

Nota Científica

Autenticación de lapas del género *Fissurella* (Mollusca: Vetigastropoda) en la costa chilena, mediante PCR-RFLP*

Alberto Olivares-Paz^{1,2}, Javier Quinteiro² & Manuel Rey-Méndez²

¹Departamento de Acuicultura, Facultad de Recursos del Mar, Universidad de Antofagasta
Casilla 170, Antofagasta, Chile

²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Biología
Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, España

RESUMEN. Las lapas, clasificadas en el género *Fissurella*, se explotan desde tiempos prehistóricos en la costa chilena. Las diversas especies de lapas presentan diferencias en la consistencia o dureza del músculo y en cualidades organolépticas, por ello son distintamente valoradas por los consumidores. La ausencia o desconocimiento de los caracteres morfológicos diagnósticos, en algunas presentaciones del recurso, fraudes en el etiquetado o designación y la sobreexplotación de este recurso, demanda una metodología de identificación de cada especie. Este método garantizaría el correcto etiquetado de los productos comerciales y sería de utilidad en la gestión pesquera. Así, se diseñó un protocolo de PCR-RFLP que permite la identificación de diferentes especies de *Fissurella*, teniendo en cuenta incongruencias entre la taxonomía actual del género y los datos genéticos. La digestión de productos de PCR, con dos enzimas de restricción específicas (*HpyCH4 V* y *Nla III*), genera patrones específicos de restricción, los cuales permitirán identificar con precisión las diversas especies en cualquier fase de su comercialización y de su ciclo biológico.

Palabras clave: lapas, *Fissurella*, PCR-RFLP, autenticación, Chile.

Authentication of *Fissurella* species (Mollusca: Vetigastropoda), harvested in the Chilean coast, by PCR-RFLP*

ABSTRACT. Keyhole limpets, belonging to the *Fissurella* genus, have been harvested along the Chilean coast since prehistoric times. Exploited species show differences in tissue consistency and organoleptic features, and so are differently appreciated by consumers. The absence of morphological diagnostic characters in some food products elaborated using limpets, fraudulent commercial labeling or designation, and the overexploitation of this marine resource, suggest the need for a species identification methodology. The method would be a tool to guarantee the correct labeling of commercial products and for future fishery management purposes. A PCR-RFLP protocol, using two restriction enzymes (*HpyCH4 V* and *Nla III*) allowed species identification within the *Fissurella* genus along Chilean coast, suggesting incongruence between classical taxonomy and genetic data. The specific restriction patterns are expected to be useful for species authentication in commercial products and for species identification in any phase of the life-cycle of *Fissurella* species.

Key words: keyhole limpets, *Fissurella*, PCR-RFLP, authentication, Chile.

Autor corresponsal: Manuel Rey-Méndez (bnreymen@usc.es)

Los especímenes de mayor tamaño del género *Fissurella* (Mollusca: Vetigastropoda) habitan la zona litoral costera de Chile (18,4°-56,0°S) (Bretos & Chihuailaf, 1993). Llamadas popularmente lapas o

chapas, desde tiempos prehistóricos han formado parte de la dieta humana (Jerardino *et al.*, 1992; Gaete *et al.*, 2004). Actualmente, de las 13 especies validadas (McLean, 1984), 10 de ellas (*F. latimarginata*, *F.*

* Trabajo presentado en el XXV Congreso de Ciencias del Mar de Chile y XI Congreso Latinoamericano de Ciencias del Mar (COLACMAR), realizados en Viña del Mar, entre el 16 y 20 de mayo de 2005.

cumingi, *F. pulchra*, *F. bridgesii*, *F. costata*, *F. nigra*, *F. picta*, *F. maxima*, *F. crassa* y *F. limbata*) forman una pesquería multiespecífica, con la denominación genérica *Fissurella* spp. (Bretos, 1988). Además, *F. oriens* y *F. radiosa* se consumen en las localidades donde son extraídas. Por el contrario, *F. peruana* es de tamaño pequeño (máximo 30 mm) y no se extrae para fines de consumo ni para su comercialización.

Las distinciones entre las especies están fundamentadas en caracteres morfológicos, morfométricos y patrones de coloración de la concha, pie, manto y cabeza, los cuales a veces suelen ser parecidos entre organismos de especies diferentes (McLean, 1984; Oliva & Castilla, 1992; Guzmán *et al.*, 1998). También, los caracteres distintivos están enmascarados o deteriorados por los organismos epibiontes y la coloración del cuerpo se pierde después que el organismo ha sido extraído (Olivares *et al.*, 1998). Todo esto, frecuentemente, dificulta distinguir las diferentes especies.

En la última década se ha extraído un promedio anual de 2.939 ± 585 ton de *Fissurella* spp. y desde el año 2000, menos del 10% del desembarque pesquero se ha desglosado con las denominaciones vernaculares de lapa negra, reina y rosada, las cuales corresponden a las especies *F. latimarginata*, *F. maxima* y *F. pulchra* o *F. cumingi*, respectivamente (Bretos, 1988; Osorio, 2002; SERNAPESCA, 2003). Parte de la comercialización se realiza directamente al público como producto fresco entero y fresco desconchado eviscerado; pero mayoritariamente se destina a la industria pesquera, la cual procesa el músculo del pie en la forma de fresco refrigerado, congelado y en conserva (Osorio, 2002). El procesamiento industrial implica la pérdida total de los caracteres de las especies, resultando imposible su distinción.

El consumidor tiene preferencias particulares por algunas especies, respecto de otras, ya sea por el rendimiento de carne, consistencia o cualidades organolépticas del pie muscular; todo lo cual ha generado una sobreexplotación de algunas especies (Bretos, 1988; Olivares *et al.*, 1998; Oliva & Castilla, 1992) y conlleva la tendencia a expender suplantando el nombre de las lapas de mayor precio por parte de los consumidores.

El presente trabajo da a conocer una metodología de PCR-RFLP (Polimerasa Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism) que permite la autenticación de las especies del género *Fissurella*, actualmente explotadas en Chile, la cual fue diseñada según las secuencias mitocondriales descritas

previamente para las especies. Además, se presenta la incongruencia entre los resultados de la metodología y la clásica asignación de especies, descritas a partir de los variables y pocos precisos caracteres morfológicos, para la exhaustiva identificación de algunas especies.

A ejemplares de todas las especies de *Fissurella* (N = 4 a 18, por especie), excepto *F. peruana*, se aisló ADN a partir de tejido muscular del pie, mediante el uso del kit DNeasy Tissue (Qiagen). Un fragmento de 410 pb (pares de bases), localizado en el gen mitocondrial citocromo b, fue amplificado mediante PCR con los cebadores UCYTB151F y UCYTB272R (Merritt *et al.*, 1998). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 30 μ L conteniendo Promega Buffer x 1, 2,5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,1 μ M de cada cebador, 0,025 U/I de Taq DNA polimerasa (Promega) y 0,5 μ L de DNA total. Las condiciones de PCR consistieron en un paso de desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C, fusión a 50°C y extensión a 72°C por 20, 30 y 60 s, respectivamente, más una extensión final a 72°C por 5 min. El producto de la amplificación y digestión fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa, visualizándolo en transiluminador de luz ultravioleta.

La detección de sitios polimórficos localizados dentro de dianas de enzimas de restricción comerciales, se realizó analizando las secuencias depositadas para las especies en el GenBank/EMBL/DDBJ (Números de acceso: AY940884-AY940976), mediante el programa BioEdit version 7.0.1 (Hall, 1999). Se seleccionaron las enzimas *Nla* III (CATG') y *Hpy*CH4 V (TG'CA) (isosquízómero: *Cvi*R I) (NEB). La digestión del producto de PCR fue llevada a cabo en volúmenes de reacción de 20 μ L conteniendo Buffer IV (NEB) y 5 unidades de las enzimas *Hpy*CH4 V y *Nla* III (NEB), con incubación a 37°C durante 4 horas.

El fragmento amplificado del gen mitocondrial Citocromo b contiene 410 pares de bases, cebadores incluidos. Las enzimas *Hpy*CH4 V y *Nla* III detectan varios sitios polimórficos, generando patrones de restricción específicos para las especies: *F. pulchra*, *F. radiosa*, *F. crassa*, *F. nigra*, *F. limbata*, *F. maxima*. Las especies *F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens*, *F. bridgesii* comparten un patrón similar entre sí y diferente al de las otras especies. De igual manera, las especies *F. costata* y *F. picta* presentan idénticos fragmentos de restricción (Fig. 1).

El grupo de *F. latimarginata*, presenta dianas de

restricción únicamente para la enzima *Hpy*CH4 V, originando cuatro fragmentos que constituyen el patrón de restricción A. Las otras especies, *F. pulchra*, *F. radiosa*, *F. crassa*, *F. nigra*, *F. limbata* y el grupo de *F. costata* / *F. picta* presentan los patrones B, C, D,

E, F y C, respectivamente. En el caso del patrón C, algunos de los individuos morfológicamente clasificados como *F. costata* y *F. picta*, pueden presentar una variante del patrón (C^a) debido a la ausencia de corte del nucleótido 379, debido a una mutación

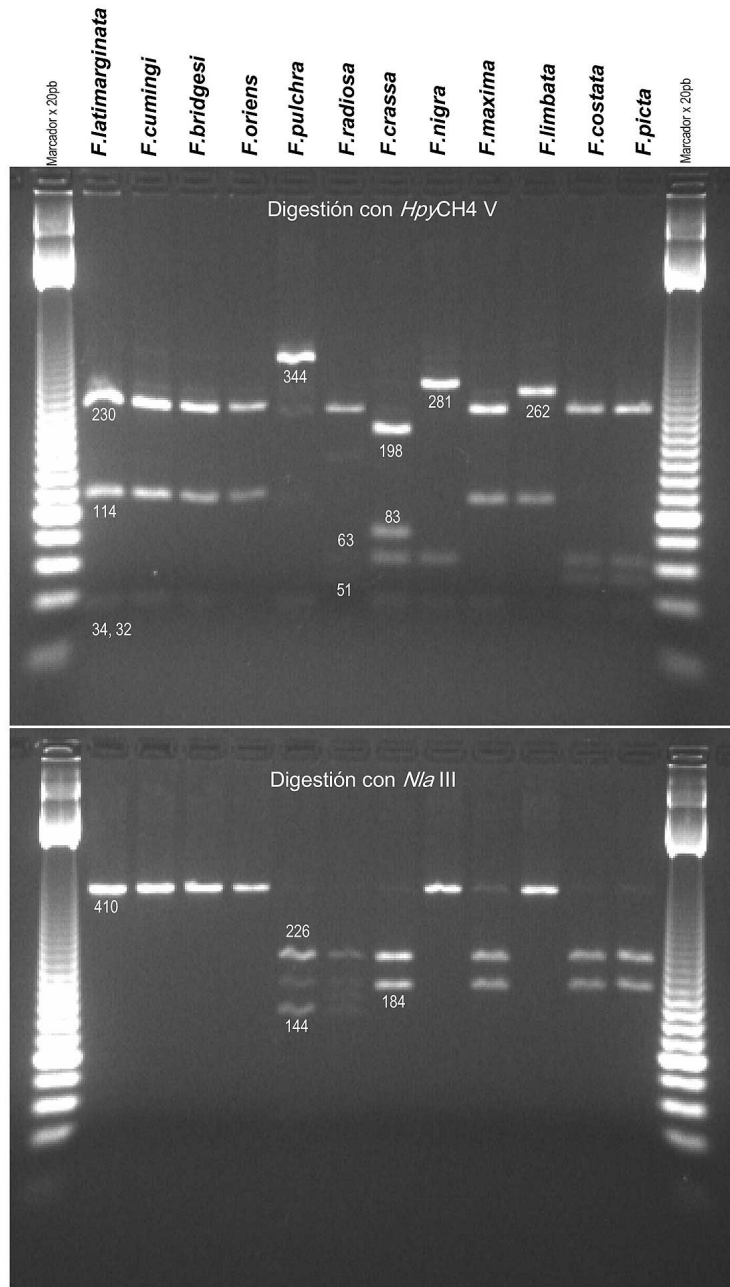


Figura 1. Geles de agarosa mostrando los perfiles de restricción tras la digestión, del producto de PCR situado en el citocromo b, con las enzimas *Hpy*CH4 V y *Nla* III.

Figure 1. Agarose gel showing the restriction profiles observed after digestion of Cytochrome b PCR product with enzymes *Hpy*CH4 V y *Nla* III.

puntual en el seno de la diana de restricción. Con la enzima *HpyCH4 V*, *F. maxima* presenta un patrón idéntico al del grupo de *F. latimarginata* (A). Sin embargo, tras la digestión con *Nla III* se obtiene un patrón (B) diferente al presentado por el grupo de *F. latimarginata* (sin corte, O). Para esta enzima, *Nla III*, se distinguen tres patrones de restricción, O (sin corte), A y B. En el caso de *F. limbata* y para esta segunda enzima, se ha observado, en algunos individuos, la falta del punto de corte situado en la base 185, pudiendo obtenerse los patrones O y B, sin embargo el patrón F, obtenido con la enzima *HpyCH4 V*, permite la diferenciación de esta especie, presentando un patrón combinado FO/FB (Tabla 1).

La selección de estas enzimas se ha llevado a cabo procurando la ausencia de sitios polimórficos intraes-

pecíficos en las dianas, crítica para la identificación de las especies (Quinteiro *et al.*, 1998), permitió la generación de patrones fácilmente diferenciables. El protocolo se puede realizar en una única reacción, ya que ambas enzimas (*HpyCH4 V* y *Nla III*) utilizan el buffer IV de NEB a la misma temperatura de incubación (37°C); aunque el uso exclusivo de BSA, en *Nla III* requiere un ajuste de las condiciones de reacción, acompañada de elevada resolución, preferentemente en geles de acrilamida, de los patrones más complejos en el caso de una digestión combinada.

El producto de PCR, con un tamaño de 410 pb, es obtenible a partir de tejidos extraídos de productos frescos o congelados. Incluso, a partir de tejidos en conservas, donde han sufrido un importante tratamiento térmico, se obtiene ADN con la suficiente

Tabla 1. Recopilación de los cortes producidos y de los fragmentos generados tras la digestión, del producto de PCR situado en el citocromo b, con las enzimas *HpyCH4 V* y *Nla III*. A a F: patrones de restricción.

Table 1. Restriction patterns estimated after digestion of Cytochrome b PCR product with enzymes *HpyCH4 V* and *Nla III*. A to F: restriction profiles.

Especie	Enzima			
	<i>HpyCH4 V</i> (CviRI)		<i>Nla III</i>	
	Sitios de corte TG'CA	Tamaño fragmentos originados (pb) ^b	Sitios de Corte CATG'	Fragmentos originados (pb) ^b
<i>F. latimarginata</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	-	- (O)
<i>F. cumingi</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	-	- (O)
<i>F. bridgesi</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	-	- (O)
<i>F. oriens</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	-	- (O)
<i>F. pulchra</i>	35, 379	32, 34, 344 (B)	145, 185	40, 144, 226 (A)
<i>F. radiosa</i>	35, 98, 149, 379	32, 34, 63, 51, 230 (C)	145, 185	40, 144, 226 (A)
<i>F. crassa</i>	35, 98, 181, 379	32, 34, 63, 83, 198 (D)	185	184, 226 (B)
<i>F. nigra</i>	35, 98, 379	32, 34, 63, 281 (E)	-	-
<i>F. maxima</i>	35, 149, 379	32, 34, 114, 230 (A)	185	184, 226 (B)
<i>F. limbata</i>	35, 149	34, 114, 262 (F)	(185) ^a	(184, 226) ^a (O)/ (B)
<i>F. costata</i>	35, 98, 149, (379) ^a	32, 34, 63, 51, 230 (C) / (34, 51, 63, 262) ^a (C ^a)	185	184, 226 (B)
<i>F. picta</i>	35, 98, 149, (379) ^a	32, 34, 63, 51, 230 (C) / (34, 51, 63, 262) ^a (C ^a)	185	184, 226 (B)

^aDiana con polimorfismo intraespecífico, ^bLongitud estimada para la cadena 5'-3'.

calidad para obtener dicho producto PCR (Quinteiro *et al.*, 1998, 2001; Russell *et al.*, 2000). Por ello, esta metodología podría aplicarse a la autenticación de toda la gama de presentación comercial de las lapas del género *Fissurella*. También, podría ser de utilidad en la identificación de individuos en cualquier estadio de su desarrollo ontogenético, (huevos, larvas, semillas y cualquier otro estado reciente asentamiento) en estudios de biología y ecología de las especies del género *Fissurella*.

Los datos mitocondriales y nucleares disponibles son incompatibles con la taxonomía vigente, aunque controvertida, basada en caracteres morfológicos del cuerpo y de la concha, altamente variables y poco precisos (Riveros-Zúñiga, 1951; Marinovich, 1973; Ramírez-Boehme, 1974; McLean, 1984). En concreto, en las especies del grupo latimarginata (*F. latimarginata*, *F. cumingi*, *F. oriens* y *F. bridgesi*) y costata (*F. costata* y *F. picta*) se detectan diferentes haplotipos, íntimamente relacionados, que son compartidos entre las distintas especies; es decir, la variabilidad nucleotídica presente no está distribuida conforme a la taxonomía de dichas especies. La metodología descrita identifica estos grupos monofiléticos, basados en caracteres moleculares, aunque la configuración de su rango taxonómico requiere de un consenso entre las alternativas de estudios moleculares, morfométricos y ecológicos.

AGRADECIMIENTOS

Alberto Olivares Paz realiza una estada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela, financiada por la Universidad de Antofagasta y el proyecto MECESUP ANT9902. Los autores agradecen la colaboración prestada por los Sres. Andrés Olguín, Eduardo Díaz y Braulio Montanares, en la colección de parte de los ejemplares empleados para la realización de este estudio. Este trabajo fue posible gracias a las ayudas financieras siguientes: QLK1-CT-2000-30476 de la Unión Europea, PGIDTO1PXJ 20005 PM de la secretaría Xeral de Investigación e Desenvolvemento de la Xunta de Galicia y AGL 2000-3115-CE de la Dirección General de Investigación del Ministerio de Ciencia y Economía.

REFERENCIAS

- Bretos, M. & R. Chihuailaf. 1993.** Studies on the reproduction and gonadal parasites of *Fissurella pulchra* (Gastropoda: Prosobranchia). *Veliger*, 36(3): 245-251.
- Bretos, M. 1988.** Pesquería de lapas en Chile. *Medio Ambiente*, 9(2): 7-12.
- Gaete, N., X. Navarro, F. Constantinescu, C. Mera, D. Selles, M.E. Solari, M.L. Vargas, D. Oliva & L. Durán. 2004.** Una mirada al modo de vida canoero del mar interior desde Piedra Azul. *Chungará*, 36: 333-346.
- Guzmán, N., S. Súa & L. Ortlieb. 1998.** Catálogo descriptivo de los moluscos litorales (Gastropoda y Pelecypoda) de la zona de Antofagasta, 23°S (Chile). *Estud. Oceanol.*, 17: 17-86.
- Jerardino, A., J.C. Castilla, J.M. Ramírez & N. Hermosilla. 1992.** Early coastal subsistence patterns in Central Chile. A systematic study of the marine invertebrate fauna from the site of Curaumilla. I. *Latin Am. Antiq.*, 3(1): 43-62.
- Marinovich, L. 1973.** Intertidal mollusks of Iquique, Chile. *Nat. Hist. Mus. Los Angeles Coun. Contr. Sci.*, 16: 1-49.
- McLean, J.H. 1984.** Systematics of *Fissurella* in the Peruviana and Magellanic faunal provinces (Gastropoda: Prosobranchia). *Nat. Hist. Mus. Los Angeles Coun. Contr. Sci.*, 354: 1-70.
- Merritt, T.J.S., L. Shi, M.C. Chase, M.A. Rex, R.J. Etter & J.M. Quattro. 1998.** Universal cytochrome b primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 7(1): 7-11.
- Oliva, D. & J.C. Castilla. 1992.** Guía para el reconocimiento y morfometría de diez especies del género *Fissurella* Bruguière, 1789 (Mollusca: Gastropoda) comunes en la pesquería y conchales indígenas de Chile central y sur. *Gayana Zool.*, 56(3-4): 77-108.
- Olivares, A., M. Bretos, R. Chihuailaf & A. Zenis. 1998.** Biometría, hábitat y epibiontes en *Fissurella latimarginata* (Mollusca: Prosobranchia) en el norte de Chile. *Estud. Oceanol.*, 17: 95-103.
- Osorio, C. 2002.** Moluscos marinos en Chile. Especies de importancia económica. Guía para su identificación. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, 211 pp.

- Quinteiro, J., C.G. Sotelo, H. Rehbein, S.E. Pryde, I. Medina, R.I. Pérez-Martín, M. Rey-Méndez & I.M. Mackie. 1998.** Use of mtDNA direct Polymerase Chain Reaction (PCR) sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. *J. Agr. Food Chem.*, 46: 1662-1669.
- Quinteiro, J., R. Vidal, M. Izquierdo, C.G. Sotelo, R.I. Pérez-Martín, H. Rehbein, G.L. Hold, V.J. Russell, S.E. Pryde, C. Rosa, A.T. Santos & M. Rey-Méndez. 2001.** Identification of hake species (*Merluccius* genus) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences. *J. Agric. Food Chem.*, 49(11): 5108-5114.
- Ramírez-Bohme, J. 1974.** Nuevas especies chilenas de *Lucapina*, *Fissurella* y *Collisella* (Mollusca, Archaeogastropoda). *Bol. Mus. Nac. Hist. Nat., Santiago*, 33: 15-34.
- Riveros-Zúñiga, F. 1951.** Catálogo descriptivo de fissurélidos chilenos. *Rev. Biol. Mar.*, 3(1-2): 89-148.
- Russell, V.J., G.L. Hold, S.E. Pryde, H. Rehbein, J. Quinteiro, M. Rey-Méndez, C. González-Sotelo, R.I. Pérez-Martín, A.T. Santos & C. Rosa. 2000.** Use of restriction fragment length polymorphism to distinguish between salmon species. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 2184-2188.
- Servicio Nacional de Pesca (SERNAPESCA). 2003.** Anuario Estadístico de Pesca. Servicio Nacional de Pesca, Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, 155 pp.

Recibido: 20 mayo 2005; Aceptado: 28 abril 2006