificación de una cepa para reproducción, o la identificación de cepas puras o híbridas dentro de mezcla de grupos. Se ha llegado a proponer, en el ámbito marino, la búsqueda de un marcador universal que sea aplicable a una amplia gama de organismos, mediante el uso de partidores universales, para esto se ha propuesto la utilización de la secuenciación del gen mitocondrial Citocromo oxidasa I (COI) (Dupont *et al.*, 2007), el cual permitiría identificar a nivel de especie una gran diversidad de organismos marinos. La identificación de especies y/o cepas también pueden ser resueltas rápidamente utilizando RAPD y AFLP, debido que al ser marcadores

dominantes los grupos híbridos presentaran un perfil de bandas que combine las bandas únicas desde los grupos puros. Para la identificación de cepas, se requiere la utilización de marcadores de mayor resolución debido a la alta similitud que pueden presentar, por lo cual en este caso es posible utilizar microsatélites o AFLP. Dentro de esta aplicación se ha desarrollado una línea de gran utilidad que es la identificación de especies desde los diferentes estados de vida, destacando la gran utilidad que puede tener para la identificación de huevos y larvas.

- d) Trazabilidad. Esta permite hacer un seguimiento de un producto desde sus parentales, su línea familiar, las semillas y finalmente el producto cosechado. La trazabilidad implica el seguimiento para la mantención de la seguridad alimentaria, por lo cual implica una diversidad de medidas que van mas allá del enfoque de esta revisión (ver revisión de Hastein *et al.*, 2001). Sin embargo, para algunos tipos de seguimientos en las líneas de producción de especies acuícolas, se han propuesto metodologías moleculares como herramientas rápidas y altamente seguras. Para este tipo de análisis es posible utilizar diversos métodos, sin embargo algunos son de alto costo o requieren de mayor tiempo (e.g. secuenciación), lo que ya no los hace eficientes para el rápido análisis en el proceso de la trazabilidad, por lo que la utilización de microsatélites o AFLP llegan a ser más apropiados para este tipo de problemática.
- e) Identificación de loci de caracteres cuantitativos (QTL: *quantitative traits loci*). En acuicultura y en los programas de mejoramiento genético clásico es de alta relevancia el mejoramiento de caracteres cuantitativos (i.e. tasa de crecimiento, resistencia enfermedades, etc.). Estos caracteres se encuentran regulados por múltiples loci, por lo cual el uso de genes individuales es de menor utilidad. Debido a esto, para conocer la variación de los caracteres cuantitativos se requiere de la búsqueda de marcadores moleculares asociados a la variación de dicho carácter cuantitativo (QTL) y de esta forma se genera la base para la implementación de planes de manejo. Los QTL son genes no identificados que afectan al carácter cuantitativo que esta siendo mejorado. La posición cromosomal de un QTL en el genoma de una especie puede ser identificada mediante un mapa de ligamiento genético. Estos mapas de ligamiento genético se construyen en base a la segregación, desde parentales a la descendencia, de los marcadores polimórficos, dependiendo de la forma de segregación es posible reconstruir su distribución en el cromosoma. Una vez construido el mapa de ligamiento es posible aplicarlo para la búsqueda de asociación de QTL con marcadores moleculares.
- f) Selección asistida por marcadores moleculares (MAS: *Marker assisted selection*). La selección asistida por marcadores consiste en el proceso en el cual los reproductores de un programa de mejoramiento genético clásico son elegidos en base a sus genotipos usando marcadores moleculares. Para implementar la selección asistida por marcadores se requiere de la obtención de un mapa de ligamiento genético de alta resolución y conocer el número de QTL que afectan a un rasgo de producción determinado. Se espera que con el tiempo puedan llegar a identificarse genes asociados a los caracteres cuantitativos mas que marcadores, para de esta forma llegar a aplicar programas de mejoramiento asistido por genes (GAS: *Gene assisted selection*).
- g) Expresión génica. La utilización de los EST permite la construcción de microarreglos de ADN, para de esta forma llegar a entender el funcionamiento de los genes mediante la expresión diferencial de estos frente a una diversidad de variables asociadas al individuo en estudio, como pueden ser: diferentes condiciones ambientales, diferencias del desarrollo, diferentes órganos o tejidos, variaciones espaciales, etc. La utilización de la expresión diferencial mediante el uso de microarreglos es posible de aplicar en una amplia gama de interrogantes,

ya sea conocer la expresión en individuos sometidos a estrés por contaminantes (biomonitoreo), en individuos con diversas patologías, en respuesta a la diversidad ambiental, etc.

Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos cultivados en América Latina

Al realizar la búsqueda del conocimiento de la genómica estructural en moluscos bivalvos, es posible detectar la baja cantidad de información en relación a otros grupos de especies de cultivo. Mediante una búsqueda en la base de datos del Centro Nacional para la información biotecnológica (NCBI: *Nacional Center for Biotechnology Information*) GenBank, fue posible encontrar para el phylum Mollusca, 580 192 secuencias nucleotídicas de genes totales, genes parciales o fragmentos de ADN de diferentes individuos de diversas especies, dentro de moluscos bivalvos se encontraron 74 795 secuencias nucleotídicas, lo cual es muy bajo comparado con los más de 5 millones de registros de información encontrada para teleósteos o los más de 700 000 registros solo en salmónidos. En moluscos bivalvos fue posible encontrar 12 secuencias de genomas mitocondriales completos con la identificación de entre 12 y 13 genes totales para las especies *Crassostrea gigas*, *Hiatella arcaica*, *Mytilus trossulus*, *Lampsilis ornata*, *Crassostrea virginica*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Venerupis (Ruditapes) philippinarum*, *Argopecten irradians*, *Placopecten magellanicus*, *Acanthocardia tuberculata* y *Mizuhopecten yessoensis*.

Para conocer el estado actual del conocimiento y la aplicación de los marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura de América Latina, se revisó el estado de desarrollo de esta línea de investigación, clasificados en tres grandes grupos: Ostreidos (ostras), Pectínidos (ostiones y vieiras) y mitílidos (choritos y mejillones).

Ostreidos

Para el caso de ostras, en las especies *Crassostrea virginica* y *Crassostrea gigas* se encuentra el mayor desarrollo de la genómica estructural, ya sea para obtención de información básica como también para su aplicación a la acuicultura. En la ostra del este *C. virginica* encontramos el desarrollo de microsatélites para la construcción de mapas de ligamiento y monitoreo en los proyectos de restauración (Reece *et al.*, 2002). En esta misma especie se ha comparado individuos silvestres y de cultivo, mediante análisis de microsatélites, lo cual muestra una menor variabilidad genética en las cepas de cultivo en relación a las silvestres (Carlsson *et al.*, 2006). En la ostra del pacífico *C. gigas* se han desarrollado marcadores de AFLP (Li y Guo, 2004) y microsatélites (Hubert y Hedgecock, 2004) para la construcción de mapas de ligamiento. En ambas especies de ostras se ha realizado la secuenciación de su genoma mitocondrial completo (Milbury y Gaffney, 2005). Actualmente el único proyecto de secuenciación de un genoma nuclear completo esta siendo desarrollado para la ostra del pacífico *C. gigas* (Hedgecock *et al.*, 2005), siendo esta especie la que presenta el mayor desarrollo de la genética molecular y de marcadores moleculares, lo que ha permitido proyectar la secuenciación de su genoma completo. Se han utilizado marcadores EST en ostras *C. gigas* infectadas con bacterias, mediante construcción de genotecas desde las cuales se identificó 20 genes con posible función inmune (Gueguen *et al.*, 2003). En menor proporción, es posible encontrar trabajos desarrollados en otras especies de ostras, como *Crassostrea ariakensis* donde se han realizando estudios de determinación de variabilidad de poblaciones naturales, mediante microsatélites, para identificar poblaciones reducidas por sobreexplotación y sus diferencias con grupos obtenidos desde *hatcheries*, esto con el fin de definir cepas para ser utilizadas como fuente de introducción de variabilidad genética (Zhang *et al.*, 2005). En la ostra perlifera *Pteria sterna* se ha detectado reducción poblacional por evento fundador en un proceso de colonización de esta especie en Baja California (Arnaud-Haond *et al.*, 2005).

Pectínidos

Este corresponde al grupo menos estudiado, donde solo es posible encontrar algunos trabajos de información genética básica, donde destacan estudios en especies del género *Argopecten*, como *A. ventricosus* (*circularis*), donde se ha determinado la variabilidad genética de las poblaciones de baja California, estableciendo diferenciación poblacional entre localidades extremas (Maeda *et al.*, 1999), o diferencias poblacionales en respuesta al estrés (Cruz *et al.*, 1998), o estudios de sus relaciones evolutivas mediante análisis de filogenia (Saavedra y Peña, 2006). Este grupo se encuentra más desarrollado pero en especies distribuidas fuera de América Latina.

Mitílidos

Dentro de este grupo las especies más estudiadas corresponden a especies de amplia distribución como *Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis*. El mitílido *M. galloprovincialis* ha sido utilizado para el monitoreo ecotoxicológico mediante análisis genómico (Venier *et al.*, 2003), determinando secuencias EST desde diferentes tejidos de individuos sometidos a estrés, a partir de las cuales se identificaron series de genes para generar microarreglos de ADN para detección de respuesta al estrés (Dondero *et al.*, 2006). Se ha caracterizado en especies del género *Mytilus* la presencia de satélites y microsatélites (Presa *et al.*, 2002), además del uso de marcadores de AFLP (Lallias *et al.*, 2007). En este grupo se ha realizado trabajos para entender las relaciones evolutivas entre las especies (Distel, 2000), debido al alto grado de hibridación observado entre ellas (Riginos *et al.*, 2002) y los procesos de colonización de especies de un lugar a otro (Toro *et al.*, 2006). En este grupo de especies, se ha establecido mediante secuenciación de regiones mitocondriales la forma de herencia diferencial del genoma mitocondrial en relación a las otras especies de bivalvos, debido a que en este grupo se observa herencia biparental (i.e. ambos padres) y no solo herencia maternal (Hoeh *et al.*, 1996). Se ha determinado marcadores de RAPD para la discriminación e identificación de especies de mitílidos y su potencial uso para identificación larval (Toro, 1998). En *Mytilus chilensis* se ha realizado la estimación de variabilidad a lo largo de su distribución, identificando los procesos que restringen el flujo génico, donde también se ha identificado la presencia de otras especies en rangos no descritos anteriormente, como es el caso de la presencia de *M. galloprovincialis* en la costa chilena (Toro *et al.*, 2006). Se ha utilizado marcadores moleculares para la detección de introgresión en especies del género *Mytilus*, las cuales se han detectado como altamente formadoras de híbridos (Bierne *et al.*, 2003).

Necesidades y proyecciones futuras

El gran desarrollo de las herramientas moleculares ha permitido que la genética y la genómica sean cada vez más importantes para llegar a entender los procesos presentes en los organismos y por lo tanto se hace cada vez más relevante su utilización en acuicultura. La utilización de marcadores moleculares ha llegado a ser más amplia en diferentes áreas de investigación entre esas incluida la acuicultura, sin embargo, se considera que esta aún se encuentra en su fase exponencial y su utilización esta aún en desarrollo, sobre todo en América Latina.

Se espera a futuro una masificación en el uso de herramientas moleculares para responder un amplio ámbito de preguntas en el manejo y acuicultura de recursos acuícolas, debido a la rapidez de sus resultados, al alto porcentaje de certeza de sus análisis y a la amplia gama de información que entrega. En acuicultura se espera un mayor desarrollo en áreas como la construcción de mapas genéticos y búsqueda de QTL para posteriormente poder aplicarlos en la implementación de la selección asistida por marcadores (MAS) la cual puede llegar a tener un alto impacto en la acuicultura (Liu y Cordes, 2004). Otra línea que debería llegar a tener alto desarrollo y que aún se encuentra en proceso es el estudio de EST para la implementación de microarreglos, lo cual permite llegar a entender las causas de las diversas respuestas fenotípicas observadas en nuestros

organismos de estudio. Sin embargo, se considera relevante el desarrollo de estudios básicos que entreguen información sobre los niveles de variabilidad y las estructuras poblacionales de recursos en los cuales aun no se desarrolla este tipo de estudios. Esto último posee relevancia para el apoyo de estrategias de conservación de los bancos naturales, los cuales son la base para el posterior desarrollo de la acuicultura de muchos recursos, o para el adecuado manejo de áreas de extracción asignadas a pequeños grupos de pescadores. La obtención de la información de los genes, del genoma y su expresión, permitirá llegar a conocer la diversidad genética para entender los procesos biológicos desde sus niveles más pequeños hasta los sistemas más complejos.

Hasta la fecha solo algunas especies se encuentran sus genomas secuenciados y esto se reduce aun más cuando nos centramos en moluscos bivalvos. Se espera que a futuro, y con las herramientas ya existentes, este número debiera aumentar en forma gradual o exponencial, además se espera llegar a aumentar el conocimiento de genes y/o fragmentos nucleares que permitan ser utilizados para resolver problemáticas biológicas. La aproximación metagenómica (Dupont *et al.*, 2007) generará a futuro un mayor entendimiento de los sistemas complejos como las estructuras comunitarias o ensamblajes biológicos, lo cual es relevante para entender la interacción organismo-ambiente. Según como se ha presentado el desarrollo de las herramientas moleculares se espera a corto plazo un gran desarrollo de nuevas herramientas moleculares y nuevos métodos para el análisis molecular. Además para lograr estos análisis complejos se requiere de equipos de trabajo altamente coordinados, lo cual se basa en la capacidad humana del desarrollo del trabajo en equipo.

CONCLUSIONES

- Se determina el amplio tipo de problemáticas capaces de resolver la utilización de herramientas moleculares representadas por los diversos tipos de marcadores de ADN.
- Se establece un bajo desarrollo de la investigación realizada en especies de moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura de América Latina en las áreas de la genómica estructural y en las problemáticas capaces de resolver, desde los niveles básicos a aquellos más aplicados. Sin embargo, se observa un alto grado de desarrollo en algunas especies, las cuales corresponden a especies de amplia distribución que son importantes para la acuicultura a nivel mundial.
- Se establece un bajo desarrollo de la investigación realizada por científicos de América Latina en las áreas de genómica estructural y sus problemáticas asociadas.
- Se considera relevante la formación de redes multidisciplinarias enfocadas al desarrollo de la genómica en América Latina destinada a especies acuícolas. Esto generaría un impulso al desarrollo de esta línea molecular y permitiría un avance cuantitativo de la acuicultura desde una fase tradicional hacia una acuicultura de avanzada, mediante la generación de grupos de apoyo entre investigadores, empresas e instituciones del estado, para el desarrollo de una acuicultura de futuro sustentable.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnicj, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Cerril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., Kerlavage, A.R., McCobie, W.R. y Venter, J.C. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed tags and human genome Project. *Science*, 252: 1651–1656.
- Arnaud-Haond, S., Blanc, F., Bonhomme, F. y Monteforte, M. 2005. Recent foundation of Mexican populations of pearl oyster (*Pteria sterna*) revealed by lack of genetic variation on two mitochondrial genes. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 85: 363–366.

- Bierne, N., Borsa, P., Daguin, C., Jollivet, D., Viard, Bonhomme, F. y David, P. 2003. Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Molecular Ecology*, 12: 447–461.
- Caetano-Anolles, G. y Gresshoff, P.M. 1997. *DNA Markers: protocols, applications and overviews*. Wiley-Liss Inc. 364 pp.
- Carlsson, J., Morrison, C.L. y Reece, K.S. 2006. Wild and aquaculture populations of the eastern oyster compared using microsatellites. *Journal of Heredity*, 97(6): 595–598.
- Cruz, P., Ramirez, J.L., Garcia, G.A. e Ibarra, A.M. 1998. Genetic differences between two populagtions of catarina scallops (*Argopecten ventricosus*) for adaptations for growth and survival in a stressful environment. *Aquaculture*, 166(3): 321–335.
- Distel, D.L. 2000. Phylogenetic relationships among Mytilidae (Bivalvia): 18S rRNA data suggest convergence in Mytilid body plans. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 15(1): 25–33.
- Dondero, F., Placentini, L., Marsano, F., Rebelo, M., Vergani, L., Venier, P. y Viarengo, A. 2006. Gene transcription profiling in pollutant expomed mussels (*Mytilus* spp.) using a new low-density oligonucleotide microarray. *Gene*, 376: 24–36.
- Dupont, S., Wilson, K., Obst, M., Skold, H., Nakamo, H. y Thorndyke, M.C. 2007. Marine ecological genomics: when genomics meets marine ecology. *Marine Ecology Progress Series*, 332: 257–273.
- Feral, J.P. 2002. Review – How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity?. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 268: 121–145.
- Gueguen, Y., Cadoret, J.P., Flament, D., Barreau-Roumiguere, C., Girardot, A.L., Garnier, J., Hoareau, A., Bachere, E. y Escoubas, J.M. 2003. Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*. *Gene*, 303: 139–145.
- Hastein, T., Hill, B.J., Berthe, F. y Lightner, D.V. 2001. Traceability of aquatic animals. *Rev. Sci. Tech.*, 20: 564–583.
- Hedgecock, D., Gaffney, P.M., Gouletquer, P., Guo, X., Reece, K. y Warr, G.W. 2005. The case for sequencing the pacific oyster genome. *Journal of shellfish research*, 24(2): 429–441.
- Hoeh, W.R., Stewart, D.T., Sutherland, B.W. y Zouros, E. 1996. Multiple origins of gender-associated mitochondrial DNA lineages in bivalves (Mollusca: Bivalvia) *Evolution*, 50: 2276–2286.
- Hubert, S. y Hedgecock, D. 2004. Linkage maps of microsatellite DNA markers for the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Genetics*, 168(11): 351–362.
- Lallias, D., Lapegue, S., Hecquet, C., Boudry, P. y Beaumont, A.R. 2007. AFLP-based genetic linkage maps of the blue mussel (*Mytilus edulis*). *Animal Genetics*, 38(4): 340–349.
- Li, L. y Guo, X. 2004. AFLP-based genetic linkage maps of the pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg. *Marine Biotechnology*, 6: 26–36.
- Liu, Z.J. y Cordes, J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1–37.
- Maeda, A., Hernandez, N., Balart, E., Amador, E., Sierra, E. y Rojas, D. 1999. Variabilidad genética de las poblaciones naturales de almeja Catarina (*Argopecten ventricosus=circularis*). Informe Técnico.
- Martinez-Lage, A., Rodriguez-Fariña, F., Gonzales-Tizon, A. y Mendez, J. 2005. Origin and evolution of *Mytilus* mussel satellite DNAs. *Genome*, 48: 247–256.
- McDonald, J.H., Seed, R. y Koehn, R.K. 1991. Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the northern and southern hemispheres. *Marine Biology*, 111: 323–333.
- Mckusick, V. y Ruddle, F. 1987. A new discipline, a new name, a new Journal. *Genomics*, 1: 1–2.

- Milbury, C.A. y Gaffney, P.M. 2005. Complete mitochondrial DNA sequence of the eastern oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biotechnol.*, 7(6): 697–712.
- Miyamoto, H., Hamaguchi, M. y Okoshi, K. 2002. Analysis of genes expressed in the mantle of oyster *Crassostrea gigas*. *Fisheries Science*, 68: 651–658.
- Parker, P.G., Snow, A.A., Schug, M.D., Booton, G.C. y Fuerst, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79(2): 361–382.
- Presa, P., Perez, M. y Diz, A.P. 2002. Polymorphic microsatellite markers for blue mussels (*Mytilus* spp.) *Conservation Genetics*, 3(4): 441–443.
- Reece, K.S., Morrison, C.L. Ribeiro, W.L. Gaffney, P. y Allen, S. 2002. Microsatellite markers for the eastern oyster *Crassostrea virginica*: linkage mapping and genetic monitoring of restoration projects. PAG X Abstracts (<http://www.intl-pag.org>).
- Riginos, C., Kumar, S. y Cunningham, C.W. 2002. Evidence for selection at multiple allozyme loci across a mussel hybrid zone. *Mol. Biol. Evol.*, 19(3): 347–351.
- Saavedra, C. y Bachere, E. 2006. Review bivalve genomics. *Aquaculture*, 256: 1–14.
- Saavedra, C. y Peña, J.B. 2006. Phylogenetics of American scallops (Bivalvia: Pectinidae) based on partial 16S and 12S ribosomal RNA gene sequences. *Mar. Biol.*, 150: 111–119.
- Toro, J.E. 1998. Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based nuclear markers: The potential use in studies involving planktonic surveys. *Journal of Shellfish Research*, 17: 1203–1205.
- Toro, J.E., Ojeda, J., Vergara, A.M., Castro, G. y Alcapan, M.A. 2006. Molecular characterization of the Chilean blue mussel (*Mytilus chilensis* Hupe 1854) demonstrates evidence for the occurrence of *Mytilus galloprovincialis* in southern Chile. *Journal of Shellfish Research*, 24 (4).
- Venier, P., Pallavicini, A., De Nardi, B. y Lanfranchi, G. 2003. Towards a catalogue of genes transcribed in multiple tissues of *Mytilus galloprovincialis*. *Gene*, 314: 29–40.
- Vignal, A., Milan, D., San Cristobal, y Eggen, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel Evol.*, 34: 275–305.
- Wilson, K., Thorndyke, M., Nilsen, F., Rogers, A. y Martinez, P. 2005. Marine systems: moving into the genomics era. *Marine Ecology*, 26: 3–16.
- Zhang, D. y Hewitt, G.M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular ecology*, 12: 563–584.
- Zhang, Q., Allen, S.K. y Reece, K.S. 2005. Genetic variation in wild and hatchery stocks of Suminoe Oyster (*Crassostrea ariakensis*) assessed by PCR-RFLP and microsatellite markers. *Marine biotechnology*, 7(6): 588–99.