

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Validación de un método PCR-HRM multi-locus para la identificación de especies comerciales de mejillones: determinación de la aplicabilidad y transferencia a un segundo laboratorio

Actividad Formativa Equivalente a Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Alimentos área de Especialización en Ciencias de los alimentos y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

MATÍAS ALEJANDRO SEPÚLVEDA NAVARRO

Directora de Tesis: Dra. María Angélica Larraín

Santiago-CHILE

Junio 2020

A mis abuelos Mirta, Guido y mi madre Liliana.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis Dra. María Angélica Larraín y Dr. Cristián Araneda por su acogida y apoyo a lo largo de todo el proceso de esta AFE, por su buena disposición para resolver dudas y el excelente ambiente formado en el equipo de trabajo.

A los profesores Dra. Alicia Rodríguez – Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas – por poner a disposición sus equipos e instrumentos. A Dra. Natalia Lam – Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas – por sus recomendaciones y disposición para mejorar en la experimentación y comunicación.

A mis compañeros de laboratorio, Felipe, Marianela, Paola, Leonor, Migdalia y Gretel por estar siempre dispuestos a ayudar cuando lo necesité, por las conversaciones diarias y por los momentos compartidos.

A mis amigos y compañeros de Universidad, Checha por su incondicional amistad desde el día uno de Universidad. A Ema por su particular sentido del humor. Álvaro, Pablito, Bea, Gabi y Cris por ser parte de muchas alegrías. A la Cami por su paciencia y ser ese “*partner*” de laboratorio que todos necesitamos. A mi amigo Joaquín por su disposición para ayudarme en fisicoquímica y física. A Ingrid por su buen compañerismo.

A mis abuelos por su constante apoyo y dedicación. A mi madre por su afecto, por ser el pilar que me sostuvo y dio palabras de alientos cuando lo necesitaba. A César por su paciencia. A Rafael por su orientación, entrega y motivación.

Al sistema de Becas de la Universidad de Chile que me permitió realizar el Programa de Magíster en Ciencias de los Alimentos.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE ANEXOS	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo General.....	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3. METODOLOGÍA.....	12
3.0 Muestras de mejillones	12
3.1 Evaluación del método de extracción de ADN.....	14
3.1.1 Métodos extracción de ADN	14
3.1.2 Genotipado e Identificación de especies por el método PCR- HRM multi-locus.....	15
4.1.3 Asignación de especie	19
4.1.4 Estándares de referencia	19

3.2 Establecimiento del alcance del método	20
3.3 Transferencia a un segundo Laboratorio	21
4. RESULTADOS	23
Extracción de ADN: Evaluación de la integridad, cantidad y calidad del ADN extraído.....	23
Establecimiento del alcance del método	30
Transferencia a un Segundo Laboratorio	33
5. DISCUSIÓN	36
5.1 Evaluación de la calidad de ADN extraído desde diferentes matrices comerciales de mejillones	36
5.2 PCR - Identificación de especies en diferentes matrices comerciales.....	45
5.3 Transferencia a un segundo laboratorio	51
6. CONCLUSIONES	56
7. BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXOS	66
ANEXO 1	66

ANEXO 2	69
ANEXO 3	72
ANEXO 4	73
ANEXO 5	74
ANEXO 6	80
ANEXO 7	83
ANEXO 8	84
ANEXO 9	85
ANEXO 10	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1. Curvas de Melting.....	17
Figura N°2. Curvas de absorción.....	24
Figura N°3. Geles de Agarosa al 0.7% para método CTAB.....	25
Figura N°4. Geles de Agarosa al 0.7% para método de Fenol Cloroformo.....	26
Figura N°5. Extracción de prueba mediante el método de Chelex.	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Número de muestras incluidas en este estudio.....	13
Tabla N°2. Códigos numéricos para la asignación de cada uno de los posibles genotipos.....	18
Tabla N°3. Material de referencia de especies comerciales del género <i>Mytilus</i>	20
Tabla N°4. Número total de muestras problema seleccionadas para genotipado de transferencia.....	22
Tabla N°5. Tabla comparativa de los diferentes métodos de extracción de ADN.....	28
Tabla N°6. Asignación de Especie.....	32
Tabla N°7. Tabla de concordancias y discordancias entre ambos operadores (OP1 y OP2).....	34
Tabla N°8. Muestras discordantes observadas entre ambos operadores.....	35

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 166

ANEXO 269

ANEXO 372

ANEXO 473

ANEXO 574

ANEXO 680

ANEXO 783

ANEXO 884

ANEXO 985

ANEXO 10.....86

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Mitilicultura

La acuicultura está entre las actividades productivas de mayor importancia económica y social a nivel nacional. Después de la salmonicultura, el cultivo de mejillones (choritos) o mitilicultura, es la segunda actividad más relevante dentro de este sector (FAO, Revista AQUA). Los mejillones son la especie de bivalvos más cultivada y comercializada en nuestro país. Chile es el segundo productor mundial de mejillones y el primer exportador mundial (Larraín et al., 2012). En Chile, la producción se concentra en la región de Los Lagos y ha experimentado un importante crecimiento en volumen en la última década, pasando de una producción de 60.708 toneladas en 2003 a un total de 337.000 toneladas en 2017. Esto ha generado un volumen de exportaciones de 79.330 toneladas (Revista Aqua, 2018).

A nivel nacional, los mejillones se comercializan vivos (fresco-refrigerados), congelados, en conserva, mientras que los que se envían a exportación son en conserva y congelados (SUBPESCA 2017). Los principales mercados de destino son: La Unión Europea (España, Francia, Italia, principalmente), Rusia y Estados Unidos.

La industria en Chile basa su producción en el cultivo de mejillón chileno, *Mytilus chilensis* (AMICHILE, 2019). Pero no solo *Mytilus chilensis* existe en la costa del país, además, se han descrito otras especies del género *Mytilus* (*Mytilus galloprovincialis* y *Mytilus edulis platensis*) e híbridos putativos entre ellas (Larraín et al., 2012, Díaz-Puente et al., 2020). La distribución de *Mytilus chilensis* se sitúa a lo largo de 1900 km desde el golfo de Arauco hasta Cabo de Hornos (Araneda et al., 2016) mientras que *Mytilus edulis platensis* en el estrecho de magallanes (Santaclara et al., 2006) y *Mytilus galloprovincialis* en el golfo de Arauco (Tarifeño et al., 2006). Esta última especie se ha descrito como una altamente invasora (Branch y Steffani 2004), capaz de producir híbridos con *M. chilensis*, por lo que presenta ser una amenaza tanto para la ecología de *M. chilensis*, como para la industria productora nacional.

1.2 Identificación de la especie

La identificación de las especies mencionadas basándose en la morfología se torna complicada ya que, a simple vista, son muy similares entre sí. Por esto se han desarrollado diferentes métodos de identificación a través del uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de marcadores moleculares

mitocondriales tipo polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) como RFLP-PCR del gen de la enzima citocromo oxidasa I (*COI*) (Fernández-Tajes et al., 2011) y RFLP-PCR del gen mtDNA ribosomal 16s rRNA (Rawson and Hilbish 1995). También se han desarrollado marcadores nucleares para la identificación de especies, siendo el más común el método que tiene como blanco el gen de la proteína polifenólica adhesiva. Este marcador es capaz de diferenciar entre las especies *M. edulis*, *M galloprovincialis*, *M. trossulus* y sus híbridos usando un polimorfismo de tamaño revelados por PCR con partidores específicos (Me 15-16) (Inoue et al., 1995). Santaclara et al. (2006), usando el mismo método y añadiendo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), fueron capaces de diferenciar *M. chilensis* y sus híbridos de las demás especies. Sin embargo, las técnicas que contemplan RFLP consumen tiempo y son costosas debido a que requieren reacciones enzimáticas. El polimorfismo revelado por el RFLP y que permite la identificación de la especie, es de una sola base o SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”), éstos son el resultado de mutaciones que generan cambios en un solo nucleótido de una región específica del genoma que por definición se encuentra en una frecuencia mayor del 1% de la población. Los SNP han sido ampliamente usados como marcadores

moleculares en el estudio de muchas enfermedades genéticas, estudios farmacogenéticos (Kim et al., 2007) e incluso para estudios ecológicos, evolutivos y de conservación. Se ha probado que los SNP son útiles para diferenciar individuos, poblaciones y especies. Ejemplo de esto es el método desarrollado por Zbawicka et al. (2014), quienes seleccionando un panel de 21 SNP, lograron diferenciar taxonómicamente *M. edulis*, *M. trossulus*, y *M. galloprovincialis*, pudiendo distinguir dentro de estos mismos taxones, individuos y poblaciones en Europa. Sin embargo, en el desarrollo de este método no fue incluido *M. chilensis*, por no encontrarse en Europa.

El genotipado de SNPs se puede realizar mediante diferentes métodos, tales como PCR-RFLP, secuenciación, Taqman, High Resolution Melting (HRM), entre otros (Khlestkina, et al., 2006). El HRM destaca por ser un método simple, altamente sensible, barato y rápido (Wittwer, 2009). Su ventaja radica en que detecta los SNPs y pequeñas deleciones en amplificaciones de fragmentos de ADN por comparación de curvas de fluorescencia en función de la temperatura, obteniéndose resultados en muy poco tiempo. Además, evita el uso de geles o reactivos que puedan ser dañinos para la salud como el bromuro de etidio. El análisis se realiza incluyendo muestras de referencia, pues los alelos producen diferentes curvas de melting (Voosen et al., 2009).

El uso de HRM ha ayudado para que el análisis y asignación de especies del género *Mytilus* sea mucho más sencillo y rápido. Jilberto et al. (2017) han demostrado que haciendo uso de partidores (PAPM F-R), diseñados para amplificar un segmento del gen de la proteína adhesiva polifenólica de mejillón, es posible diferenciar entre las especies del género *Mytilus*: *M. edulis*, *M galloprovincialis*, *M. chilensis* en forma más eficiente y económica evitando el uso de técnicas como RFLP.

1.3 Trazabilidad de alimentos

La correcta identificación de estas especies juega un rol fundamental no solo en la protección de estas, sino también para apoyar la explotación sustentable, la trazabilidad y las exportaciones al permitir el ingreso a mercados fuertemente regulados. Los mercados europeos se rigen por el reglamento N°1379/2013 del Parlamento Europeo, que establece la organización común de mercados en el sector de los productos de la pesca y de la acuicultura. Esta normativa exige que los productos declaren en la etiqueta, entre otros, la denominación comercial de la especie, su nombre científico y la zona de captura del producto (Regulation (EU) No 1379/2013 of the European

Parliament). Por esto, es necesario generar un método de análisis de rutina para identificación de especies que sea de bajo costo, rápido y que pueda ser usado en productos comercializados hacia mercados extranjeros, para entregar información fidedigna al consumidor, brindar protección a las especies y contribuir a la trazabilidad. Para lograrlo, es necesario probar que el funcionamiento del método es adecuado para el uso previsto y demostrar la calidad analítica (Magnusson, 2014.).

1.4 Validación de un método analítico

La validación es la confirmación, mediante el examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto (ISO 17025:2005). Se enmarca en los requerimientos de normas sobre sistemas de gestión, particularmente en la norma ISO/IEC 17025:2005, que establece los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración (Lazos y Hernández, 2004). Su cumplimiento nos asegura que el método utilizado está entregando resultados correctos, lo cual abre mejores posibilidades ante la competencia en el mercado y entrega confianza sobre la calidad de los resultados a los clientes.

Según la guía técnica sobre “Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición” del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), los métodos para validar pueden ser: métodos no normalizados (aquellos desarrollados por el laboratorio o métodos nuevos) o métodos normalizados con una modificación significativa. Cuando se trata de métodos nuevos se debe realizar una validación prospectiva, es decir, a través del análisis de datos experimentales. Para alcanzarlo, se deben evaluar diferentes parámetros tales como aplicabilidad, practicabilidad, especificidad, sensibilidad, robustez, entre otros (Thompson et al., 2002). Así, solamente cuando se cumplen ciertos criterios predeterminados, un método puede ser adoptado como análisis de rutina y considerado para una mayor validación (Broeders et al., 2014).

La practicabilidad de un método se realiza analizando muestras problemas en el laboratorio de rutina y permite conocer si el nuevo método es fácilmente combinable con otros métodos realizados en el laboratorio o se puede ejecutar bajo las mismas condiciones. Su estudio se puede realizar mediante una transferencia a un segundo laboratorio. Para que se lleve a cabo se necesita que el procedimiento documentado, sea otorgado por la unidad que transfiere, hacia otro laboratorio (unidad receptora), así, se asegura que la unidad

receptora cuenta con el conocimiento para llevar a cabo los procesos analíticos (Massart et al., 1997). La transferencia a un segundo laboratorio nos ayuda a analizar si el método se puede realizar bajo condiciones de reproducibilidad, y puede otorgársele un enfoque de tipo comparativo. Este enfoque nos permite analizar las mismas muestras por ambos laboratorios (laboratorio que transfiere y receptor), con el objeto de demostrar equivalencia (Massart et al., 1997). Este proceso debe estar bien documentado, siendo parte de estos, el protocolo e informe de transferencia.

Por último, se establece la aplicabilidad o el alcance del método. Si se analizarán ácidos nucleicos se debe evaluar cuál es la identidad del analito (ADN mitocondrial, ADN genómico, plásmidos, entre otros), las concentraciones de ADN que pueden ser utilizadas de manera favorable para el análisis y el tipo de matriz (materia prima fresca/procesada, en conserva, alimento/pienso, etc.) considerado para la validación (*CODEX ALIMENTARIUS*). Esta información debe ser descrita en los correspondientes protocolos, en conjunto con la descripción de los equipos, reactivos y procedimientos de calidad y seguridad. La aplicabilidad debe ser consistente con las “reglas de oro” de Massart et al. (Branch y Steffani, 2004). Estas establecen que se debe incluir en la validación los tratamientos de las

muestras antes del análisis y que el procedimiento analítico debe ser validado para cada tipo de matriz donde se aplicará. Además de establecer los límites de aplicación, se pueden especificar cuáles son los posibles interferentes y las matrices en las que el método no puede ser aplicado (inaplicabilidad) (Sandoval et al., 2010).

Teniendo en cuenta la creciente demanda de mejillón chileno por mercados extranjeros, no contar con un método “multi-locus” de identificación de especies de mejillones basado en marcadores moleculares, podría reducir los ingresos por concepto de este, afectado directamente la economía nacional y la industria miticultora chilena. Por lo tanto, se hace necesario el desarrollo de un método que ayude a la identificación de especies de mejillones y apoye la trazabilidad de este producto. Sin embargo, para su distribución y uso, es imprescindible realizar su validación. Validar un método de reconocimiento de especies nos ayudará a respaldar la autenticidad del producto en el etiquetado, obedecer normas internacionales de calidad, resguardar la actividad productiva en nuestro país y aportar al análisis de hibridación entre especies.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Establecer la aplicabilidad del método multi-locus de identificación de especies de mejillón del género *Mytilus* mediante el método PCR-HRM multi-locus, determinando su alcance y prueba en un segundo laboratorio como parte de un proceso de validación.

2.2 Objetivos Específicos

1. Evaluación de distintos métodos de extracción de ADN en diferentes matrices. Selección y estandarización del método más apropiado en función de costos, tiempos, calidad de ADN extraído y sencillez del método.
2. Establecer el alcance del método en las especies blanco (*Mytilus chilensis*, *M. galloprovincialis*, *M. edulis* y *M. trossulus*) y distintas matrices (fresco-refrigerado, congelado, en conserva al natural, en conserva en aceite y otras). Detectar los posibles inhibidores e interferentes.

3. Evaluar el desempeño del método durante la transferencia a un segundo laboratorio

3. METODOLOGÍA

3.0 Muestras de mejillones

Se obtuvieron muestras de mejillones a partir de diferentes matrices comerciales: natural, aceite, marinado y otros, estos últimos corresponden a salsa de tomates, salsa de vieira y salsa picante. Se cuenta con productos de diferentes marcas de Chile, España, Dinamarca y Alemania. Se asignó un código y numeración a cada muestra, lugar de procedencia, tipo de matriz y especie declarada en el etiquetado como se muestra en la **Tabla N°1**.

Las muestras fueron recolectadas desde el borde del manto de entre 25 y 30 individuos de cada matriz (el número de individuos contenido en cada envase varía de uno a otro) y se conservaron en etanol a -18°C hasta que fueron sacadas para realizar los ensayos de extracción de ADN mediante los métodos de Fenol Cloroformo, CTAB y Chelex. Finalmente, las muestras extraídas fueron analizadas por High Resolution Melting (HRM). Los ensayos para cada matriz se hicieron en triplicado (**Tabla N°1**).

Tabla N°1. Número de muestras incluidas en este estudio. Se resume el número de muestras incluidas para los análisis de extracción de ADN y posterior establecimiento de la aplicabilidad e inaplicabilidad. A cada muestra comercial se le asignó un código de muestra más enumeración de cada individuo, clasificada por procedencia, tipo de matriz y se especificó si se declaraba o no la especie.

Código Muestra	Procedencia	N° de individuos analizados	Matriz	Especie declarada
NSJMCL	Chile	3	Natural	N/D
NMYMDE	Alemania	3	Natural	<i>Mytilus edulis</i>
NISMES	España	3	Natural	N/D
ARCMCL	Chile	3	Aceite	N/D
AANMCL	Chile	3	Aceite	N/D
ETAMCL	Chile	3	Marinado	<i>Mytilus chilensis</i>
EMYMDE	Alemania	3	Marinado	<i>Mytilus edulis</i>
ECAMES	España	3	Marinado	N/D
ORCMCL	Chile	3	Otro	N/D
OCOMES	España	3	Otro	N/D
OBIMDK	Dinamarca	3	Otro	<i>Mytilus edulis</i>
CONGELADO	Chile	3	Congelado	N/D

Las muestras etiquetadas con N/D no presentan especie declarada en la etiqueta del producto. Las muestras etiquetadas como “otro” son aquellas que están en salsa picante (ORCMCL), salsa de vieira (OCOMES) o salsa de tomates (OBIMDK).

3.1 Evaluación del método de extracción de ADN

3.1.1 Métodos extracción de ADN

Se probaron tres diferentes métodos de extracción de ADN siguiendo los protocolos para extracción de ADN según:

- Fenol cloroformo modificado para *Mytilus* (Larraín et al., 2014),
- Chelex (Chai et al., 2009)
- Método Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés) modificado de Arsenau et al. (2016).

Una vez ensayados todos los métodos, se realizó una matriz para evaluar parámetros de:

- Cuantificación de la concentración y pureza (razones 260/280 y 260/230) del ADN extraído con espectrofotómetro NanoDrop (NanoDrop ND-2000, Thermo Scientific, Wilmington, De, USA). Los valores óptimos para la razón de 260/280 es lo más cercana a 1,8, siendo un valor de 2 o superior, ARN puro. Para la razón 260/230 el rango aceptable es entre 2,0 y 2,2, valores bajo estos indican presencia de carbohidratos o fenol.

- Integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.7% utilizando bromuro de etidio como tinción.
- Dificultad de cada uno de los métodos empleados, en base al tiempo empleado, necesidades de capacitación previa, manipulación y toxicidad de los reactivos.
- Determinación de los costos (en base a la cantidad de reactivos utilizados y horas hombre) (Pirondini, A. 2010).

Las muestras de ADN fueron diluidas hasta alcanzar una concentración de 20 ng/ μ L y se almacenaron a -18°C . A continuación, se evaluó si la calidad del ADN extraído era adecuada para realizar la identificación de especies por el método PCR-HRM multi-locus.

3.1.2 Genotipado e Identificación de especies por el método PCR-HRM multi-locus.

El genotipado de cada individuo para la aplicabilidad y la transferencia a un segundo laboratorio del método multi-locus, se realizó mediante la técnica de High Resolution Melting (HRM) siguiendo el protocolo “Identificación de especies de mejillón del género *mytilus* mediante método PCR-HRM multilocus” (N° de POE, TP_006 Análisis en HRM v2) entregado por el Food

Quality Research Center (FQRC). Los análisis de genotipado se llevaron a cabo usando equipo MIC qPCR Cyler (Bio Molecular Systems) y el programa micPCR v2.2.0.

Para el correcto genotipado de los individuos se utilizaron estándares de referencia. Estos, poseen una T_m y C_t conocidos, los cuales pueden ser utilizados para reforzar la identificación de especie en caso de que existen ambigüedades en las curvas de melting. Por definición, la T_m es la temperatura a la cual la mitad de las moléculas de ADN de doble hebra se encuentra disociadas formando una sola hebra, mientras que el C_t (Cycle Threshold) es el ciclo en el cual la fluorescencia traspasa el límite establecido como “*background*” durante el proceso de amplificación en el PCR. La curva de melting de cada individuo problema fue contrastada con las curvas de melting de los estándares de referencia.

Según el SNP analizado, se obtuvieron resultados como se muestra en la **Figura N°1**. Para cada SNP se tienen 2 o 3 genotipos diferentes según sea el caso. Este proceso se realizó para cada SNP del panel.

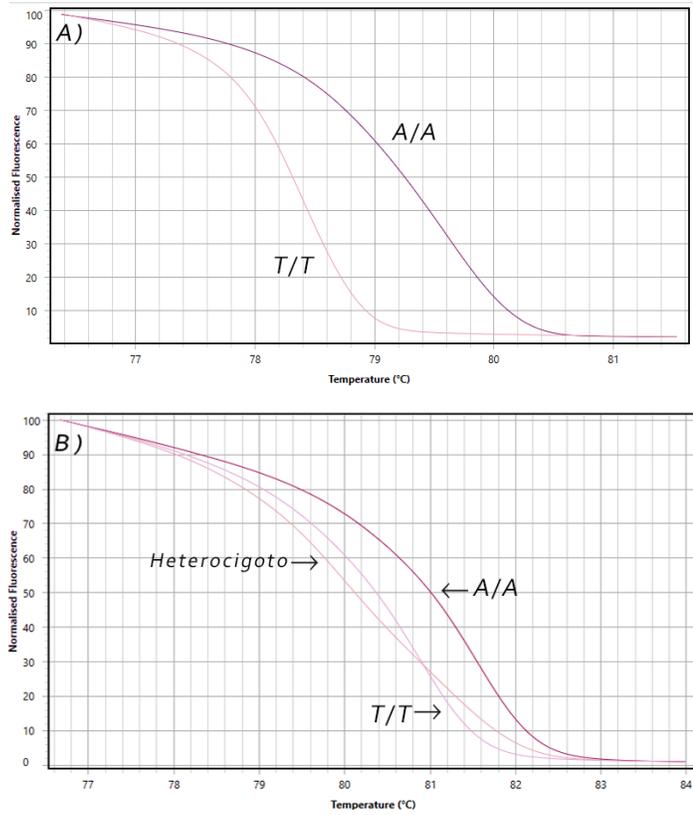


Figura N°1. Curvas de Melting. A) Curvas de “melting” asociada a SNP con genotipos homocigotos. B) Curvas de “melting” asociada a SNP con genotipos heterocigoto y homocigotos.

Los resultados se expresaron asignando códigos numéricos para cada base nitrogenada según los valores A=001; C=002; G=003; T=004; Polimorfismo=005 y 000000 cuando no era posible realizar asignación de especie o no se obtenía amplificación, como se muestra en la Tabla N°2.

Tabla N°2. Códigos numéricos para la asignación de cada uno de los posibles genotipos. Cada genotipo asignado a cada muestra se representó como una combinación única de números para ser leída por el programa GeneClass 2.0

Genotipo Ejemplo	AA	CC	GG	TT	AT	CG	AC	CT	0
Código numérico	001001	002002	003003	004004	001004	002003	001002	0002004	000000

4.1.3 Asignación de especie

La asignación de especies se llevó a cabo utilizando el programa GeneClass 2.0 comparando la identidad genética de cada individuo con una población de referencia. Para esto, fue necesario primero obtener resultados de cada uno de los SNP del panel, aplicado a cada individuo problema. La información de las poblaciones de referencia fue otorgada por el Food Quality Research Center (FQRC). El criterio utilizado para la asignación de especie fue obtener un puntaje de similitud igual o sobre el 95%.

4.1.4 Estándares de referencia

Los estándares de referencia fueron otorgados por el Food Quality Research Center (FQRC). Estos, deben cumplir con al menos uno de los siguientes criterios, (i) La inclusión de la muestra en un artículo científico publicado, (ii) que la muestra haya sido analizada por dos laboratorios independientes o (iii) que la muestra haya sido analizada por un mismo laboratorio con metodologías diferentes (Comunicación personal Dr. Med. Vet. Rainer Schubert – Eurofins Genomics Ebersberg, Alemania Los cumplimientos de los requisitos para las muestras de referencia se muestra en la Tabla N°3.

Estos, pertenecen a *M. chilensis* (Hualaihue – Chile), *M. edulis* (Isla Prince Edward – Canadá) y *M. galloprovincialis* (Galicia – España).

Tabla N°3. Material de referencia de especies comerciales del género *Mytilus*. Se muestra la especie, lugar de recolección, código interno asignado por el laboratorio (HLCL para *M. chilensis*, PECA para *M. edulis*, GAES para *M. galloprovincialis* y VACA para *M. trossulus*) y criterio para ser considerado material de referencia.

Especie	Lugar de recolección	Código Asignado	Criterio para ser material de referencia
<i>M. chilensis</i>	Hualaihue – Chile	HLCL	i
<i>M. edulis</i>	Isla Prince Edward – Canadá	PECA	i y iii
<i>M. galloprovincialis</i>	Galicia – España	GAES	i y iii
<i>M. trossulus</i>	Vancouver – Canadá	VACA	i y iii

3.2 Establecimiento del alcance del método

Para determinar el alcance del método PCR-HRM multi-locus se realizó el análisis PCR-HRM aplicando un panel reducido de SNP en individuos provenientes de diferentes matrices comerciales (conservas al natural, en aceite, marinados y otros). Se determinó en qué matrices el panel es capaz de identificar especies. Además, se analizaron los posibles inhibidores en caso de que el método no arroje resultados positivos o se consideren dudosos.

3.3 Transferencia a un segundo Laboratorio

Como parte del proceso de validación se evaluó el desempeño del método PCR-HRM multi-locus durante la etapa de transferencia, actuando como un segundo laboratorio receptor del método desde el laboratorio desarrollador. Se recibieron los procedimientos operativos estandarizados (POE) de análisis (“IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE MEJILLÓN DEL GÉNERO MYTILUS MEDIANTE MÉTODO PCR-HRM MULTILOCUS” , TP_006 Análisis en HRM v2) y de validación interna del método, material de referencia necesario y muestras problemas previamente analizadas por el primer laboratorio. Se analizaron un total de 220 individuos cuya información se resumen en la **Tabla N°4**. La evaluación de la etapa de transferencia se realizó a través del análisis de concordancia de los resultados obtenidos utilizando el coeficiente de Kappa de Cohen (Landis y Koch, 1977):

$$k = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$$

Donde p_o corresponde a la sumatoria de concordancias observadas y p_e a la sumatoria de concordancias atribuibles al azar.

El coeficiente kappa (κ) toma valores entre -1 y +1, mientras más cercano a +1, mayor es el grado de concordancia inter-observador. Por el contrario, un valor de $\kappa \leq 0$ refleja que la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar.

Tabla N°4. Número total de muestras problema seleccionadas para genotipado de transferencia. Se muestra la especie y número de individuos analizados por especie.

Especie	Número de individuos analizados
<i>M. chilensis</i>	44
<i>M. edulis</i>	44
<i>M. galloprovincialis</i>	44
<i>M. trossulus</i>	44
<i>Otros (Choromytilus chorus, Aulacomya atra)</i>	44

4. RESULTADOS

Extracción de ADN: Evaluación de la integridad, cantidad y calidad del ADN extraído

Se realizaron ensayos de prueba con las diferentes matrices para cada uno de los tres métodos utilizando solo dos muestras para ver la factibilidad de los métodos Fenol cloroformo, CTAB y Chelex con respecto a las matrices. De acuerdo con los resultados preliminares para los 3 métodos, se observó que la calidad del ADN no era la óptima cuando se realizaba mediante método Chelex (Tabla N°5, Figura N°2), por lo que se descartó continuar trabajando con dicho método y se prosiguió solo con el método de Fenol cloroformo y CTAB.

La integridad de las muestras de ADN extraídas fue analizada en gel de agarosa al 0,7% para cada uno de los métodos: Fenol Cloroformo (Figura N°2), CTAB (Figura N°3) y Chelex (Figura N°5). Para fenol cloroformo y CTAB se observa la extracción en triplicado para todas las matrices y de 2 muestras para el método Chelex, pertenecientes a: natural, marinado, aceite y otros. En todos los geles se presentó fragmentación del ADN para las muestras comerciales en conserva.

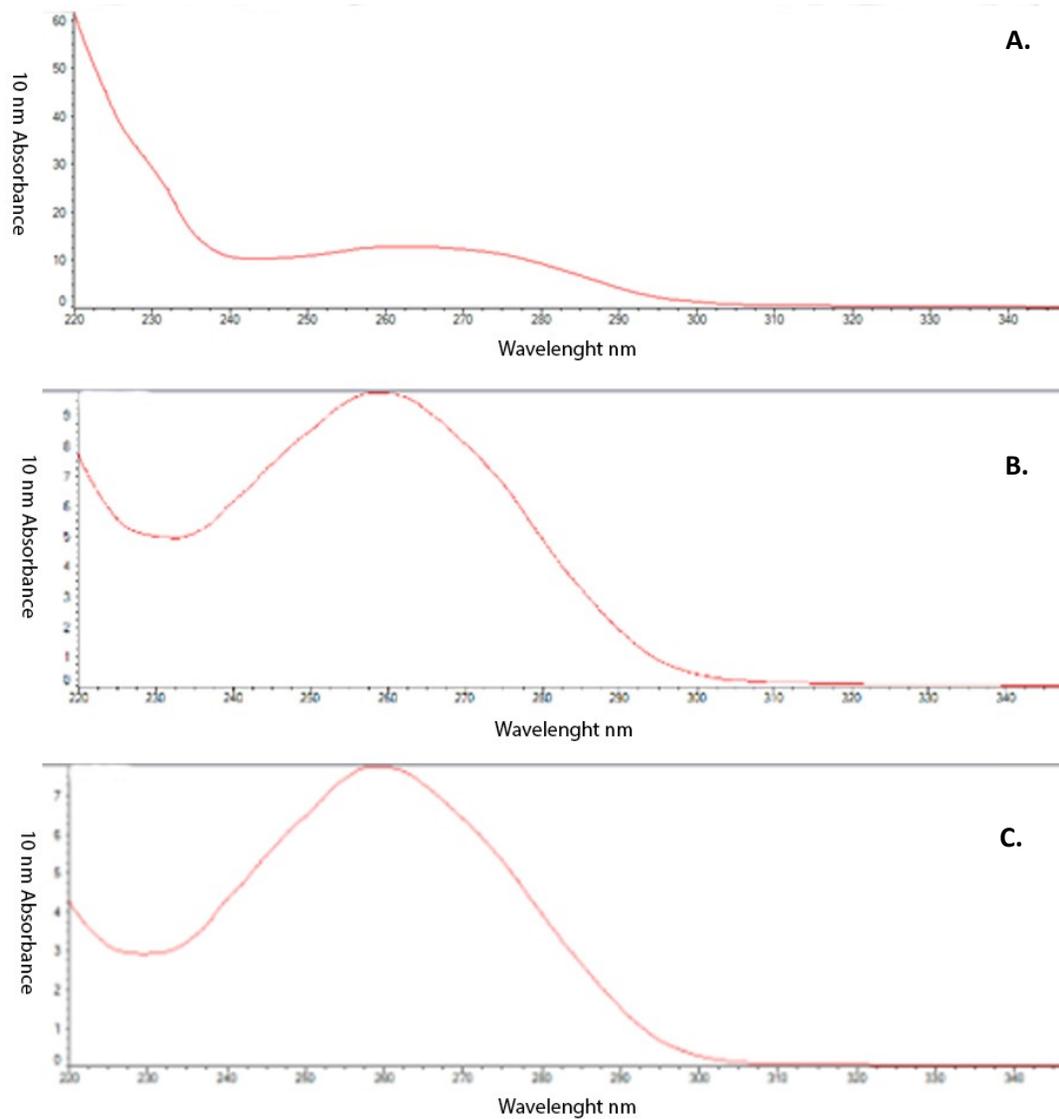


Figura N°2. Curvas de absorción. Comparación de curvas de absorción para una misma muestra de matriz al natural obtenida para la cuantificación de ADN usando espectrofotómetro Nanodrop 2000 para los 3 métodos de extracción. **A.** Chelex, **B.** Fenol Cloroformo y **C.** CTAB. La comparación se hace para una misma muestra de conserva al natural.

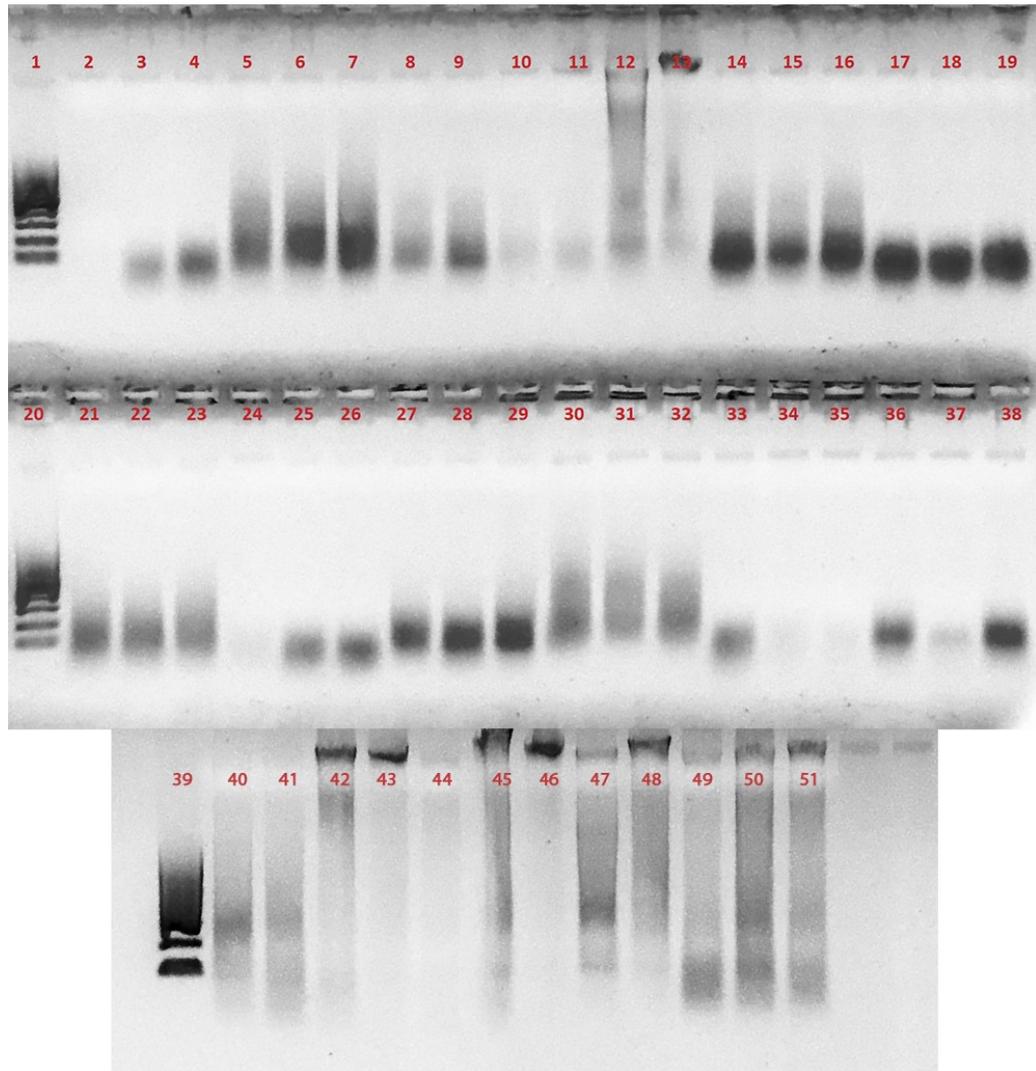


Figura N°3. Geles de Agarosa al 0.7% para la extracción mediante método de CTAB. Se presentan cada una de las 48 muestras analizadas. 1: Ladder 2: EYMDE 7 ,3: EYMDE 8, 4: EYMDE 9, 5: NISMES 2, 6: NISMES 3, 7: NISMES 4, 8: AANMCL 11, 9: AANMCL 12, 10: AANMCL 13, 11: VACA 17, 12: VACA 7, 13: VACA 6, 14: ORCMCL 7, 15: ORCMCL 8, 16: ORCMCL 9, 17: ETAMCL 4, 18: ETAMCL 3, 19: ETAMCL 2, 20: Ladder, 21: ARCMCL 7, 22: ARCMCL 8, 23: ARCMCL 9, 24: OBIMDK 3, 25: OBIMDK 4, 26: OBIMDK 5, 27: NSJMCL 7, 28: NSJMCL 8, 29: NSJML 9, 30: NMYMDE 19, 31: NMYMDE 20, 32: NMYMDE 21, 33: ECAMES 2, 34: ECAMES 3, 35: ECAMES 4, 36: OCOMES 2, 37: OCOMES 3, 38: OCOMES 4, 39: Ladder, 40: C 39, 41: C 37, 42: C 38, 43: R 24, 44: R 25, 45: R 23, 46: HLCL 44,47: HLCL 45, 48: HLCL 46, 49: CONGELADO 1, 50: CONGELADO 2, 51: CONGELADO

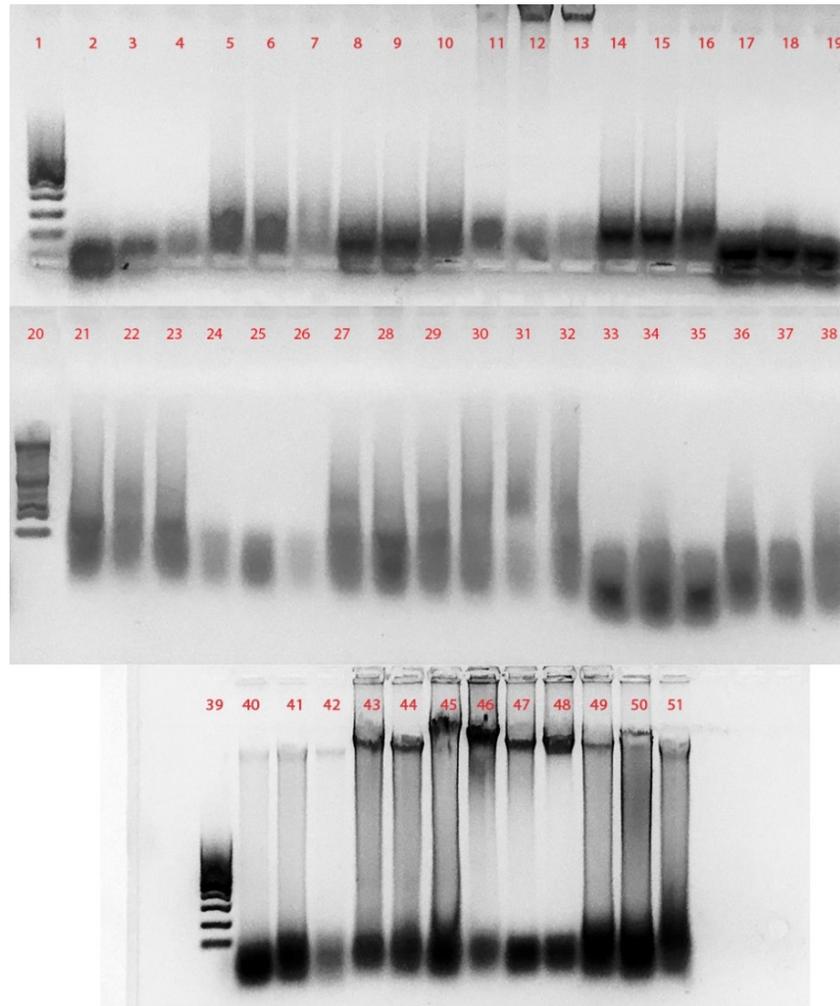


Figura N°4. Geles de Agarosa al 0.7% para la extracción mediante método de Fenol Cloroformo. Se presentan cada una de las 48 muestras analizadas. 1: Ladder 100, 2: EYMDE 7,3: EYMDE 8, 4: EYMDE 9, 5: NISMES 2, 6: NISMES 3, 7: NISMES 4, 8: AANMCL 11, 9: AANMCL 12, 10: AANMCL 13, 11: VACA 17, 12: VACA 7, 13: VACA 6, 14: ORCMCL 7, 15: ORCMCL 8, 16: ORCMCL 9, 17: ETAMCL 4, 18: ETAMCL 3, 19: ETAMCL 2, 20: Ladder, 21: ARCMCL 7, 22: ARCMCL 8, 23: ARCMCL 9, 24: OBIMDK 3, 25: OBIMDK 4, 26: OBIMDK 5, 27: NSJMCL 7, 28: NSJMCL 8, 29: NSJML 9, 30: NMYMDE 19, 31: NMYMDE 20, 32: NMYMDE 21, 33: ECAMES 2, 34: ECAMES 3, 35: ECAMES 4, 36: OCOMES 2, 37: OCOMES 3, 38: OCOMES 4, 39: Ladder, 40: C 39, 41: C 37, 42: C 38, 43: R 24, 44: R 25, 45: R 23, 46: HLCL 44,47: HLCL 45, 48: HLCL 46, 49: CONGELADO 1, 50: CONGELADO 2, 51: CONGELADO 3.

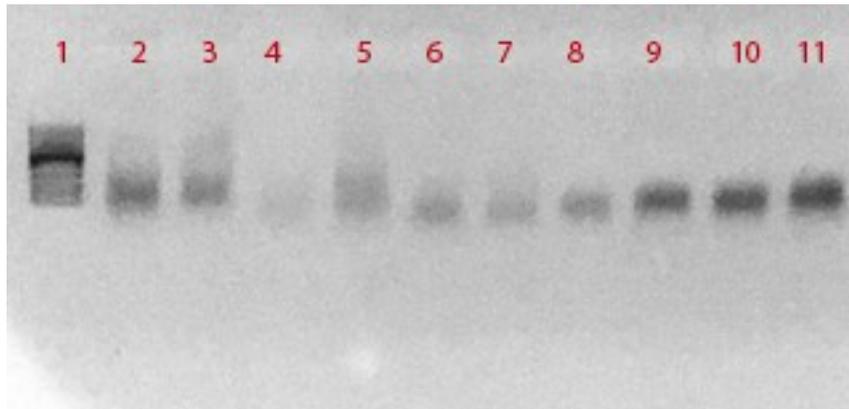


Figura N°5. Extracción de prueba mediante el método de Chelex. Se muestran los resultados de 12 muestras analizadas. 1: Ladder 100, 2: Muestra Fresca I, 3: Muestra fresca II, 4: ORCMCL 16, 5: ORCMCL 17, 6: ARCMCL 5, 7: ARCMCL 6, 8: ETAMCL 7, 9: ETAMCL 6, 10: NSJMCL 1, 11: NSJMCL 2.

La concentración de DNA resultante cuando se ensayó el método de Chelex fue similar al método Fenol Cloroformo y por encima del método CTAB, obteniéndose en promedio $523,74 \pm 285,4$ ng/ μ L (**Tabla N°5**). No obstante, los valores de los parámetros para medir pureza del DNA en las diferentes matrices utilizando el método Chelex fueron bajo los valores considerados como óptimos, con un promedio \pm desviación estándar de $1,01 \pm 0,4$ para 260/280 y de $0,43 \pm 0,3$ para 260/230 (**Tabla N°5**). En tanto, las concentraciones obtenidas por los métodos CTAB y Fenol Cloroformo fueron de $236,6 \pm 285,4$ ng/ μ L y $833,5 \pm 443,9$ ng/ μ L respectivamente, mientras que la mejor calidad para las razones 260/280 y 260/230 se obtuvo

mediante el método CTAB, con resultados de $1,80 \pm 0,32$ y $2,02 \pm 0,52$ respectivamente (**Tabla N°5**).

Tabla N°5. Tabla comparativa de los diferentes métodos de extracción de ADN. Se hace Comparación en cuanto a costo, dificultad del método, tiempo empleado para realizar la extracción, y parámetros de calidad del ADN (Concentración, razones 260/280 y 260/230).

Método	Costo (CLP)	Tiempo	Concentración (DNA ng/ μ L)	260/280	260/230	Dificultad del método
CTAB	1016,16	1/2 día a 1 día	$236,6 \pm 285,4$	$1,80 \pm 0,32$	$2,02 \pm 0,52$	**
Fenol Cloroformo	902,4	2 días	$833,5 \pm 443,9$	$1,77 \pm 0,10$	$1,41 \pm 0,26$	**
Chelex	985,8	1 Día	$523,74 \pm 388,3$	$1,01 \pm 0,4$	$0,43 \pm 0,3$	*

La concentración mostrada para cada método es un promedio entre todas las muestras ensayadas (Ver Tabla S3, Tabla S4 y Tabla S5), así como también las razones 260/280 y 260/230. Los valores para la razón 260/280 que indican una buena pureza del DNA se encuentra dentro del rango esperado de $\sim 1,8$ - $2,0$ mientras que los valores óptimos para la razón entre 260/230 varían de $\sim 2,0$ hasta $2,2$ ¹⁸. La dificultad se midió con una escala de 1 a 3 estrellas (*).

En cuanto a los costos, los valores para los métodos de Chelex, Fenol cloroformo y CTAB son bastante similares entre sí. A pesar de que el método de Fenol Cloroformo es un 10% más barato, es recomendable usar el método de CTAB, pues este alcanza mejores valores para las razones 260/280 y 260/230.

Las mayores diferencias entre los métodos se dieron respecto a la calidad y los tiempos de espera. El método Chelex presentó entretiempos cortos de entre 5 a 30 minutos, mientras que la manipulación de reactivos no significó gran dificultad ya que, no presentaban un riesgo para la salud. En cuanto al tiempo necesario para realizar extracción mediante el método de fenol cloroformo, se deben considerar largos tiempos de espera, independiente de la cantidad de muestras a analizar, esto, ya que deben de dejarse las muestras durante una incubación de 16 hrs. Además, se debe tener presente una previa capacitación del personal, debido a que se utilizan reactivos que pueden significar un riesgo para la salud, tales como: vapores provenientes del cloroformo y la toxicidad del fenol. Por otro lado, la preparación de los reactivos del método CTAB es sencilla y rápida y los tiempos de espera entre los procedimientos son similares a los del método del fenol cloroformo, siendo un punto a favor, ya que los resultados pueden ser alcanzables desde medio a un día, dependiendo de la cantidad de muestras analizadas. Para este método es también necesario considerar una previa capacitación, ya que al igual que el método del fenol cloroformo, existen procedimientos que utilizan cloroformo.

Establecimiento del alcance del método

La aplicabilidad se estableció utilizando el método establecido por Jilberto et al. (2017) a las muestras de mejillones comerciales. Los ensayos realizados para establecer el alcance del método contemplaron muestras comerciales de mejillones de diferentes marcas originarias de Alemania, Dinamarca, España y Chile. La cantidad de individuos analizados fueron de tres por cada matriz, siendo en total 36 (Natural, Marinado, Aceite, Salsa de Tomates, Salsa picante, Salsa de Viera y congelado), como se mostró en la Tabla N° 1, previamente.

Las muestras fueron analizadas utilizando el método PCR-HRM multi-locus usando 20 ng/uL de ADN. Se determinó que las especies detectables (especies blanco) son mejillones del género *Mytilus*: *M. chilensis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis* y *M. trossulus*, frescos y procesados. Estos últimos pueden corresponder a productos congelados, refrigerados y/o en conserva. Se determinó que el método podría ser válido en todas las matrices, pero con limitaciones propias de la extracción de ADN.

Se descartan como posibles inhibidores de la reacción de PCR el aceite de maravilla, salsa de vieira y Cloruro de Sodio (NaCl). Como limitación se

determinó que el método no es 100% aplicable ni eficiente en conservas que contengan los siguientes interferentes: ácido acético (vinagre de vino) y salsa de tomates.

De la Tabla N°6 se observa que, en su totalidad, las matrices sencillas (NISMES, AANMCL, ARCMCL, NSJMCL, Congelado) pudieron ser analizadas, con excepción de una muestra proveniente de una matriz en aceite (AANMCL 11). En tanto, las muestras provenientes de las matrices complejas (Salsa de Vieira, Marinado y Salsa de Tomates) no pudieron ser evaluadas en su totalidad. Algunas de las muestras de estas matrices que pudieron ser analizadas, correspondían con la especie declarada en el etiquetado (NMYMDE, EMYMDE), mientras que dentro de las mismas se encontraron individuos de otras especies que no correspondían con el etiquetado del envase (EMYMDE, OBIMDK, ETAMCL).

Tabla N°6. Asignación de Especie. Resumen de la probabilidad de asignación de especie (En porcentaje %) para cada muestra problema utilizando GeneClass 2.0. Las posibles especies son: *M. galloprovincialis*, *M. chilensis*, *M. edulis* y *M. trossulus*. Se presentan sin especie detectada, aquellas muestras que, por encontrarse bajo el valor de 95%, no pudieron tener una asignación de especie.

Muestra Problema	Especie Detectada	Puntaje (%)	Muestra Problema	Especie Detectada	Puntaje (%)
EMYMDE 7	-	33.264	OBIMDK 3	-	88.060
EMYMDE 8	<i>M. chilensis</i>	99.987	OBIMDK 4	-	88.060
EMYMDE 9	<i>M. edulis</i>	96.086	OBIMDK 5	<i>M. chilensis</i>	98.358
NISMES 2	<i>M. galloprovincialis</i>	99.218	NSJMCL 7	<i>M. chilensis</i>	100.000
NISMES 3	<i>M. galloprovincialis</i>	99.987	NSJMCL 8	<i>M. chilensis</i>	100.000
NISMES 4	<i>M. galloprovincialis</i>	99.998	NSJMCL 9	<i>M. chilensis</i>	100.000
AANMCL 11	-	93.068	NMYMDE 19	-	86.296
AANMCL 12	<i>M. chilensis</i>	99.998	NMYMDE 20	-	86.296
AANMCL 13	<i>M. chilensis</i>	99.951	NMYMDE 21	<i>M. edulis</i>	99.964
ORCMCL 7	<i>M. chilensis</i>	100.000	ECAMES 2	-	73.570
ORCMCL 8	<i>M. chilensis</i>	100.000	ECAMES 3	-	73.570
ORCMCL 9	<i>M. chilensis</i>	100.000	ECAMES 4	<i>M. chilensis</i>	99.998
ETAMCL 4	-	63.599	OCOMES 2	-	88.461
ETAMCL 3	-	63.599	OCOMES 3	<i>M. galloprovincialis</i>	99.857
ETAMCL 2	<i>M. trossulus</i>	98.680	OCOMES 4	<i>M. galloprovincialis</i>	99.998
ARCMCL 7	<i>M. chilensis</i>	100.000	CONGELADO 1	<i>M. chilensis</i>	100.000
ARCMCL 8	<i>M. chilensis</i>	99.994	CONGELADO 2	<i>M. chilensis</i>	100.000
ARCMCL 9	<i>M. chilensis</i>	99.999	CONGELADO 3	<i>M. chilensis</i>	99.983

Por otro lado, luego de haber realizado los análisis para diferentes productos elaborados en Chile, observamos que en su mayoría son empaquetados con *M. chilensis*, con una alta probabilidad de asignación.

Transferencia a un Segundo Laboratorio

Los análisis de concordancia fueron llevados a cabo utilizando el paquete “fmsb” del ambiente de análisis matemático R. Los resultados de las 220 muestras ensayadas en ambos laboratorios se resumen en la **Tabla N°7**. 15 muestras no mostraron concordancia, debido que uno de los dos operadores no pudo asignar especie (**Tabla N°8**). Se obtuvo un valor de 0,913 para el coeficiente de Kappa de Cohen. Este valor nos muestra una concordancia “casi perfecta” (Landis y Koch, 1977) cuando los análisis lo realizan dos operadores diferentes. Las 15 muestras que no son concordantes presentan 2 o más loci que no fueron utilizados por el programa GeneClass 2.0 como consecuencia de la falta de genotipo, lo cual disminuye la probabilidad de asignación por debajo del 95%. A estas muestras no se les asignó especie por encontrarse debajo del valor establecido.

Además, desde el panel de SNP utilizados, se eliminaron dos ellos por no dar resultados para ninguna muestra analizada en ambos laboratorios.

Tabla N°7. Tabla de concordancias y discordancias entre ambos operadores (OP1 y OP2). Se muestra la cantidad de concordancias y discordancias en la asignación de especies para *M. chilensis* (HLCL), *M galloprovincialis* (GAES), *M. trossulus* (VACA) y *M. edulis* (PECA). Cuando un operador no pudo realizar asignación de especie se denotaba como no asignado (NA).

		Operador 1 (OP1)					
		HLCL	GAES	VACA	PECA	NA	Total OP2
Operador 2 (OP2)	HLCL	44					44
	GAES		51			1	53
	VACA			42		1	43
	PECA				24		24
	NA		11	2		44	56
Total OP1		44	62	44	24	46	220

Tabla N°8. Muestras discordantes observadas entre ambos operadores. Se resumen las 15 muestras (C37, C41, C52, C58, C62, C78, V1, V3, V4, V10, V16, V19 y V20, VACA 41 y VACA 45) que no presentaron resultados para la asignación de especie. Se comparan las probabilidades de asignación de especie resultantes obtenidos por el operador 1 (OP1) y el operador 2 (OP2).

	OP1	OP2
	Probabilidad de Asignación (%)	Probabilidad de Asignación (%)
C37	52.772	100.000
C41	46.802	70.597
C52	99.880	93.280
C58	39.461	99.989
C62	59.924	99.955
C78	90.101	98.805
V1	82.472	86.512
V3	69.215	99.998
V4	53.753	96.890
V10	82.736	95.479
V16	33.333	99.991
V19	82.472	95.479
V20	90.099	98.384
VACA41	91.559	99.998
VACA45	99.822	94.970

5. DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de calidad de ADN extraído desde diferentes matrices comerciales de mejillones

El desarrollo y éxito de técnicas moleculares para la autenticación de especies y trazabilidad de productos mediante técnicas basadas en PCR, depende de la calidad, pureza y cantidad del ADN aislado. La calidad es determinada por el tamaño de sus fragmentos y el grado de fragmentación. Este varía de acuerdo con la muestra a examinar, método de extracción y grado de procesado.

Las presentaciones comerciales enlatadas de mejillones sufren diferentes procesos industriales que afectan la integridad de sus ácidos nucleicos, por lo que estudiarla es parte importante antes de llevar a cabo los análisis. Además, los productos marinos son ricos en mucopolisacáridos, y los mejillones no son la excepción (Wang et al., 2014). Estos, interfieren en la técnica de PCR, convirtiéndose en uno de los mayores problemas al momento de realizar los protocolos (Pereira et al., 2011). Para eliminar estos y otros componentes, se hace necesaria la selección de un método adecuado que sea capaz de extraer el ADN en un tiempo corto, seguro para el usuario, a bajo costo y con la

mejor calidad posible. Esta, puede ser medida en un espectrofotómetro a partir de las razones 260/280 y 260/230.

Polisacáridos, polifenoles, proteasas, entre otros, presentes en los mejillones resultan ser inhibidores de la PCR, por lo tanto, eliminarlos resulta ser indispensable para llevarla a cabo (Pereira et al., 2011).

Se logró realizar la extracción de ADN con los tres métodos propuestos. Sin embargo, dos de ellos resultaron ser mejores de acuerdo a los criterios utilizados.

Evaluación de la integridad del ADN

Al comparar la integridad obtenida por el método Fenol (Figura N° 3), CTAB (Figura N°4) y Chelex (Figura N°5), se aprecia un ADN fragmentado para todas las matrices. Esto, debido a que los alimentos en la industria sufren diferentes procesos de tratamientos. Dentro de ellos, se encuentran los tratamientos mecánicos; por calor para esterilizar (Lo et al., 2018; Fischer, 2007) y cambios de pH para detener el crecimiento de bacterias e inhibir la formación de toxinas (Rushing, 1993).

El tratamiento por calor puede generar eliminación o degradación del ADN en pequeños fragmentos, disminuyendo así la posibilidad de encontrar la

secuencia blanco (Jonas et al., 2001; Klein et al., 1998). Se ha reportado que el tratamiento térmico de atún enlatado degrada las moléculas de ADN a fragmentos de 200 a 100 pares de bases (bp) (Quintero et al. 1998) y disminuye de 836 a 162 bp cuando el haba de soja se esteriliza a 121 °C por 30 segundos. (Chen, 2005). Así mismo, se ha ensayado el efecto del calentamiento sobre la fragmentación del ADN en carne de pollo, vacuno y puerco, demostrando que existe una relación entre el tiempo de calentamiento y el tamaño del fragmento (Şakalar et al., 2012).

Otros componentes como el vinagre de uva o ácidos provenientes desde la salsa de tomate contribuyan aún más a la fragmentación del ADN. Los ácidos orgánicos son ampliamente utilizados en la industria de los alimentos como acidulantes y preservantes. Estos pueden ser agregados o producidos naturalmente como parte del proceso de fermentación. Acidulantes comunes son el ácido acético, láctico y cítrico. La disminución de pH no solo tiene un efecto bacteriostático, sino que también contribuye a la fragmentación del ADN producto de la depurinación de este (Gryson et al., 2010). Investigaciones hechas por Hupfer et al. (1999), mostraron que, durante el ensilado del maíz, el ADN fue degradado, y que fragmentos de 1914 bp no fueron detectados luego de 106 días. Bauer et al. (2003) investigaron el efecto

que tenían las condiciones acidas luego de haber calentado un plásmido de ADN en suero de tomate, obteniendo una mayor fragmentación luego de haber combinado estos tratamientos, lo mismo ocurrió cuando se realizó sobre ADN extraído desde harina de soya.

Método Chelex

La mayoría de los métodos de extracción de ADN han sido generados para ser utilizados en muestras humanas, mamíferos o plantas. Para muestras frescas de mejillones se han modificado diferentes protocolos y varían según la necesidad de análisis (Chai et al., 2009; Arsenau et al., 2016; Larraín et al., 2014; Rogers, 2017). Los reportes de métodos de extracción para muestras de mejillones comerciales son escasos, y para análisis genéticos se hace necesario contar con uno.

El método Chelex utilizado, entrega en promedio una concentración de ácidos nucleicos de $523,74 \pm 388,3$ ng/ μ L y valores en las razones 260/280 y 260/230 muy por debajo a lo recomendado (Dhaliwal, 2013). Esto, nos indica que existen proteínas, fenoles u otros tipos de contaminantes remanentes que absorben fuertemente a 280 nm y, por otro lado, carbohidratos que absorben a 230 nm. Estos contaminantes no pudieron ser eliminados siguiendo el

protocolo establecido en Chai et al. (2009), obteniéndose así muestras de ADN de baja pureza. Estos valores son disímiles con respecto a los obtenidos por los autores.

Para una extracción más eficiente, este método puede ser mejorado, tal como lo propone Sweet et al. (1997) en su estudio para obtener un mejor rendimiento cuando se extrae ADN desde saliva. Los autores, señalan el método Chelex como adecuado para tratar muestras que se encuentran degradadas o parcialmente contaminadas. Si los resultados no son los esperados, se propone realizar una purificación seguido de una filtración utilizando tubos Microcron-100 y realizar una segunda extracción siguiendo el mismo protocolo Chelex establecido. Sin embargo, en el mismo trabajo se reconoce que este método es menos efectivo en comparación a métodos que utilizan solventes orgánicos como el fenol, resultando en una calidad de ADN más baja. Lo mismo han concluido investigadores de Nestlé S.A., cuando han revisado la eficiencia de diferentes métodos de extracción de ADN para aplicarlos en muestras de soja. Especifican que utilizando resinas baratas y rápidas como Chelex-100, se obtienen altos rendimientos pero una pobre calidad en ADN.

La necesidad de eliminar contaminantes e inhibidores presentes en las diferentes matrices donde se encuentran los mejillones nos hace buscar otros métodos que nos entreguen mejoras en la calidad del ADN obtenido.

Método CTAB

El CTAB se ha utilizado con muy buen desempeño para procedimientos de eliminación de polisacáridos cuando se realiza extracción de ADN en plantas (Gryson, 2010). También ha presentado buen rendimiento cuando se aplica a diferentes productos alimenticios de uso diario: leche, yogur, crema, queso (Pirondini, 2010). Además, se ha reportado con éxito su uso en muestras frescas de mejillones, ostras, pescados, entre otros animales marinos

Las concentraciones de ADN obtenidas resultaron ser en promedio de $236,6 \pm 285,4$ ng/ μ L. Muy por debajo de lo entregado por el método chelex o fenol cloroformo, pero suficientes para llevar a cabo los análisis de HRM, siendo suficientes solo 20 ng/ μ L. En cuanto a los valores de las razones 260/280 y 260/230 para medir calidad, resultaron ser mucho mejores que el método chelex (Tabla N°5). Esto se debe a que el CTAB es capaz de eliminar mejor los polisacáridos mediante lavado, pues en medio hiposalino el CTAB forma

complejos insolubles con el DNA dejando en solución los contaminantes, que posteriormente son removidos (Lo y Shaw, 2018).

Según la modificación que se realice al método CTAB, pueden obtenerse grandes cantidades de ADN, siendo fácil y relativamente rápido. Algunos autores como Porebski, et al. (1997) han logrado extraer hasta 84 µg de ADN por gramo de tejido de planta con buenos resultados con respecto a los contaminantes. Cuando el método CTAB es aplicado en camarones cocinados, los resultados fueron similares a los obtenidos en esta extracción, 450.26 ng/µl y con una razón 260/280 de 2 (Besbes y Sadok, 2017). También el método ha presentado buen desempeño cuando ha sido aplicado en el haba de soya y productos cárnicos procesados, teniendo incluso mejor rendimiento que algunos kits (Stefanova, 2013).

Si bien este método ha tenido buen desempeño en algunos tipos de productos procesados, debe tenerse en cuenta que el procesamiento genera un alto impacto en la fragmentación del ADN (Stefanova, P., 2013; Besbes y Sadok, 2017; Chen et al. 2005, Quintero et al. 1998, Pirondini 2010). Cuando se compara el grado de fragmentación en productos cocinados y procesados de camarones contra a aquellos frescos que han sido extraído mediante el

método CTAB, se aprecia que los que han sido procesados tienen un mayor grado de fragmentación (Besbes y Sadok, 2017). De igual forma se puede ver que es mejor el rendimiento cuando se aplica sobre matrices que no han sido esterilizadas (Pirondini, 2010), como leche entera.

Método Fenol Cloroformo

Los procedimientos para extracción de ADN usando fenol cloroformo han sido usados con éxito para análisis molecular de muestras de tortugas marinas, tiburón, productos enlatados que contienen sardinas, entre otros (Teletchea et al., 2005). Sin embargo, debemos tener presente que la calidad de ADN obtenida por uno u otro método de extracción varía según tipo de tejido, método de extracción o incluso la forma en que se esté conservando el tejido (Besbes y Sadok, 2017).

El método de fenol cloroformo ha demostrado tener buenos resultados en cuanto a la concentración de ADN obtenido desde muestras frescas de mejillones (Larraín et al, 2012), pero no ha sido ensayado en muestras comerciales de estos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el fenol cloroformo entregó una muy alta concentración de ADN para muchas de las muestras analizadas. La razón 260/280 indicó libre contaminación de proteínas, mientras que con la razón 260/230 existieron desviaciones respecto al valor óptimo de 2.0. Se observó que esta última razón se encuentra fuera de rango tanto para muestras en conserva, congeladas y frescas. Esta disminución en la razón 260/230 puede deberse principalmente, como consecuencia de la extracción con fenol y remanentes de carbohidratos, componentes que poseen una absorbancia cercana a 230 nm, muy abundantes en moluscos. Para mejorarlo se puede reemplazar la precipitación del ADN utilizando alcohol isoamílico, lo cual lograría una precipitación más rápida que el etanol o añadiendo lavados extras con etanol.

A pesar de todo, encontramos que la utilización de este método es destacable por ser barato, por la obtención de grandes cantidades de ADN y la estabilidad por un tiempo prolongado de éste una vez realizada la extracción. No obstante, un mal manejo del fenol, puede incluso provocar quemaduras para la piel, por lo que su manejo debe ser realizado por personal entrenado en normas de bioseguridad.

En resumen, los seguidos tratamientos industriales fragmentan el ADN a un nivel tal que hace necesario la optimización de un método que consiga eliminar los inhibidores presentes en las matrices comerciales y rescatar los pequeños fragmentos de ADN.

5.2 PCR - Identificación de especies en diferentes matrices comerciales.

La creciente regulación del mercado a través de normas de calidad, el aumento de alergias alimenticias, malas prácticas de algunos productores de alimentos y razones culturales; han hecho que el consumidor tenga más conciencia respecto a la composición y origen de sus alimentos. El fraude alimentario y el mal etiquetado de los alimentos también son motivos de preocupación por parte de consumidores y entes reguladores, por lo que, una correcta autenticación de especie otorga tanto protección de los derechos del consumidor como a la de la biodiversidad (Teletchea et al., 2005).

Los métodos desarrollados para la identificación de especies en la industria de los alimentos pueden ser el uso de diferentes técnicas que contemplen la separación de proteínas, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), técnicas inmunohistoquímicas, etc. Estas, se han aplicado con éxito en

productos crudos (Rahmati et al., 2016; Rehbein et al., 1995). Sin embargo, dependiendo del analito, las desventajas pueden ser múltiples. Por ejemplo, el trabajo con proteínas puede verse dificultado por la denaturación producto de los tratamientos por calor. Por esto, se han desarrollado métodos más eficientes, rápidos y sensitivos utilizando como analito la molécula de ADN. Entre sus ventajas está presentar una relativa estabilidad frente al calor y la posibilidad de ser encontrada en muchos tejidos de origen animal y vegetal (Rahmati et al., 2016).

El high melting resolution (HRM) es un método eficiente y rápido; y que por considerar en sus etapas el PCR, tiene como templado la molécula de ADN. Recientemente, se ha desarrollado un método mono-locus para identificación de especies de mejillones haciendo uso de polimorfismos de una sola base (SNP) y que ha dado buenos resultados (Jilberto et al., 2017). Así, una exitosa identificación de especie precisa de la obtención de un ADN de calidad, pues para la amplificación de este mediante PCR, es más importante su pureza que el rendimiento. Por su parte, los inhibidores e interferentes de esta técnica son variados y pueden afectar de diferentes formas la amplificación.

La identificación de especie fue posible en matrices fresco-congelado, natural y aceite sin mayor dificultad. Estas matrices resultaron ser sencillas, ya que no contenían más que aceite de girasol o NaCl. No obstante, hacer una identificación de especie en las matrices más complejas, como escabeche, salsa de tomates o salsa picante fue más complejo. Como resultado para este tipo de muestras, no se obtuvieron curvas de melting o, si se obtenían, eran con valores de Ct fuera de los valores establecidos para otorgar un genotipo a la muestra en analizada. Esta imposibilidad de amplificación puede deberse a un conjunto de factores que, sumados, disminuyen la eficiencia de la amplificación.

Cuando se obtenían curvas de melting en muestras analizadas desde matrices complejas, estas, presentaban coincidencias cuando se comparaban con el material de referencia. Sin embargo, analizando el Ct (o Cq), criterio utilizado para ayudarse a decidir si asignar genotipo, el valor que debía de asignarse era cero. Esto nos hace pensar que podría deberse a la calidad del ADN obtenido cuando fue extraído: alta fragmentación, presencia de interferentes y baja recuperación de pequeños fragmentos de ADN de interés. Para solucionar este posible problema, se puede aumentar la concentración

de ADN que se usa para realizar los análisis en muestras de matrices complejas, pues el valor Ct, es un valor que se relaciona de manera inversa con la concentración de ADN. Bajas copias de ADN resultan en un Ct mucho mayor y viceversa.

Dentro de las variables que pueden estar contribuyendo a disminuir la tasa de amplificación, pueden ser: i) la cantidad de ADN blanco, ii) condiciones en que se realiza el PCR, iii) la fragmentación por los tratamientos sufridos por el alimento durante el proceso o iv) inhibidores presentes en la muestra. Un ejemplo de esto último son aquellos componentes en los cuales son ricos los moluscos, tales como polisacáridos, polifenoles y metabolitos secundarios, que pueden ser extraídos en conjunto con el ADN, pudiendo interferir en la PCR por unión a la doble hebra (Lo et al., 2018).

El tratamiento térmico recibido por los productos enlatados es otro factor a tener en cuenta, que, sumado a la presencia de los ácidos orgánicos contenidos en el vinagre de vino y salsa de tomates, aceleran la fragmentación del ADN (Bauer et al., 2003; Şakalar et al., 2012). Hird et al. (2006) comparan en su estudio el nivel de fragmentación que sufre el ADN cuando

muestras cárnicas son sometidas a tratamientos de calor, tales como cocción suave, cocción fuerte, horneado, enlatado y autoclavado. Sus resultados muestran que el tratamiento de enlatado y autoclavado aumenta fuertemente el nivel de fragmentación del ADN, teniendo los fragmentos extraídos un impacto en el Ct cuando se hacen ensayos de PCR a tiempo real. Así, concluyen que los fragmentos de ADN impactan de dos maneras en los análisis basados en PCR. Primero, cuando el ADN se fragmenta, la cantidad disponible de moléculas objetivo disminuye y segundo, los fragmentos pequeños pueden volverse difíciles de hacerlos precipitar cuando se realizan procedimientos que utilizan este tipo de técnicas (CTAB, fenol cloroformo, entre otros), disminuyendo la eficacia de la extracción y la posterior amplificación (Şakalar et al., 2012; Hird et al., 2006).

Besbes y Saloua (2017) compararon la eficiencia de la amplificación por PCR de camarones frescos frente a procesados. Notaron que estos últimos solo amplificaron cuando realizaron extracción por kit comercial y por un protocolo modificado de NaCl/SDS (Sodio Dodecil Sulfato), mientras que el ensayo de la amplificación por método CTAB no dio resultados. Además, atribuyen que la adición de componentes, como saborizantes en la

preparación de camarones actúa como un interferente en la reacción. Por lo que no sería descartable que los componentes que son añadidos en las matrices más complejas, no estarían siendo eliminadas del todo por el método de extracción seleccionado y posteriormente actuando como inhibidores de PCR. Una posible estrategia sería enfocarse en el método de extracción de ADN desde mejillones que se comercializan en matrices complejas, optimizando aún más el mismo; u otro como el NaCl/SDS, que entregó mejores resultados a estos autores.

Se ha reportado también, que la fragmentación del ADN afecta las mediciones espectrofotométricas, generando falsos negativos cuando se ha realizado detección de mutaciones mediante PCR de muestras de ADN fragmentadas. Kapp et al. (2014) compararon la cuantificación de 78 muestras haciendo uso de dos equipos, QubitTM (Thermo Fisher Scientific) y NanoDropTM (Thermo Fisher Scientific). Concluyen que las mediciones echas por NanoDrop pueden ser sobrestimadas hasta 5 veces, lo que podría resultar en el uso de una menor cantidad de ADN para los ensayos posteriores. Según lo anterior, sería recomendable usar más cantidad de ADN a aquellas muestras a analizar que provienen de matrices complejas (Salsa de

tomates, Salsa picante, Salsa de viera, entre otras), para así, asegurarnos de que se está agregando una cantidad adecuada de ADN blanco para la reacción de PCR.

Transferencia a un segundo laboratorio

Como parte de la validación del método se realizó una transferencia a un segundo laboratorio. Lo anterior, con la finalidad de evaluar la tasa de falsos positivos/negativos y el desempeño de este bajo diferentes condiciones, tales como cambio de operador, cambios de instrumentación, equipos, etc. Este procedimiento es esencial, ya que puede ayudar a determinar si es posible continuar con el proceso de validación y a estudiar cuan práctico puede llegar a ser la realización del método.

La fuerte concordancia entre los resultados de ambos laboratorios obtenida mediante el estadístico Kappa de cohen (Tabla N°7) y sin resultados de falsos positivos/ negativos, nos indica que es posible encaminar el método de PCR-HRM multi-locus hacia un proceso mayor de validación. Del total de 220 muestras trasferidas para el estudio, 15 muestras no concordaron al realizar los análisis de asignación de especie. De estas 15, la totalidad presentó

discordancia por la no asignación de especie por parte de uno de los operadores. Se observó que la no asignación se dio por la falta de resultados de dos, tres o más locus, lo cual, como consecuencia, disminuyó la probabilidad de asignación de especie a valores por debajo del umbral del 95%, límite establecido para decidir si asignar o no especie. Sumado a lo anterior, se observó que existían resultados diferentes en cuanto a la asignación de genotipos.

Una posibilidad para corregir la falta de resultados es realizar su repetición para descartar motivos de mala manipulación por parte de los operadores y asegurarse de que la muestra realmente no está arrojando resultados cuando se aplica el método PCR-HRM. Esto, podría deberse a que i) la concentración de ADN utilizada no fue la suficiente y fue sobrestimada por la lectura de NanoDropTM generando falsos negativos (Kapp et al., 2015), ii) el método de extracción de ADN falló para esa muestra en específico o iii) la manipulación de la muestra no fue la correcta al momento de cargarla para realizar su análisis por PCR-HRM. Respecto a estos últimos puntos establecidos, nos damos cuenta de la necesidad de entregar los conocimientos técnicos a los operadores respecto a las buenas prácticas de laboratorio (BPLs) establecidos en las normas entregadas por los organismos

competentes. De esta manera, se toman las medidas necesarias y otorgan a los analistas las herramientas para que los análisis y entrega de resultados verdaderos que cumplan con los requisitos de calidad.

Por otro lado, si la extracción de ADN falla para ciertas muestras, los procesos de análisis que le proceden se ven alterados. Los remanentes de ciertos compuestos complican el proceso de análisis interviniendo en la PCR, pudiendo generar así una falta de resultados. Además, se debe considerar que se trabajó con muestras que fueron extraídas mediante el método de fenol cloroformo almacenadas a 4°C, por lo que no es descartable que algunas pudiesen contener mayor cantidad de restos de fenol que otras o el ADN se haya degradado con el pasar del tiempo.

Por otra parte, existió discordancia entre algunos de los valores para la asignación de genotipos. Si bien los resultados que no coincidieron entre ambos operadores no tuvieron un impacto en el resultado final del estadístico Kappa de Cohen, sí podría ser un factor a considerar cuando se presentan valores cero para la asignación de genotipos en la misma muestra. Estas discordancias de genotipos se observan que no son aleatorias por lo que podrían deberse a dos posibles consecuencias, siendo i) la contaminación por

alguno de los amplicones o que ii) la asignación de genotipo no fue la correcta debido a una mala interpretación de las curvas de disociación.

Las fuentes de contaminación cruzada pueden ocurrir porque en un laboratorio se analizan diversos organismos, por el uso de una muestra reiteradas veces haciendo que permanezca expuesta en el ambiente del laboratorio por mayor tiempo, entre otros (Aslanzadeh, 2004). Una PCR genera 10^9 copias desde una molécula de ADN blanco y si es aerosolizada pueden liberarse desde 10^6 copias de producto de PCR. Si lo anterior no es controlado, en un tiempo corto la acumulación de producto de PCR puede lograr contaminar equipos, sistemas de ventilación e incluso los reactivos (Aslanzadeh, 2004). Para evitar este problema es recomendable utilizar una solución de hipoclorito de sodio al 1%, pudiendo ser útil incluso el cloro de uso doméstico, tal como demuestran Fischer et al. (2016) en su estudio.

La asignación del genotipo se puede realizar solo observando la curva de melting de la muestra problema y comparándola con la del material de referencia. Sin embargo, esto no es posible para todas las muestras en estudio, por lo que para tener una medición objetiva se hace necesario considerar el

valor del C_t (cycle threshold) y de la T_m de cada muestra, comparándolos también con el material de referencia.

6. CONCLUSIONES

Los métodos enzimáticos CTAB y Fenol Cloroformo para extraer ADN entregaron buenos resultados en cuanto a concentración. Dentro de las ventajas del método Chelex fue ser rápido, no inflamable, no tóxico, y sencillo de llevar a cabo, no obstante, la calidad del ADN extraído fue muy pobre.

El método de fenol cloroformo consume más tiempo, pero es capaz de extraer grandes cantidades de ADN con una calidad suficiente para realizar PCR. Éste hace uso de reactivos tóxicos/inflamables pero un correcto manejo de estos no debiese ser limitante para utilizarlo.

Con el método CTAB no se obtienen concentraciones de ADN tan altas como las que se logra con el fenol cloroformo, pero si suficientes para realizar los análisis de PCR-HRM. Éste entregó una mejor calidad del ADN en cuanto a eliminación de interferentes en matrices sencillas.

La extracción de ADN para su uso en PCR por medio de fenol cloroformo y CTAB en las matrices complejas como salsa picante, escabeche y salsa de tomates no produce resultados positivos. Se hace necesario su optimización

o probar otros métodos para para realizar el PCR en muestra con estos medios de empaque.

El correcto uso de protocolos y cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio logrará que los operadores que utilicen el método PCR-HRM multi-locus sean rápidos y eficientes al momento de realizar sus labores. Verificar los procesos antes de continuarlos hará que se disminuyan las repeticiones de las muestras problema o contaminaciones en el PCR. Al eliminarlas se es posible prevenir un mal reporte y se estará haciendo entrega de resultados que cumplan con altos estándares de calidad.

La exitosa transferencia a un segundo laboratorio del método PCR-HRM multi-locus muestra que es posible continuar al siguiente paso: La validación del método Interlaboratorio.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. FAO (2018). Panorama de la pesca continental y la acuicultura en América Latina y el Caribe. Reunión de la COPESCAALC. Panamá.
2. LARRAÍN, M. A., DÍAZ, N. F., LAMAS, C., VARGAS, C., & ARANEDA, C. (2012). Genetic composition of *Mytilus* species in mussel populations from southern Chile. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(4).
3. MITÍLIDOS EN SU MEJOR MOMENTO. (2018). *AQUA*, [online] (214), pp.51-53. Available at: <http://www.aqua.cl/wp-content/uploads/sites/3/2018/05/AQUA-214.pdf> [Accessed 17 Jul. 2018].
4. Amichile. (2018). Amichile. EXPORTACIONES. [Online]. Available at: <https://www.amichile.com/copia-de-industria-1> . [Accessed 28 September 2018]
5. SANTA CLARA, F. J., ESPÍNEIRA, M., CABADO, A. G., ALDASORO, A., GONZALEZ-LAVÍN, N., & VIEITES, J. M. (2006). Development of a method for the genetic identification of mussel species belonging to *Mytilus*, *Perna*, *Aulacomya*, and other genera. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8461-8470.
6. TARIFEÑO, E., GALLEGUILLOS, R., LLANOS-RIVERA, A., ARRIAGADA, D., FERRADA, S., CANALES-AGUIRRE, C. B., & SEGUEL, M. (2012). Identificación errónea del mejillón, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck 1819) como la especie, *Mytilus chilensis* (Hupe 1854) en la Bahía de Concepción, Chile. *Gayana (Concepción)*, 76(2), 167-172.
7. INOUE, K., WAITE, J. H., MATSUOKA, M., ODO, S., & HARAYAMA, S. (1995). Interspecific variations in adhesive protein sequences of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and *M. trossulus*. *The Biological Bulletin*, 189(3), 370-375.

8. JILBERTO, F., ARANEDA, C., & LARRAÍN, M. A. (2017). High resolution melting analysis for identification of commercially-important *Mytilus* species. *Food Chemistry*, 229, 716-720.
9. KIM, S., & MISRA, A. (2007). SNP genotyping: technologies and biomedical applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 9, 289-320.
10. ZBAWICKA, M., DRYWA, A., ŚMIETANKA, B., & WENNE, R. (2012). Identification and validation of novel SNP markers in European populations of marine *Mytilus* mussels. *Marine biology*, 159(6), 1347-1362.
11. KHLESTKINA, E. K., & SALINA, E. A. (2006). SNP markers: methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat. *Russian Journal of Genetics*, 42(6), 585-594.
12. WITTEWER, C. T. (2009). High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human mutation*, 30(6), 857-859.
13. VOSSEN, R. H., ATEN, E., ROOS, A., & DEN DUNNEN, J. T. (2009). High-Resolution Melting Analysis (HRMA)—More than just sequence variant screening. *Human mutation*, 30(6), 860-866.
14. Regulation (EU) No 1379/2013 of the European Parliament and of the Council of 11 december 2013 on the common organisation of the markets in fishery and aquaculture products, amending Council Regulations (EC) No 1184/2006 and (EC) No 1224/2009 and repealing Council Regulation (EC) No 104/2000 (OJ L 354, 28.12.2013, p. 1.)
15. MAGNUSSON, B. (2014). *The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics (2014)*. Eurachem. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
16. Lazos, R., & Hernández, I. (2004). La validación de métodos: un enfoque práctico. In *Simposio de metrología* (pp. 25-30).
17. ISO, E. IEC 17025: 2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.(ISO/IEC 17025: 2017), 21.

18. THOMPSON, M., ELLISON, S. L., & WOOD, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835-855.
19. BROEDERS, S., HUBER, I., GROHMANN, L., BERBEN, G., TAVERNIERS, I., MAZZARA, M., ... & MORISSET, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), 115-126.
20. ALIMENTARIUS, C., & CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. (2016). Procedural manual. Rome: Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme, FAO, Twenty-fourth edition.
21. SANDOVAL, S., DUFFAU, B., ROJAS, F., GUERRERO, I., ROA, L., RODRÍGUEZ, L., ... & AGUILERA, M. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. *Guía Técnica*, (1).
22. 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.
23. CHAI, L. C., FATIMAH, C. A., ... NATASHA, L. H. Y. (2009). Rapid isolation of genomic DNA from Asian green-lipped mussel (*Perna viridis*) for random amplified microsatellite polymorphism. *International Food Research Journal* 16: 113-118.
24. ARSENEAU, J. R., STEEVES, R., & LAFLAMME, M. (2016). Modified low-salt CTAB extraction of high-quality DNA from contaminant-rich tissues. *Molecular Ecology Resources*, 17(4), 686-693.
25. SCIENTIFIC, T. (2013). T042–TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers Assessment of Nucleic Acid Purity. *Wilmington, DE: Thermo Scientific Nanodrop Products*.

26. LANDIS, J. R., & KOCH, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *biometrics*, 159-174.
27. FERNÁNDEZ-TAJES, J., A. LONGA, J. GARCÍA-GIL, Y.W. CHIU, Y.S. HUANG, J. MÉNDEZ & R.S. LEE. 2011. Alternative PCR-RFLP methods for mussel *Mytilus* species identification. *Eur. Food Res. Technol.*, 233: 791-796.
28. RAWSON, P. D., & HILBISH, T. J. (1995). Distribution of male and female mtDNA lineages in populations of blue mussels, *Mytilus trossulus* and *M. galloprovincialis*, along the Pacific coast of North America. *Marine Biology*, 124(2), 245-250.
29. ANEXO, I. (2013). Buenas Prácticas para Laboratorio de Control de Medicamentos. *Validación de Métodos Analíticos. Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED). La Habana, Cuba*, 3-25.
30. D.L. MASSART, B.G.M. VANDEGINSTE, L.M.C. BUYDENS, S. DE JONG, P.J. LEWI, J. SMEYERS-VERBEKE, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1997
31. BRANCH, G. & STEFFANI, C. (2004). Can we predict the effect of alien species? A casehistory of the invasion of South Africa by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology Ecology*, 300:189–215
32. WANG, W., WANG, S. X., & GUAN, H. S. (2012). The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: an overview. *Marine drugs*, 10(12), 2795-2816.
33. PEREIRA, J. C., CHAVES, R., BASTOS, E., LEITÃO, A., & GUEDES-PINTO, H. (2011). An efficient method for genomic DNA extraction from different molluscs species. *International journal of molecular sciences*, 12(11), 8086-8095.
34. GRIENKE, U., SILKE, J., & TASDEMIR, D. (2014). Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health. *Food chemistry*, 142, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.07.027>
35. LO, Y. T., & SHAW, P. C. (2018). DNA-based techniques for authentication of processed food and food supplements. *Food chemistry*, 240, 767-774.

36. FISCHER, M. (2007). Genetically Engineered Food—Methods and Detection. By Knut J. Heller (Editor). *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 2(10), 1308-1309.
37. RUSHING, J. E., & CURTIS, P. A. (1993). Acidified food: formulating dressings, sauces, and marinades. *AG (North Carolina Agricultural Extension Service)(USA)*. no. 479.
38. JONAS, D. A., ELMADFA, I., ENGEL, K.-H., HELLER, K. J., KOZIANOWSKI, G., KOˆNIG, A., ET AL. (2001). Safety considerations of DNA in food. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 45(6), 235–254
39. KLEIN, J., ALTENBUCHNER, J., & MATTES, R. (1998). Nucleic acid and protein elimination during the sugar manufacturing process of conventional and transgenic sugar beets. *Journal of biotechnology*, 60(3), 145-153
40. QUINTEIRO, J., SOTELO, C. G., REHBEIN, H., PRYDE, S. E., MEDINA, I., PÉREZ-MARTÍN, R. I., ... & MACKIE, I. M. (1998). Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR– restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(4), 1662-1669.
41. CHEN, Y., GE, Y. Q., & WANG, Y. (2007). Effect of critical processing procedures on transgenic components in quality and quantity level during soymilk processing of Roundup Ready Soybean. *European Food Research and Technology*, 225(1), 119–126.
42. ŞAKALAR, E., ABASIYANIK, M. F., BEKTIK, E., & TAYYROV, A. (2012). Effect of heat processing on DNA quantification of meat species. *Journal of food science*, 77(9), N40-N44.
43. GRYSON, N. (2010). Effect of food processing on plant DNA degradation and PCR-based GMO analysis: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2003-2022.

44. HUPFER C, MAYER J, HOTZEL H, SACHSE K, ENGEL KH (1999). The effect of ensiling on PCR-based detection of genetically modified Bt maize. *Eur Food Res Technol* 209(5):301–304
45. BAUER, T.; WELLER, P.; HAMMES, W.P.; HERTEL, C. The Effect of Processing Parameters on DNA Degradation in Food. *European Food Research and Technology* 2003, 217, 338–343.
46. DHALIWAL, A. (2013). DNA extraction and purification. *Mater Methods*, 3, 191.
47. SWEET, D., LORENTE, M., LORENTE, J. A., VALENZUELA, A., & VILLANUEVA, E. (1997). An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *Journal of Forensic Science*, 42(2), 320-322.
48. PIRONDINI, A., MAESTRI, E., VISIOLI, G., MARMIROLI, M., & MARMIROLI, N. (2010). Yield and amplificability of different DNA extraction procedures for traceability in the dairy food chain. *Food Control*, 21(5), 663-668.
49. NADIA, B., & SADOK, S. (2017). Comparison of DNA-extraction Methods Suitable for PCR-based Applications to Identify Shrimp Species in Commercial Products. *Journal of Fisheries Sciences. com*, 11(4), 25-31.
50. STEFANOVA, P., TASEVA, M., GEORGIEVA, T., GOTCHEVA, V., & ANGELOV, A. (2013). A modified CTAB method for DNA extraction from soybean and meat products. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(3), 3803-3810
51. TELETSCHEA, F., MAUDET, C., & HÄNNI, C. (2005). Food and forensic molecular identification: update and challenges. *Trends in biotechnology*, 23(7), 359-366.
52. RAHMATI, S., JULKAPLI, N. M., YEHYE, W. A., & BASIRUN, W. J. (2016). Identification of meat origin in food products—A review. *Food control*, 68, 379-390.
53. REHBEIN, H., MACKIE, I. M., PRYDE, S., GONZALES-SOTELO, C., PEREZ-MARTIN, R., QUINTEIRO, J., & REY-MENDEZ, M. (1995). Fish

species identification in canned tuna by DNA analysis (PCR-SSCP). *Informationen für die Fischwirtschaft aus der Fischereiforschung*, 42(4), 209-212.

54. HIRD, H., CHISHOLM, J., SANCHEZ, A., HERNANDEZ, M., GOODIER, R., SCHNEEDE, K., ... & POPPING, B. (2006). Effect of heat and pressure processing on DNA fragmentation and implications for the detection of meat using a real-time polymerase chain reaction. *Food additives and contaminants*, 23(7), 645-650.
55. KAPP, J. R., DISS, T., SPICER, J., GANDY, M., SCHRIJVER, I., JENNINGS, L. J., ... & WALLACE, A. (2015). Variation in pre-PCR processing of FFPE samples leads to discrepancies in BRAF and EGFR mutation detection: a diagnostic RING trial. *Journal of clinical pathology*, 68(2), 111-118.
56. ASLANZADEH, J. (2004). Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 34(4), 389-396.
57. FISCHER, M., RENEVEY, N., THÜR, B., HOFFMANN, D., BEER, M., & HOFFMANN, B. (2016). Efficacy assessment of nucleic acid decontamination reagents used in molecular diagnostic laboratories. *PloS one*, 11(7), e0159274
58. Porebski, S., Bailey, L. G., & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant molecular biology reporter*, 15(1), 8-15.

ANEXOS

ANEXO 1

Protocolo de extracción de ADN mediante método CTAB

Reactivos

- CTAB lysis buffer
- Diluted CTAB buffer
- Agua para PCR
- Cloroformo:Alcohol Isoamilico
24:1
- Etanol 80%
- Proteinasa K
- Bromuro de Etidio
- Agarosa
- Ladder
- Buffer de carga

7.1 Liberación de ADN desde el tejido

Paso 1. A partir del mejillón, extraer 25/30 mg de tejido desde el borde del manto y lavarlo con etanol 80%. Secar el etanol con papel toalla. Colocarlo en tubo eppendorf de 1.5 ml con la tapa abierta para permitir la evaporación de las trazas de etanol.

Paso 2. Agregar a cada tubo con muestras 500 μ L de CTAB lysis buffer. Luego añadir 30 μ L de Proteinasa K 20 mg/mL y llevar a incubación en baño termostático a 56-60°C por 2,5 hrs. Agitar por inversión cada 30 minutos los tubos en incubación.

Paso 3. Enfriar las muestras a temperatura ambiente y luego añadir 500 μ L de Cloroformo:Alcohol Isoamilico 24:1 a cada tubo. Homogeneizar invirtiendo los tubos y centrifugar a temperatura ambiente (RT) por 15 minutos a 5100 rpm.

7.2 Precipitación de ADN con CTAB

Paso 4. Transferir 300 μL de fase acuosa a un nuevo tubo de 1.5 ml cuidando de tomar parte de la otra fase. Agregar 600 μL de diluted CTAB buffer. Homogeneizar invirtiendo los tubos y colocar nuevamente en baño termostático a 56-60°C por 30 minutos. Nota: A veces es necesario dejarlo más del tiempo estimado en baño termostático para notar la formación de los complejos DNA-CTAB e incluso puede ser que no se observen bien dependiendo de la muestra.

Paso 5. Centrifugar a 12000 rpm por 3 minutos para precipitar los complejos DNA-CTAB. Descartar el sobrenadante.

Paso 6. Agregar 1 ml de etanol al 80%. Esperar 15 minutos para remover el exceso de CTAB. Invertir los tubos múltiples veces para que el etanol se absorba. Realizar de nuevo centrifugación a 12000 rpm por 3 minutos para precipitar el ADN. Eliminar el sobrenadante sin eliminar el pellet.

Paso 7. Invertir los tubos sobre papel toalla para eliminar las trazas de etanol que hayan quedado en el tubo.

7.3 Resuspensión

Paso 8. Resuspender el pellet de ADN en 100 μL de agua para PCR.

7.4 Chequeo de calidad y almacenamiento

Paso 9. Evaluar la **integridad** del ADN extraído en un gel de agarosa al 0.7%. La tinción de las bandas se realiza agregando Bromuro de etidio directamente en la preparación de agarosa.

Paso 10. Cuantificar el ADN extraído utilizando Espectrofotómetro NanoDrop ND-2000, Thermo Scientific o similar. La **pureza** del ADN se evalúa calculando las razones de absorbancia 260/280 y 260/230 (ver tabla N°1).

ANEXO 2

Protocolo de extracción de ADN mediante método Fenol cloroformo

Reactivos

- 0.2 M EDTA pH 8.0; 0.5% sodium lauroylsarcosin (SIGMA L-5125)
- 50 mM Tris HCl pH 8.0; 100 mM EDTA pH 8.0; 100 mM NaCl; 1% SDS
- Proteínasa K 20 mg / ml
- Solución saturada de NaCl (36g en 100 ml agua)
- RNAsa (libre de DNAsa) 20 mg/ml
- Fenol saturado básico pH 8.0
- Cloroformo: alcohol isoamílico (24:1)
- Etanol 92%
- Etanol 70%
- Buffer TE (10mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0) (¼ TE; ¾ Agua PCR)

Día 1

Paso 1. Agregar a cada tubo Eppendorff 375 µl de la Solución 1 y 10 ul de Proteínasa K

Paso 2. Agregar tejido a cada tubo (por ejemplo 70 mg músculo, 10 mg hígado), secar con un papel absorbente exceso de Etanol del tejido.

Paso 3. Agitar vigorosamente e incubar (baño de agua) durante la noche, con movimiento, a una temperatura de 37° C. O dejar por 2 a 4 horas a 55°

Día 2

Paso 4. Agregar 10 µl de RNAsa a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos e incubar por 60 minutos a una temperatura de 37° C.

Paso 5. Agregar 130 µl de NaCl saturado. Agitar vigorosamente.

Paso 6. Centrifugar 12.000 rpm por 2 minutos.

Paso 7. Trasladar sobrenadante a tubo limpio de 2 ml.

Paso 8. Agregar 400 µl de Fenol a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos y luego agitarla por 20 minutos.

Paso 9. Agregar 400 µl de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo. Agitar vigorosamente durante 10 segundos y luego agitarla por 20 minutos.

Paso 10. Centrifugar los tubos (Ej. 10.000 rpm) durante 5 minutos

Paso 11. Cuidadosamente remover 370 µl de la fase acuosa superior (usando una punta de micropipeta de boca ancha) a un tubo Eppendorff nuevo. Nota: No tocar el material de la interfase. Usar solo las fases acuosas libres de desechos residuales.

Paso 12. Agregar 900 µl de Etanol 92% frío. Mezclar mediante vigorosa inversión de los tubos 6 veces. El ADN debiera precipitar. Si no ocurre poner a -80°C por 1hr. Separar antes de 15 mins (de lo contrario pp también el EDTA)

Paso 13. Centrifugar 10 minutos a 12.000 rpm.

Paso 14. Extraer el Etanol volteando cuidadosamente el tubo.

Paso 15. Agregar 1000 µl de Etanol 70% frío.

Paso 16. Agitar suavemente durante 30 minutos.

Paso 17. Cuidadosamente extraer el Etanol volteando el tubo.

Paso 18. Cuidadosamente extraer el Etanol restante (100 μ l) usando una micropipeta.

Paso 19. Permitir que el ADN se seque parcialmente a temperatura ambiente (5 minutos),
NO permitir que se seque completamente.

ANEXO 3

Protocolo Extracción con Método Chelex

Paso 1. Dejar tubo donde está contenido el tejido a extraer por 30 minutos abierto para permitir que se evapore el etanol.

Paso 2. Agregar 600 ul de Chelex al 5% y dejar en baño maría a 100°C por 10 minutos.

Paso 3. Añadir 30 ul de proteinasa K y dejar en baño termorregulado por una hora a 55°C

Paso 4. Desactivar la enzima por 5 minutos a 90°C

Paso 5. Realizar centrifugado de la muestra durante 5 minutos a 10000 rpm

Paso 6. Tomar 200 ul del sobrenadante y llevarlo a un nuevo tubo

Paso 7. Añadir 500 ul de etanol al 70%

Paso 8. Centrifugar las muestras por 3 minutos a 10000 rpm

Paso 9. Resuspender el pellet en H₂O de PCR libre de nucleasas

ANEXO 4

Programa de PCR. Método PCR-HRM Multi-locus.

De acuerdo a Jilberto et al., 2017, la reacción de PCR fue optimizada en 96° C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 96° C por 15 segundos y 59° C por un minuto. La curva de análisis de melt final fue realizada desde los 55°C hasta los 95°C con incrementos de 0.2°C. La reacción contenía 0.2 mM de primera forward y reverse y una concentración final de ADN genómico de 20 ng en un volumen final de 8 uL. Las curvas de amplificación, las curvas de disociación y los análisis de curvas de HRM fueron realizados usando equipo MIC qPCR cyclers (bio molecular systems) y el programa micPCR v2.2.0.

ANEXO 5

Tabla S1. Genotipos de cada una de las muestras analizadas en la transferencia de laboratorio. Se muestran los resultados para cada uno de los SNPs del panel numerados del 1 al 10.

Muestra	SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	SNP 6	SNP 7	SNP 8	SNP 9	SNP 10
C1	AA	TT	CC	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C3	AA	TT	CC	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C14	AA	TT	CC	AA	GG	TT	AA	TT	0	AA
C17	AA	TT	CC	AA	GG	TT	AA	TT	CT	AA
C25	AA	TT	0	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C26	AA	TT	CT	AA	GG	CT	AA	TT	CC	AA
C27	AA	TT	CT	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C28	AA	TT	0	AA	GG	CC	AA	TT	CC	AA
C31	AA	TT	CT	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C33	AA	TT	CC	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C34	AA	TT	CC	AA	GG	TT	AA	TT	0	AA
C36	AA	TT	CC	AA	0	TT	AA	TT	CC	AA
C37	AA	TT	CT	0	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C41	AA	TT	0	0	0	CC	AA	TT	0	AA
C42	AA	TT	CT	AA	GG	TT	AA	TT	CT	AA
C43	AA	TT	CC	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C44	AA	TT	CT	AA	GG	CT	AA	TT	CC	AA
C46	AA	TT	CC	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C50	AA	TT	CC	AA	GG	TT	AA	TT	0	AA
C51	AA	TT	CC	AA	GG	TT	0	TT	CC	AA
C52	AA	TT	0	AA	GG	TT	AT	TT	0	AA
C54	AA	TT	CT	0	GG	CT	AA	TT	CC	AA
C55	AA	TT	CT	AA	GG	CT	AA	TT	CC	AA
C56	AA	TT	CC	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C57	AA	TT	CC	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C58	AA	TT	CT	AA	GG	CC	AA	TT	CC	AA
C59	AA	TT	CT	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C60	AA	TT	CT	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C61	AA	TT	0	AA	0	CT	AA	TT	0	AA
C62	AA	TT	0	AA	GG	CC	AA	TT	CC	AA

C63	AA	TT	CT	AA	GG	CT	AA	TT	CC	AA
C65	AA	TT	CT	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C66	AA	TT	CT	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C68	AA	TT	CT	0	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C69	AA	TT	CT	AA	GG	TT	AA	TT	0	AA
C70	AA	TT	CT	AA	0	TT	AA	TT	CC	0
C71	AA	TT	CT	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C72	AA	TT	CT	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C73	AA	TT	CT	AA	0	TT	AA	TT	CC	AA
C74	AA	TT	GG	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C76	AA	TT	GG	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C77	AA	TT	CT	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
C78	AA	TT	CT	AA	0	TT	TA	TT	CC	AA
C79	AA	TT	GG	AA	GG	TT	AA	TT	CC	AA
V1	AA	TT	CC	CT	AA	0	AA	TT	CC	AG
V2	AA	TT	CC	TT	AA	GG	AA	TT	CC	AA
V3	AA	TT	CT	CT	0	GG	AA	TT	CC	AA
V4	AA	TT	0	CT	AA	TT	AA	TT	CC	AA
V5	AA	TT	CC	TT	AA	0	AA	TT	CC	AA
V6	AA	TT	CC	CT	AA	GG	AA	TT	CC	AG
V7	AA	TT	CC	CT	AA	GG	AA	TT	CC	AA
V10	AA	TT	CC	CT	AA	0	AA	TT	CC	AA
V11	AA	TT	CC	TT	AA	GG	AA	TT	CC	AA
V12	AA	TT	CC	TT	AA	GG	AA	TT	CC	AA
V13	AA	TT	CC	CT	AA	0	AA	TT	CC	AA
V15	AA	TT	CC	TT	AA	GG	AA	TT	CC	AA
V17	AA	TT	CC	TT	AA	GG	AA	0	TT	AA
V18	AA	TT	CC	TT	AA	GG	AA	TT	TT	AA
V19	0	TT	CC	CT	AA	0	AA	TT	CC	AA
V20	0	TT	CC	TT	0	TT	AA	TT	CC	AG
R13	AA	TT	0	AA	P	TT	TT	TT	CC	AA
R14	AA	TT	CC	AA	P	TT	TT	TT	CC	AA
R15	AA	TT	CC	AA	P	CT	TT	TT	CC	AA
R20	AA	TT	CC	AA	P	CT	TT	TT	CC	AA
R23	AA	TT	CC	0	P	TT	TT	TT	CC	AA
R30	AA	TT	CC	AA	P	CT	AT	TT	CC	GG
R31	AA	TT	CC	AA	P	TT	TT	TT	CC	GG
R34	AA	TT	CC	AA	P	CT	TT	TT	CC	GG
R36	AA	TT	CC	AA	P	TT	TT	GT	CC	GG
R40	AA	TT	CC	AA	P	TT	TT	TT	CC	GG

R41	AA	TT	TT	AA	P	CT	TT	TT	CC	AG
R45	AA	TT	CC	AA	P	CT	TT	TT	CC	GG
R46	AA	TT	CC	AA	P	TT	TT	TT	CC	AA
R47	AA	TT	CC	AA	P	TT	TT	TT	CC	AA
R50	AA	TT	CC	AA	P	CC	TT	TT	CC	AA
R62	AA	TT	CC	AA	P	CT	TT	TT	CC	AA
R63	AA	TT	CC	AA	P	CT	TT	TT	CC	GG
R65	AA	TT	CC	AA	P	CT	TT	TT	CC	AA
R67	AA	TT	CC	AA	0	TT	TT	TT	CC	GG
R35	AA	TT	CC	AA	P	CT	TT	TT	CC	GG
R37	AA	TT	CC	AA	P	CC	TT	TT	CC	GG
R43	AA	TT	CC	AA	P	TT	TT	TT	CC	GG
R66	AA	TT	CC	AA	P	TT	TT	TT	CC	GG
H3	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GT	CT	AA
H5	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GT	TT	AG
H8	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	TT	CC	GG
H10	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GT	TT	GG
H11	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	TT	CT	GG
H13	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AA	GT	TT	AG
H18	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	TT	CT	AG
H19	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AA	GT	CT	AG
H22	AA	TT	TT	AA	0	CC	AA	GG	CT	AA
H23	AA	TT	TT	AA	TT	CC	TT	TT	CC	AG
H24	AA	TT	TT	AA	TT	CC	TT	GT	TT	AG
H26	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GT	TT	0
H27	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AA	TT	TT	AA
H28	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GT	CC	0
H30	AA	TT	TT	AA	TT	CC	TT	GT	CT	GG
H31	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AA	GT	CC	AA
H32	AA	TT	TT	AA	TT	TT	AA	GT	TT	GG
H33	AA	TT	TT	AA	TT	TT	TT	GT	TT	AG
H34	AA	TT	TT	AA	TT	TT	AA	GT	TT	AG
H39	AA	TT	TT	AA	TT	TT	AA	GT	TT	AG
H40	AA	TT	TT	AA	TT	CC	TT	GT	TT	GG
H42	AA	TT	TT	AA	TT	CC	TT	GG	CC	GG
H43	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AA	GT	CT	GG
H45	AA	TT	TT	AA	TT	CC	0	TT	CT	AG
H48	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GT	0	AG
H49	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GG	TT	AG
H50	AA	TT	TT	AA	TT	CC	TT	GG	TT	AG

H51	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	TT	CC	AG
H52	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GT	TT	AG
H53	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GG	TT	AG
H54	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GG	0	GG
H55	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GG	TT	GG
D2	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GT	TT	AG
D3	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GT	TT	AG
D4	AA	TT	TT	AA	TT	CC	TT	TT	TT	AG
D5	AA	TT	0	AA	TT	CC	TT	GT	TT	?
D6	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GT	CC	?
D7	AA	TT	TT	AA	TT	CC	TT	GT	TT	GG
D8	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GT	TT	AG
D9	AA	TT	TT	AA	0	0	AT	GT	TT	GG
D10	AA	TT	TT	AA	0	CC	AT	GT	TT	AG
D11	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GG	TT	?
D12	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AT	GG	CC	AG
D13	AA	TT	TT	AA	TT	CC	AA	GT	TT	AG
VACA26	GG	GG	TT	GG	0	TT	TT	TT	CC	AA
VACA27	GG	0	TT	GG	0	CC	TT	TT	CC	AA
VACA28	GG	GG	TT	GG	0	TT	TT	TT	CC	AA
VACA29	GG	GG	TT	0	0	TT	TT	TT	CC	AA
VACA30	GG	GG	TT	0	0	TT	TT	TT	CC	AG
VACA31	GG	GG	TT	GG	0	CT	AT	TT	CT	AA
VACA32	GG	GG	TT	0	0	CT	TT	TT	CC	AA
VACA33	GG	GG	TT	GG	0	CT	AT	TT	CC	AA
VACA34	GG	GG	TT	0	0	CC	0	TT	CC	AA
VACA35	GG	GG	TT	GG	0	CC	0	TT	CT	AA
VACA36	GG	GG	TT	GG	0	CT	0	TT	CC	0
VACA37	GG	GG	TT	0	0	CC	AT	TT	CC	AG
VACA38	GG	GG	TT	0	0	CC	TT	TT	CC	AA
VACA39	GG	GG	TT	0	0	CT	TT	TT	CC	AA
VACA40	GG	GG	TT	GG	0	CC	TT	TT	CC	AA
VACA41	GG	0	TT	0	0	0	0	TT	TT	AG
VACA42	GG	GG	TT	0	0	CC	TT	TT	CC	AA
VACA43	0	GG	TT	0	0	CT	TT	TT	CC	AG
VACA44	0	GG	TT	0	0	CC	AT	TT	CC	AA
VACA45	GG	0	TT	0	0	CC	AT	TT	CC	AA
VACA46	GG	GG	TT	GG	0	CC	AA	TT	CC	AA
VACA47	AG	GG	TT	GG	0	CT	TT	TT	CC	AA
VACA48	GG	GG	TT	GG	0	CC	AA	TT	CC	GG

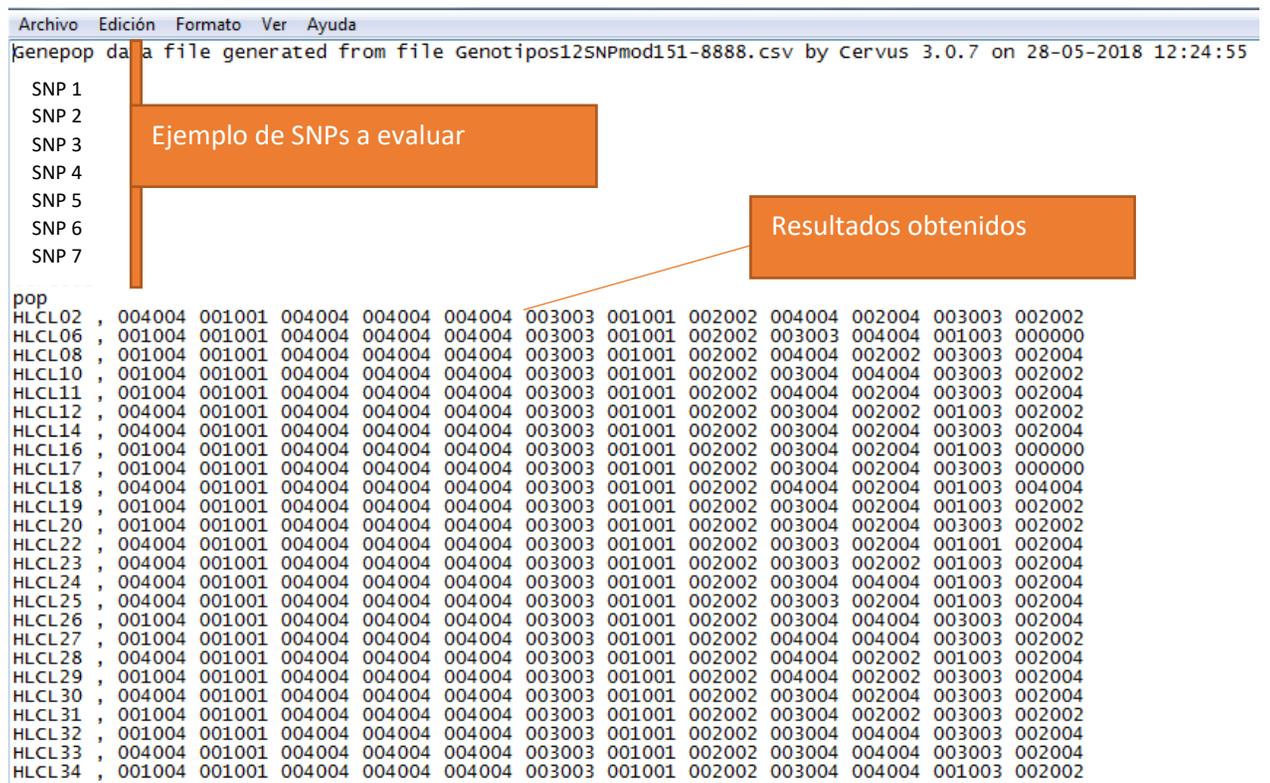
VACA49	GG	GG	TT	GG	0	CT	TT	TT	CC	AA
VACA50	GG	GG	TT	GG	0	CC	TT	TT	CT	AA
VACA51	GG	GG	TT	GG	0	CT	TT	TT	CC	AA
VACA52	AG	GG	TT	GG	0	CC	TT	TT	CC	AA
VACA53	GG	GG	TT	AA	0	TT	TT	TT	CC	AA
VACA54	GG	GG	TT	GG	0	TT	TT	TT	CC	AA
VACA55	GG	GG	TT	0	0	CT	AA	TT	CC	AA
VACA56	AG	GG	TT	GG	0	CC	AA	TT	CC	GG
VACA57	AG	GG	TT	0	0	CT	TT	TT	CC	AG
VACA60	GG	GG	TT	0	0	CC	TT	TT	CC	GG
VACA61	GG	GG	TT	GG	0	CC	TT	TT	CT	GG
VACA62	GG	GG	TT	GG	0	CC	AA	TT	GG	0
VACA63	GG	GG	TT	0	0	CT	AA	TT	CC	GG
VACA64	GG	GG	TT	0	0	CT	AA	TT	CC	GG
VACA65	GG	GG	TT	0	0	CC	TT	TT	CC	AA
VACA66	AG	GG	TT	GG	0	TT	TT	TT	CC	GG
VACA67	AG	GG	TT	GG	0	CT	TT	TT	CT	GG
VACA68	GG	GG	TT	GG	0	CT	TT	TT	CC	AA
VACA69	GG	GG	TT	GG	0	CC	TT	TT	CC	GG
VACA70	AG	GG	TT	GG	0	CT	TT	TT	CT	GG
VACA71	AG	GG	TT	0	0	CC	TT	TT	CT	AA
CHM101	0	0	TT	0	0	CC	AA	0	0	AA
CHM102	0	0	0	0	TT	CC	0	0	0	AA
CHM104	0	0	0	0	0	CC	0	0	0	AA
CHM105	0	0	0	0	0	CC	AA	0	0	AA
CHM107	0	0	0	0	0	CC	AA	0	0	AA
CHM109	0	0	0	0	0	CC	AA	0	0	AA
CHM110	0	0	0	0	0	CC	AA	0	0	AA
CHM111	0	TT	0	0	0	CC	AA	0	0	AA
AA81	0	0	0	0	0	0	AA	0	0	0
AA82	0	0	0	0	0	0	AA	0	0	0
AA83	0	0	0	0	0	0	AA	0	0	0
AA85	0	0	0	0	0	0	AA	0	0	AA
AA88	0	0	0	0	0	0	AA	0	0	AA
AA89	0	0	0	0	0	CC	AA	0	0	AA
AA90	0	0	0	0	0	0	AA	0	0	0
AA91	0	0	0	0	0	0	TT	0	CC	0
CH1	0	TT	0	0	0	0	TT	0	CC	AA
CH4	0	TT	0	0	0	0	TT	0	CC	AA
CH5	0	0	0	0	0	0	TT	0	CC	AA

CH10	0	0	0	0	0	0	TT	0	CC	0
CH11	0	0	0	0	0	0	TT	0	CC	0
CH12	AA	0	0	0	0	0	TT	0	CC	0
CH16	0	0	0	0	0	0	TT	0	CC	0
CH19	0	0	0	0	0	0	TT	0	CC	0
CH22	0	0	0	0	0	0	TT	0	CC	0
CH25	0	0	0	0	0	0	TT	0	CC	0
CH26	0	0	0	0	0	0	TT	0	CC	0
CH31	0	0	CC	0	0	0	TT	0	CC	AA
CH32	0	TT	0	0	0	0	TT	0	CC	AA
CH33	AA	0	0	0	0	0	TT	0	0	AA
CH34	AA	TT	0	0	0	0	TT	0	CC	0
CH35	AA	TT	0	0	0	0	TT	0	CC	AA
CH36	0	0	0	0	0	0	TT	0	0	AA
CH37	AA	TT	0	0	0	0	TT	0	CC	AA
CH43	AA	TT	0	0	0	0	TT	0	CC	0

ANEXO 6

Procedimiento para realizar asignación de genotipos para individuos del género mytilus por Genepop 2.0.

1. Realizar tabla con los valores de resultados obtenidos a partir de los genotipos como se indica en la tabla N° 2.



Archivo Edición Formato Ver Ayuda

Genepop data file generated from file Genotipos12SNPmod151-8888.csv by Cervus 3.0.7 on 28-05-2018 12:24:55

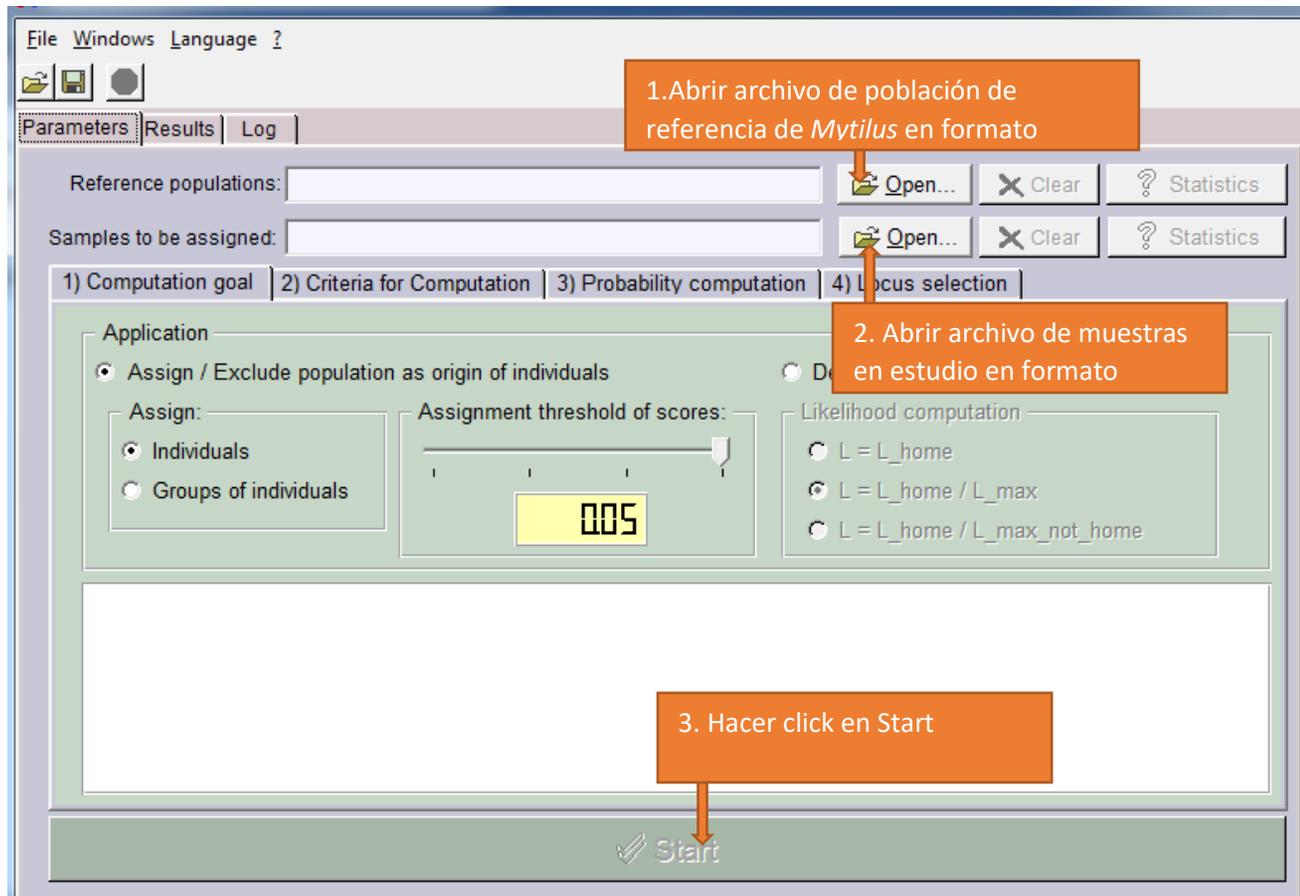
SNP 1
SNP 2
SNP 3
SNP 4
SNP 5
SNP 6
SNP 7

Ejemplo de SNPs a evaluar

Resultados obtenidos

pop	004004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	004004	002004	003003	002002
HLCL02	, 004004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	004004	002004	003003	002002
HLCL06	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003003	004004	001003	000000
HLCL08	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	004004	002002	003003	002004
HLCL10	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	004004	003003	002002
HLCL11	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	004004	002004	003003	002004
HLCL12	, 004004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	002002	001003	002002
HLCL14	, 004004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	002004	003003	002004
HLCL16	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	002004	001003	000000
HLCL17	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	002004	003003	000000
HLCL18	, 004004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	004004	002004	001003	004004
HLCL19	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	002004	001003	002002
HLCL20	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	002004	003003	002002
HLCL22	, 004004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003003	002004	001001	002004
HLCL23	, 004004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003003	002002	001003	002004
HLCL24	, 004004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	004004	001003	002004
HLCL25	, 004004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003003	002004	001003	002004
HLCL26	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	004004	003003	002004
HLCL27	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	004004	004004	003003	002002
HLCL28	, 004004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	004004	002002	001003	002004
HLCL29	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	004004	002002	003003	002004
HLCL30	, 004004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	002004	003003	002004
HLCL31	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	002002	003003	002002
HLCL32	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	004004	003003	002004
HLCL33	, 004004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	004004	003003	002004
HLCL34	, 001004	001001	004004	004004	004004	003003	001001	002002	003004	004004	001003	002002

2. Ingresar los archivos de “población de referencia para el género *Mytilus*” y el archivo de muestras analizadas, ambos en formato Genepop.



3. Ejemplo de resultados obtenidos una vez ejecutada la comparación entre los resultados obtenidos y la población de referencia.

INRA / CIRAD -- GeneClass2.0.h -- 02-aug-2005

File Windows Language ?

Parameters Results Log

Quality index: 100.00 %
 Correctly assigned: 100.0 % (136)

Number of scores to display: 1 Print... Export...

Assigned sample	rank	score	VACA70	Nb. of loci	Used loci
1		%	log(L)		
/HLCL02	VACA70	100.000	6.709	12	
/HLCL06	VACA70	100.000	6.951	11	
/HLCL08	VACA70	100.000	6.156	12	
/HLCL10	VACA70	100.000	8.199	12	
/HLCL11	VACA70	100.000	6.521	12	
/HLCL12	VACA70	100.000	6.194	12	
/HLCL14	VACA70	100.000	7.120	12	
/HLCL16	VACA70	100.000	4.799	11	
/HLCL17	VACA70	100.000	5.505	11	
/HLCL18	VACA70	100.000	6.347	12	
/HLCL19	VACA70	100.000	6.515	12	
/HLCL20	VACA70	100.000	7.221	12	
/HLCL22	VACA70	100.000	7.493	12	
/HLCL23	VACA70	100.000	7.223	12	
/HLCL24	VACA70	100.000	7.393	12	

ANEXO 7

Tabla S2. Genotipos obtenidos para cada una de las muestras analizadas para establecer la aplicabilidad del método PCR HRM multi-locus utilizando diferentes matrices comerciales.

Muestra	SNP 1	SNP 2	SNP 3	SNP 4	SNP 5	SNP 6	SNP 7	SNP 8	SNP 9	SNP 10
EMYMDE 7	0	AA	0	0	0	0	0	0	0	0
EMYMDE 8	AT	AA	0	0	TT	0	CT	GT	CT	0
EMYMDE 9	0	AA	TT	CC	0	0	CT	TT	CC	AG
NISMES 2	AA	AA	TT	CT	0	AA	CT	TT	CC	AA
NISMES2	AA	0	TT	CC	GG	AA	CT	TT	CC	AA
NISMES 4	AA	AA	TT	CT	GG	0	CT	0	CC	AA
AANMCL 11	0	0	TT	0	0	0	CC	0	CT	AG
AANMCL12	AT	AA	TT	TT	TT	AA	CC	TT	CC	AG
AANMCL 13	AT	AA	TT	TT	0	AA	CC	0	0	AG
ORCMCL 7	AT	AA	TT	TT	TT	AA	CC	GT	TT	0
ORCMCL 8	AT	AA	TT	TT	TT	AA	CC	GT	CC	AG
ORCMCL 9	AT	AA	TT	TT	TT	AA	CC	GT	TT	0
ETAMCL 4	AT	GG	TT	0	0	0	CC	0	0	0
ETAMCL 3	AT	GG	TT	0	0	0	CC	0	0	0
ETAMCL 2	0	GG	0	0	0	0	CC	0	0	0
ARCMCL 7	AT	AA	TT	TT	TT	AA	CC	0	CT	AG
ARCMCL 8	AT	GG	TT	TT	TT	0	CC	GT	CT	0
ARCMCL 9	AT	GG	TT	TT	TT	AA	CC	TT	CT	AG
OBIMDK 3	0	AA	TT	0	0	0	CC	0	0	0
OBIMDK 4	0	AA	TT	0	0	0	CC	0	0	0
OBIMDK 5	AA	AA	TT	0	0	0	CC	0	0	AG
NSJMCL 7	AT	AA	TT	TT	TT	AA	CC	GG	CT	AG
NSJMCL 8	AT	AA	TT	TT	TT	AA	CC	GG	CT	AG
NSJMCL 9	AT	AA	TT	TT	TT	AA	CC	GG	CT	AG
NMYMDE 19	AT	AA	TT	CC	0	0	CT	TT	CC	AA
NMYMDE 20	AT	AA	TT	CC	0	AA	CT	TT	CC	AA
NMYMDE 21	0	AA	TT	CC	POL	AA	CT	TT	CC	AA
ECAMES 2	0	AA	TT	0	0	0	CC	0	0	AG
ECAMES 3	0	AA	TT	0	0	0	CC	0	0	AG
ECAMES 4	AA	AA	TT	0	TT	0	CC	TT	CT	AG
OCOMES 2	0	AA	TT	CT	0	AA	TT	TT	CC	AA
OCOMES 3	0	AA	TT	0	GG	AA	TT	TT	CT	AA
OCOMES 4	AA	AA	TT	CT	GG	0	CT	TT	CC	AA
CONGELADO 1	AT	AA	TT	TT	TT	AA	CC	TT	CT	AG
CONGELADO 2	AT	AA	TT	TT	TT	AA	CC	TT	CT	AG
CONGELADO 3	AA	AA	TT	TT	0	AA	CC	0	CT	AG

ANEXO 8

Tabla S3. Resultados de parámetros de calidad para método fenol cloroformo. Se presenta el promedio y le desviación estándar (SV) de los resultados para la concentración y los parámetros 260/280 y 260/230.

Muestra	Concentración (ng/ul)	260/280	260/230
EMYMDE 7	810,6	1,74	1,67
EMYMDE 8	540,4	1,77	1,48
EMYMDE 9	800	1,43	1,29
NISMES 2	593	1,79	1,23
NISMES 3	601,5	1,78	1,24
NISMES 4	404,9	1,72	1,21
AANMCL 11	1044,7	1,83	1,46
AANMCL 12	675,6	1,81	1,44
AANMCL 13	842,6	1,81	1,42
VACA 17	866,2	1,66	1,43
VACA 7	541,7	1,82	1,26
VACA 6	394	1,78	1,31
ORCMCL 7	949	1,89	1,33
ORCMCL 8	1011,5	1,84	1,32
ORCMCL 9	190,5	1,92	2,19
ETAMCL 4	2204,6	1,93	1,89
ETAMCL 3	2066,1	1,89	1,82
ETAMCL 2	1890,3	1,92	1,76
ARCMCL 7	857,4	1,81	1,31
ARCMCL 8	547,1	1,82	1,22
ARCMCL 9	630,2	1,81	1,16
OBIMDK 3	341,4	1,67	1,28
OBIMDK 4	443,5	1,76	1,44
OBIMDK 5	293	1,62	1,23
NSJMCL 7	610,5	1,81	1,39
NSJMCL 8	741,5	1,65	1,28
NSJML 9	665,5	1,68	1,33
NMYMDE 19	507,1	1,86	1,54
NMYMDE 20	446,6	1,73	1,37
NMYMDE 21	795,7	1,59	1,39
ECAMES 2	1160,7	1,74	1,73
ECAMES 3	1492,7	1,78	1,67
ECAMES 4	1145,7	1,78	1,73
OCOMES 2	889,4	1,72	1,34
OCOMES 3	907	1,65	1,29
OCOMES 4	508,8	1,81	1,47
C 39	1340,3	1,95	1,63
C 37	925,3	1,7	1,44
C 38	373,1	1,76	0,91
R 24	1016,7	1,71	0,99
R 25	989,3	1,76	0,85
R 23	1155,1	1,84	1,4
HLCL 44	703,2	1,82	1,49
HLCL 45	665,3	1,71	1,48
HLCL 46	890,1	1,8	1,43
CONGELADO 1	1412,1	1,79	1,06
CONGELADO 2	1053,4	1,63	1,1
CONGELADO 3	72,8	1,88	1,87
PROMEDIO	833,5	1,77	1,41
SV	443,9	0,10	0,26

ANEXO 9

Tabla S4. Resultados de parámetros de calidad para método CTAB. Se presenta el promedio y la desviación estándar (SV) de los resultados para la concentración y los parámetros 260/280 y 260/230

Muestra	Concentración (ng/ul)	260/280	260/230
EMYMDE 7	0	0,05	0,02
EMYMDE 8	63,8	1,88	2,3
EMYMDE 9	78,6	1,84	2,11
NISMES 2	151,9	1,87	2,27
NISMES 3	236	1,85	2,26
NISMES 4	289,8	1,86	2,24
AANMCL 11	70,1	1,79	2,22
AANMCL 12	107,2	1,8	2,1
AANMCL 13	14,7	1,68	2,14
VACA 17	-5,2	0,84	0,78
VACA 7	350	1,91	2,16
VACA 6	262,6	1,91	2,33
ORCMCL 7	186,2	1,88	2,31
ORCMCL 8	121,4	1,87	2,41
ORCMCL 9	185,2	1,88	2,4
ETAMCL 4	364,5	2,03	2,26
ETAMCL 3	390,7	2,04	2,39
ETAMCL 2	526,9	2,06	2,28
ARCMCL 7	110,4	1,87	2,36
ARCMCL 8	97,1	1,85	2,3
ARCMCL 9	116,8	1,87	2,39
OBIMDK 3	20	1,69	1,5
OBIMDK 4	87,4	1,93	2,24
OBIMDK 5	119,3	1,95	2,11
NSJMCL 7	87,5	1,9	2,32
NSJMCL 8	110,3	1,83	2,34
NSJML 9	121,8	1,83	2,25
NMYMDE 19	141,6	1,87	2,36
NMYMDE 20	87	1,81	2,22
NMYMDE 21	120,3	1,85	2,39
ECAMES 2	91,4	1,91	2,07
ECAMES 3	11,3	1,83	1,61
ECAMES 4	47,3	1,84	1,53
OCOMES 2	70,7	1,84	1,94
OCOMES 3	13,4	1,7	1,17
OCOMES 4	155,9	1,55	0,79
C 39	522,6	2,02	2,39
C 37	273,5	1,98	2,23
C 38	263,4	2	2,31
R 24	153,6	1,86	1,74
R 25	60,4	1,74	1,06
R 23	799	1,9	2,37
HLCL 44	1028,2	1,4	1,46
HLCL 45	1457,8	2,08	2,41
HLCL 46	825,9	2	2,37
CONGELADO 1	261,1	1,91	1,98
CONGELADO 2	200,1	1,93	2,28
CONGELADO 3	509,3	1,65	1,71
PROMEDIO	236,6	1,8	2,0
SV	285,4	0,3	0,5

ANEXO 10

Tabla S5. Resultados de parámetros de calidad para método Chelex. Se presenta el promedio y la desviación estándar (SV) de los resultados para la concentración y parámetros 260/280 y 260/230.

Muestra	Matriz	Concentración (ng/ul)	260/280	260/230
ARCMCL 3	En Aceite	1145,5	1,28	0,45
ARCMCL 4	En Aceite	798,3	1,23	0,42
Fresco 1	Fresco	19,8	0,22	0,04
Fresco 2	Fresco	44,3	0,49	0,09
ORCMCL 17	Otros	290,4	1,08	0,46
ORCMCL 16	Otros	260,1	1,07	0,44
ETAMCL 2	Marinado	816	1,19	0,43
ETAMCL 3	Marinado	885	1,3	0,51
NSJMCL 1	Natural	674,7	1,2	1,06
NSJMCL 2	Natural	303,3	1,08	0,47
	Promedio	523,7	1,0	0,4
	SV	388,3	0,4	0,3