

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER
EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN:
ACUICULTURA Y GESTIÓN AMBIENTAL

Diversidad y estructura genética poblacional del cangrejo
del manglar (*Ucides occidentalis*) en la región Tumbes.
2012

ALBERTO ORDINOLA ZAPATA

TUMBES, PERÚ

2012

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo Alberto Ordinola Zapata, declaro que los resultados de esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo declaro que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona, excepto; donde se reconoce como tal, a través de citas y con propósitos exclusivo de de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores y mi jurado calificador, en lo referente a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

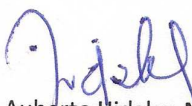
Alberto Ordinola Zapata

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS DE MAESTRIA
(Resolución Directoral N° 001-2012/UNT-EPG-D)

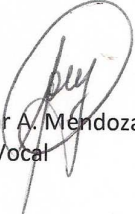
Siendo las diecisiete horas del trece de setiembre del dos mil doce, en una de las aulas (3^{er} piso) de la Facultad de Ciencias Económicas de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicada en la avenida Arica N° 360 nos reunimos los docentes: Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, Mg. Marco A. Zapata Cruz y MSc. Oscar A. Mendoza Neyra, Presidente, Secretario y vocal respectivamente, del Jurado Evaluador de la tesis "Diversidad y estructura genética poblacional del cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) en la región Tumbes" designado mediante Resolución Directoral N° 001-2012/UNT-EPG-D, presentado por el maestrante ALBERTO ORDINOLA ZAPATA. El propósito de esta reunión fue escuchar la sustentación de la referida tesis, para lo cual se invito al sustentante a que proceda a la exposición y se le asigno un tiempo de treinta minutos. Después de concluido el acto sustentatorio, el jurado evaluador procedió a formular las interrogantes relacionadas con el tema, por un espacio de cuarenta minutos. Concluido este proceso, el jurado invito al sustentante y a los asistentes a abandonar el ambiente.

Después del análisis y las deliberaciones sobre el contenido y la sustentación de la tesis, el jurado considera no hacer ninguna observación, tanto en la forma como en fondo, APROBÁNDOLO con el calificativo de SOBRESALIENTE.

Siendo las dieciocho horas con treinta minutos del mismo día, se dio por concluido el presente acto académico, y en señal de conformidad firmamos.


Dr. Auberto Hidalgo Mogollón
Presidente del Jurado


Mg. Marco A. Zapata Cruz
Secretario


MSC. Oscar A. Mendoza Neyra
Vocal

cc. Jurads. (03)
Arch.

RESPONSABLES

ALBERTO ORDINOLA ZAPATA

EJECUTOR

Dra. ENEDIA G. VIEYRA PEÑA

ASESORA

JURADO DICTAMINADOR

DR. AUBERTO HIDALGO MOGOLLÓN

PRESIDENTE

MG. MARCO ANTONIO ZAPATA CRUZ

SECRETARIO

MSc. OSCAR MENDOZA NEYRA

MIEMBRO

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la diversidad genética y la estructura genético poblacional del cangrejo del manglar *Ucides occidentalis* en el manglar de Tumbes el año 2012. La investigación se realizó entre junio y julio de 2012 en 3 zonas del manglar tumbesino: la zona norte (Zarumilla), la zona centro (Puerto Pizarro) y la zona sur (Corrales), en cada una de las zonas se establecieron 3 puntos de muestreo. Se recolectaron 55 ejemplares de *U. occidentalis*, extrayéndoseles a cada uno, muestras de hemolinfa y músculo, totalizando 110 muestras que se usaron para realizar el proceso de amplificación de un fragmento del gen mitocondrial de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI). La extracción del ADN se realizó mediante el método del cetil trimetil bromuro amonio (CTAB). De las 110 muestras se seleccionaron 56 para ser amplificadas mediante reacción de cadena de polimerasa (PCR), 52 fueron amplificadas exitosamente, y de éstas, 45 fueron enviadas a la Empresa Macrogen en EE.UU. para ser secuenciadas, obteniéndose la secuencia de 42 de ellas, éstas fueron alineadas y se obtuvo secuencias de 543 pb para el análisis. Los resultados mostraron que las secuencias tuvieron similitud de 85 % a 87 % con secuencias almacenadas en GenBank correspondientes a fragmentos del gen COI de varios cangrejos. Respecto a la diversidad genética se determinó un alto índice de diversidad medido a través de los parámetros: número de haplotipos (h): 30, frecuencia del haplotipo más frecuente: 14,29 % y diversidad de haplotipos: 0,9721; promedio de diferencias en nucleótidos: 4,396 y diversidad nucleótida (π): 0,00810. En cuanto a la estructura genético poblacional, se determinó utilizando el análisis de varianza molecular (AMOVA) que fue bastante baja, dado que, el 96 % de la variabilidad genética se presentó entre los individuos dentro de las poblaciones y sólo 4 % entre las poblaciones; de igual manera, se determinó utilizando el test de Mantel que no existió correlación ($r=-0,035$, $R^2=0,0013$) entre la matriz de distancia geográfica y la matriz de distancia genética. Se concluyó que la diversidad genética fue alta y la estructura genética poblacional baja en *U. occidentalis* en el manglar de Tumbes el año 2012.

Palabras clave: diversidad genética, estructura genética poblacional, *Ucides occidentalis*, COI.

ABSTRACT

The present study aimed to determine the genetic diversity and population genetic structure of mangrove crab *Ucides occidentalis* in Tumbes mangroves by 2012. The research was conducted between June and July 2012 in three areas of Tumbes mangroves: the north (Zarumilla), the central (Puerto Pizarro) and the south (Corrales), in each of the areas were established three points sampling. 55 specimens of *U. occidentalis* were collected and hemolymph and muscle samples were extracted from them, totaling 110 samples were used to perform the process of amplifying a gene fragment of mitochondrial subunit I of cytochrome oxidase (COI). DNA extraction was performed by the cetyl trimethyl ammonium bromide method (CTAB). Of the 110 samples were selected to be amplified by 56 polymerase chain reaction (PCR), 52 were successfully amplified, and of these, 45 were sent to Macrogen Company in USA to be sequenced. 42 were successfully sequenced, they were aligned and 543 bp sequences obtained for analysis. The results showed that the sequences were a similarity of 85 % to 87 % with sequences stored in GenBank of gene fragments of COI corresponding to various crabs. Regarding genetic diversity was determined high diversity index measured through the following parameters: number of haplotypes (h) 30, the most frequent haplotype frequency: 14.29 % and haplotype diversity: 0.9721; nucleotide differences in average: 4.396 and nucleotide diversity (π): 0.00810. In terms of population genetic structure was determined using analysis of molecular variance (AMOVA) was quite low because 96 % of the genetic variability occurred among individuals within populations and only 4 % among populations, likewise, was determined using the Mantel test that there was no correlation ($r = -0.035$, $R^2 = 0.0013$) between the matrix of geographical distance and genetic distance matrix. It was concluded that genetic diversity was high and population genetic structure was low in *U. occidentalis* in mangroves of Tumbes in 2012.

Keywords: genetic diversity, population genetic structure, *Ucides occidentalis*, COI.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	14
2.1. El cangrejo del manglar <i>Ucides occidentalis</i>	14
2.2. Biodiversidad	15
2.3. Diversidad genética	16
2.4. Estructura genética poblacional	18
2.5. Marcadores moleculares	20
2.6. Marcadores moleculares basados en ADN mitocondrial	21
2.7. Gen de la citocromo oxidasa I	23
2.8. Investigaciones relacionadas con la diversidad y estructura genética poblacional de los cangrejos del género <i>Ucides</i>	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS	29
3.1. Lugar y periodo de ejecución de la investigación	29
3.2. Tipo y diseño de investigación	29
3.3. Población y muestra de estudio	29
3.4. Métodos	32
3.5. Recolección de datos	37
3.6. Procesamiento y análisis de datos	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Amplificación del fragmento del gen COI	39
4.2. Verificación de la identidad del fragmento del gen COI	41
4.3. Diversidad genética poblacional	43
4.4. Estructura genética poblacional	46

5. DISCUSIÓN	48
6. CONCLUSIONES	53
7. RECOMENDACIONES	54
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	63

1. INTRODUCCIÓN.

La presente tesis trata acerca de la diversidad y estructura genética poblacional del cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) en la región Tumbes, en el año 2012.

El cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) es una de las especies más importantes del ecosistema del manglar. Ecológicamente es una especie clave por encargarse del reciclamiento de hasta el 80 % de la hojarasca del mangle, también ayuda a airear el suelo del manglar cuando construye sus cuevas potenciando la actividad de las bacterias aeróbicas que descomponen la materia orgánica (Solano 2006).

U. occidentalis es también el cangrejo más explotado del manglar de la región Tumbes; lo que ha conllevado a que su población haya disminuido drásticamente, reduciéndose de 120 millones en 1996 a 77,06 millones en 2007, es decir una disminución del 35,8 % de la población en 11 años (Ordinola, Montero y Gonzales 2010).

La reducción del tamaño poblacional de *U. occidentalis* en el manglar tumbesino, pone a dicha especie en riesgo de desaparecer en dicha zona en mediano o corto plazo.

De lo antes indicado se concluye que la presente investigación es importante, debido a que la determinación de la diversidad genética poblacional de *U. occidentalis* en el manglar de Tumbes, permitirá una mejor comprensión del estado de dicha población; ello porque la supervivencia de una población es factible no por ser numerosa, sino por mantener un *pool* genético diverso, es decir una alta diversidad genética; por otro lado, es posible que en mediano o corto plazo se deba incursionar en la producción de larvas de *U. occidentalis* con propósitos de repoblamiento en el manglar de Tumbes, por lo que es importante saber cómo se distribuye la diversidad genética a nivel espacial a través de toda el área del manglar, es decir, definir la estructura genética poblacional de dicho recurso.

La presente investigación se justifica por lo tanto, debido a la importancia que *U. occidentalis* tiene ecológicamente, al ser una especie clave del manglar, así como, por su importancia económica y social, pues se explota comercialmente y sustenta la economía de multitud de familias que se dedican a su extracción.

Respecto a los factores clave del presente estudio, que son la diversidad genética y estructura genética poblacional, se sabe que la reducción drástica del tamaño poblacional podría también originar una reducción de la diversidad genética poblacional, entendiéndose ésta como la diversidad de alelos que están presentes en una población y su frecuencia relativa en la misma. La diversidad genética constituye una reserva genética que permite que la especie pueda resistir a amenazas a su supervivencia como son las enfermedades, los cambios climáticos o cambios en el equilibrio ecológico.

La diversidad genética entre las poblaciones, se puede hallar distribuida de manera uniforme o no, conformando lo que se denomina estructura genética poblacional y que formalmente se define como la cantidad y distribución de la diversidad genética dentro de las poblaciones, esto ocurre cuando las frecuencias alélicas no se distribuyen al azar sino que siguen un patrón o arquitectura, espacial o temporal.

La estructura genética poblacional se ve influenciada por 4 fuerzas: la tasa de mutación, la deriva génica, el flujo genético y la selección natural.

En el caso de especies tales como *U. occidentalis*, cuyo periodo larval es largo, es probable que el flujo génico que significa el traslado de genes a través de la inmigración de individuos en estadio larval o adultos, tenga un efecto considerable reduciendo la estructura genética e incrementando la diversidad genética. Este hecho ha sido comprobado en el cangrejo del manglar brasileño (*Ucides cordatus*) que es la otra especie del género *Ucides* que se halla en el Atlántico; ya que en múltiples investigaciones realizadas en el Brasil se ha determinado que la población de *U. cordatus* tiene un alto nivel de diversidad genética y un bajo nivel de estructura

genética poblacional, por lo que, podría inferirse que la población de *U. occidentalis* tendría un comportamiento similar.

Dada la rápida disminución del tamaño poblacional de *U. occidentalis* en los manglares de Tumbes, es probable que se deba recurrir a programas de repoblamiento para revertir tal situación. Estos programas deben tener como meta incrementar el tamaño poblacional manteniendo al mismo tiempo, la diversidad genética y la estructura genética poblacional.

El problema actual es que los estudios sobre la diversidad genética y la estructura genética poblacional en *U. occidentalis* son muy reducidos; existe un único estudio de dicho tipo realizado en el Ecuador por Ratti y Muñoz (2010), por su parte, en el Perú y específicamente en Tumbes, no se ha realizado ningún estudio al respecto, por lo que existe un total desconocimiento sobre la diversidad genética y la estructura genética poblacional de *U. occidentalis* en los manglares de la región Tumbes.

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado se ha llegado a la formulación de los siguientes problemas de investigación:

- ¿Qué nivel de diversidad genética presenta la población de *U. occidentalis* en los manglares de la región Tumbes el año 2012?
- ¿Qué nivel de estructura genética poblacional existe en la población de *U. occidentalis* en los manglares de la región Tumbes el año 2012?

Planteándose las siguientes hipótesis ante las interrogantes anteriores:

- La población de *U. occidentalis* en los manglares de la región Tumbes el año 2012, presenta un alto nivel de diversidad genética.
- La población de *U. occidentalis* en los manglares de la región Tumbes el año 2012, presenta un bajo nivel de estructura genética poblacional.

Y como objetivos:

- Determinar el nivel de diversidad genética en la población de *U. occidentalis* en los manglares de la región Tumbes el año 2012.
- Determinar el nivel de estructura genética poblacional que existe en la población de *U. occidentalis* en los manglares de la región Tumbes el año 2012.

2. ANTECEDENTES.

2.1. *El cangrejo del manglar *Ucides occidentalis*.*

El cangrejo del manglar *Ucides occidentalis* es una especie clave en los ecosistemas de manglares del pacífico americano, dentro de los cuales destaca el ecosistema del manglar tumbesino que es único en el Perú y abarca 4 541 ha (INRENA 2007).

U. occidentalis es considerada una especie clave del manglar debido a que juega un rol fundamental en la remoción de hojas caídas del mangle. La tremenda importancia ecológica del cangrejo del manglar ha sido demostrada por los estudios de simulación dinámica de remoción de la hojarasca realizados por Tazán y Wolf (2000) citados por Solano (2006), quienes señalan que sin la presencia del cangrejo del manglar cerca del 75 % al 84 % de la materia orgánica se escaparía de los manglares, es decir solo entre el 16 % y el 25 % de la materia orgánica se reciclaría.

Ucides occidentalis, es una de las especies representativas del manglar tumbesino, que es explotada para consumo humano directo; su captura está ejerciendo una fuerte presión sobre su población, siendo una especie amenazada en el ecosistema del manglar tumbesino (Ordinola, Montero y Gonzales 2010).

La reducción poblacional de dicha especie en el manglar tumbesino, afecta a la biodiversidad del ecosistema, pero también podría afectar a la diversidad genética y a la estructura genética poblacional de *U. occidentalis*.

La situación en la que se encuentra el cangrejo del manglar tumbesino es similar a la del cangrejo del manglar brasileño o cangrejo uça (*Ucides cordatus*), el cual debido a la captura indiscriminada, a la degradación de su hábitat y a la aparición de una enfermedad denominada síndrome del cangrejo letárgico, redujo drásticamente su población. Todo ello impulsó a que a partir de 2001, se iniciaran programas de repoblamiento con

producciones masivas de larvas de *U. cordatus* y su liberación al medio natural (Ventura 2006; Silva 2007; Ventura et al. 2010), estas liberaciones sin embargo, adolecieron de haberse realizado sin un estudio genético previo, con lo que se estima que la población creció pero la diversidad genética se redujo.

Actualmente se está estudiando la diversidad genética de *U. cordatus* a fin de mejorar las estrategias de manejo del repoblamiento (Oliveira 2009).

2.2. Biodiversidad

La biodiversidad o diversidad biológica ha sido definido por el Programa Ambiental de las Naciones Unidas como “la variabilidad entre los organismos vivientes de todas las fuentes, incluyendo, entre otros, los organismos terrestres, marinos y de otros ecosistemas acuáticos, así como los complejos ecológicos de los que forman parte; esto incluye diversidad dentro de las especies, entre especies y de ecosistemas”. El término comprende, por tanto, diferentes escalas biológicas: desde la variabilidad en el contenido genético de los individuos y las poblaciones, el conjunto de especies que integran grupos funcionales y comunidades completas, hasta el conjunto de comunidades de un paisaje o región (Moreno 2001).

La biodiversidad es la base de los ecosistemas, sostiene su funcionamiento y los servicios que estos brindan a la humanidad. La humanidad depende en un 100 % de las especies animales y vegetales para alimentarse y hasta en un 80 % para obtener productos para mantener la salud. La biodiversidad es también la base de la identidad de algunas culturas, identidad que no debe ser subvalorada, ya que es la responsable de mantener la diversidad biológica, tal es el caso del pueblo peruano que ha mantenido durante cientos de años una amplia diversidad de variedades de plantas, la papa entre ellas, que de otra manera se hubiesen perdido por los sembríos de unas pocas variedades de la misma (PUCP 2011).

La comunidad internacional en la actualidad está altamente interesada en la conservación de la biodiversidad, tal es así, que la Organización de Naciones Unidas (ONU), declaró al año 2010 como el Año Internacional de la Diversidad Biológica, y a la década de 2011 a 2020 como el Decenio de las Naciones Unidas sobre la Diversidad Biológica (ONU 2011); de igual manera, el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), ha planteado su Plan Estratégico para la Diversidad Biológica 2011-2020 así como las Metas de Aichi, dentro de las cuales incluye como meta N° 13, mantener la diversidad genética de especies animales y vegetales domésticas y silvestres, así como, practicar estrategias para evitar la erosión genética y salvaguardar su diversidad genética (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica 2011).

En la actualidad es preocupante que el ritmo de desaparición de las especies animales y vegetales sea 1 000 a 10 000 veces mayor que su tasa natural de extinción, esta tasa se ha incrementado debido a las actividades humanas realizadas sin ningún sentido de sostenibilidad (PUCP 2011).

2.3. Diversidad genética.

La biodiversidad se puede apreciar a diversas escalas, a nivel de comunidades, de poblaciones e incluso de individuos, pero toda esta diversidad es solo la expresión fenotípica de una diversidad más profunda, la diversidad genética, que determina la forma en que una especie interactúa con su ambiente y con otras especies. Toda la diversidad o variación genética surge en el ámbito molecular a partir de mutaciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Moreno 2001).

Dado que la diversidad o variación genética es la materia prima sobre la cual puede actuar la selección natural y dar origen a adaptaciones, se ha llegado a considerar su presencia como indicadora de la buena salud de una población; mientras que su ausencia limitaría la capacidad de respuesta de la población a un medio cambiante en el corto y largo plazo (Moreno 2007).

La diversidad genética se refiere a la variabilidad encontrada dentro de los genes, siendo los genes las unidades mínimas heredables que tienen posiciones definidas dentro de un genoma. El gen puede asumir la forma de diferentes secuencias de nucleótidos, lo que posibilita la existencia de formas alternativas del gen, que se denominan alelos. Los alelos son las entidades que permiten definir la diversidad genética, la cual se conceptualiza como los diferentes tipos de alelos que están presentes y su frecuencia relativa entre todos los miembros de una población (González 2008)

La diversidad genética se puede medir a diferentes escalas, como variación a nivel individual (o dentro de los individuos), cuando se mide la diversidad de alelos que posee el ADN de un individuo; a nivel de población (o dentro de la población) cuando se compara el conjunto de alelos de todos los genomas que forman parte de dicha población y a nivel de poblaciones (o entre poblaciones) cuando se evalúa la diversidad de alelos entre todos los genomas de todos los individuos que forman parte de dichas poblaciones (González 2008).

Se define como frecuencia génica de un determinado alelo a la tasa en que dicho alelo está presente en un grupo de evaluación (individuo, población o conjunto de poblaciones) respecto al total de alelos de dicho grupo. En el caso de un individuo diploide es posible que en sus 2 genomas porten alelos de igual tipo, con lo que se le denominaría homocigota, o de diferente tipo, con lo que se le denominaría heterocigota, es fácil intuir que si un individuo porta dos alelos diferentes, tiene una mayor diversidad de los mismos que aquel que solo porta un solo tipo de alelo. La presencia de individuos heterocigotos en una población se denomina heterocigosis y es un buen indicador de diversidad genética (González 2008).

González (2008) señala que la diversidad genética de las poblaciones que se revela mediante marcadores moleculares se mide a través de diversos índices de cuantificación; siendo los más utilizados la riqueza alélica (A), el polimorfismo (P) y la heterocigosidad esperada (H_e). La riqueza alélica (A)

es el número medio de alelos por *locus* y cuantifica el número total de alelos diferentes detectado en cada uno de los *loci* de una población, El polimorfismo o la proporción de *loci* polimórficos (P) es una medida del número de *loci* variables en una población y se calcula dividiendo el número de *loci* polimórficos de ésta entre el número total de *loci* analizados, el gran problema de la definición de polimorfismo es determinar cuándo se puede declarar a un *locus* polimórfico, algunos autores han definido que esto se da cuando la frecuencia del alelo más probable para un *locus* es menor a 95 %, otros han sugerido el valor de 99 %, de tal manera que se introduce un nivel de subjetividad en la medida de polimorfismo, por lo que es una medida muy criticada.

González (2008) citando a Nei (1987) asegura que el promedio de heterocigosidad es el método de medición más adecuado de la variación genética, pues no depende de la arbitrariedad de la definición de polimorfismo y puede ser definida sin ambigüedad en términos de frecuencias alélicas. La heterocigosidad esperada de una población (H_e) es la media de los valores obtenidos para cada *locus* en dicha población. Cuando las poblaciones están bajo equilibrio Hardy-Weinberg, la heterocigosidad puede ser calculada a partir de la frecuencia alélica. Por lo tanto, la heterocigosidad esperada cuantifica la igualdad o equitatividad de las frecuencias alélicas en los *loci* (Hoelzel 1998; Sosa et al. 2002 citados en González 2008). Además, la comparación entre la heterocigosis observada (H_o) y la heterocigosis esperada (H_e) permite evaluar la estructura genética de las poblaciones (Nei 1987 citado por González 2008).

2.4. Estructura genética poblacional:

La estructura genética ha sido definida por Henríquez (2003) como la cantidad y la distribución de la variabilidad genética dentro de las poblaciones; por otra parte González (2008); indica que existe una estructuración genética intrapoblacional cuando las frecuencias alélicas no se distribuyen al azar, sino que siguen un determinado patrón o arquitectura que bien puede ser espacial o temporal. Por su parte, la estructura genética

interpoblacional es el resultado de la distribución geográfica y en el espacio de subpoblaciones entre las cuales existen diferencias genéticas; dicha estructura genética es producto de la acción de las 4 principales fuerzas evolutivas: la tasa de mutación, la deriva génica, el flujo genético y la selección natural.

La estructura genética poblacional puede ser evaluada por diversos parámetros entre los cuales se puede mencionar a la distancia genética, que es la medida bases a partir de la cual se han creado otras formas de medición, siendo una de las más utilizadas la distancia genética de Nei que puede estimar el número de genes o codones sustituidos por *locus* entre poblaciones. Nei (1972 citado en González 2008) definió en primer lugar el concepto de identidad genética entre dos poblaciones como la probabilidad de que dos alelos (uno de cada población) sean idénticos, indicando que el valor de la identidad genética puede variar de cero (para poblaciones completamente distintas) hasta uno (si son genéticamente idénticas), una vez definido el valor para la identidad genética (I), la distancia genética (D) se obtiene mediante el logaritmo de la primera: $D = -\ln I$.

De esta manera, la distancia genética definida por Nei (1972 citado en González 2008) toma valores que oscilan entre cero y el infinito.

Otra de la forma de medir la estructura genética poblacional se da a través de los estadísticos F de Wright, también conocidos como índices de fijación, los que evalúan la declinación de la heterocigosidad debida a la subdivisión dentro de una población. El estadístico F es una medida de la diferencia entre la media de heterocigosidad entre las subdivisiones en la población, y la frecuencia potencial de heterocigotos, si todos los miembros de una población se cruzaran libremente (Hartl and Clark 1997). El índice de fijación va de 0 (indicando que no existe ninguna diferenciación entre la población total y sus subpoblaciones) a un máximo teórico de 1, aunque en la práctica el índice de fijación observado es mucho menor que 1 en poblaciones altamente diferenciadas.

Los índices de fijación pueden ser determinados para diferentes niveles de la estructura poblacional, por ejemplo, el grado de diferenciación dentro de una población entre grupos o demos (FSG), dentro de grupos entre demos (FGT), y dentro de una población entre demos (FST) (Hartl and Clark 1997).

Excoffier, Smouse and Quattro (1992) han propuesto una de las medidas más utilizadas para evaluar la estructura poblacional, conocida como análisis de varianza molecular, AMOVA que es un método que estima la diferenciación de las poblaciones directamente desde datos moleculares y prueba hipótesis acerca de la diversidad. El método es aplicable a una variedad de datos moleculares procedentes de marcadores moleculares tales como por ejemplo: el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o el polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), datos de secuenciamiento de ADN, o árboles filogenéticos basados en tales datos.

AMOVA es parecido a un análisis jerárquico de varianza en el que se evalúa la diversidad genética en tres niveles: diversidad entre grupos de poblaciones, diversidad entre las poblaciones dentro de los grupos y la diversidad entre los individuos dentro de la población. Sin embargo, se distingue de un análisis jerárquico de varianza en que puede acomodar diferentes asunciones evolucionarias sin modificar la estructura básica de los análisis y que las hipótesis son probadas usando métodos permutacionales, de tal manera que, no se requiere la asunción de que los datos siguen una distribución normal. En la actualidad AMOVA es una de las medidas más efectivas para determinar la existencia de estructura genética poblacional (Excoffier, Smouse and Quattro 1992).

2.5. Marcadores moleculares:

Para determinar la diversidad de los organismos comúnmente se acude a evaluar sus caracteres morfológicos de los mismos, si los organismos muestran tales caracteres similares o diferentes, se puede indicar que son más o menos diversos. Los caracteres morfológicos sin embargo, son de

utilidad relativa pues representan caracteres fenotípicos y por lo tanto, no son determinados únicamente por su carga genética, sino también, por el ambiente; es por ello que, para estudiar la diversidad a nivel genético se requiere ir más allá de los caracteres morfológicos y evaluar el ADN mismo, para lo cual se han desarrollado los denominados marcadores moleculares. Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas), y que además puede detectarse fácilmente, la ventaja de los marcadores moleculares es que pueden evaluarse desde los primeros estadios de desarrollo de un individuo, pudiendo obtenerse de todo el individuo o de una parte de él. Existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos y los marcadores de ADN (Solís y Torres 2005).

Arif and Khan (2009), han señalado que los principales marcadores moleculares basados en el ADN nuclear son: la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), el polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y los microsatélites; y en el caso de los marcadores moleculares basados en ADN mitocondrial: los genes 12s rADN y 16S rADN, genes que codifican proteínas como la citocromo oxidasa (CO) y la región de control (CR).

2.6. Marcadores moleculares basados en ADN mitocondrial

El ADN mitocondrial (ADNmt) de los crustáceos es similar al del resto del reino animal, se trata de una molécula de ADN haploide que se hereda por vía materna y tiene un tamaño que oscila entre 15 000 a 17 000 pares de bases (pb), con una forma cerrada o circular. El ADNmt codifica 37 genes, de los cuales, 2 son genes ribosomales (12S rADN y 16S rADN), 22 son genes que codifican para ARN de transferencia (ARNt) y 13 son genes que codifican para proteínas (Ewald 2006), la ubicación de tales genes se puede apreciar en la figura 1 donde se muestra una representación linealizada del ADN mitocondrial del cangrejo *Portunus trituberculatus* (Mitsugu 2003 citado en Ewald 2006).

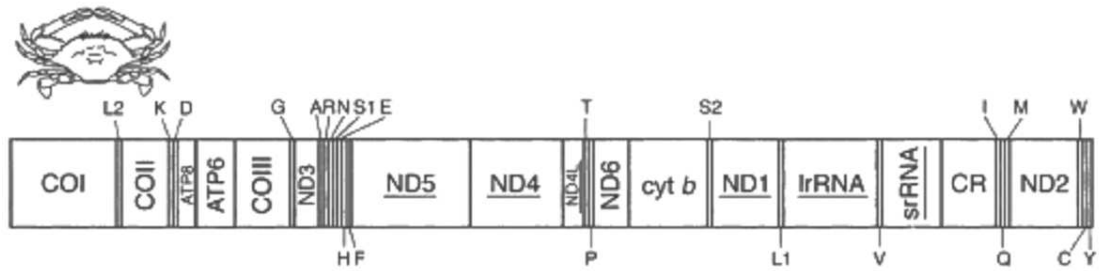


Figura 1. Representación linealizada de la organización de los genes del cangrejo nadador *Portunus trituberculatus*. Se observa la posición de los genes que codifican proteínas tales como el gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa (COI), de la subunidad II (COII) y III (COIII), el citocromo b (cyt b), genes que codifican la subunidad menor del ribosoma (srRNA o 16S rADN), gen de la subunidad mayor del ribosoma (IrRNA o 12S rADN), CR es la región de control (Mitsugu 2003 citado en Ewald 2006).

Según Shih et al. (2011), las secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) son apropiadas para evaluar la estructura genética y la filogeografía. La ventaja que tiene el ADNmt en comparación con el ADN nuclear, es que existen varios cientos o miles de mitocondrias en cada célula y cada una de ellas porta 1 a más copias de ADNmt; por tanto en cada célula se encuentran miles de copias del ADNmt; en comparación, solo hay una copia del ADN nuclear; adicionalmente el ADNmt es haploide y se hereda únicamente por línea materna (Waples et al. 1999 citado en Ewald 2006) salvo raras excepciones; se degrada más lentamente que el ADN nuclear y puede ser usado para analizar ADN antiguo, es por ello que el efecto de la deriva genética es más fuerte en el ADNmt y la diferenciación poblacional se puede apreciar más fácilmente en el ADNmt que en el ADN nuclear pues el ADNmt evoluciona hasta 10 veces más rápido que el ADN nuclear (Shih et al. 2011; Ewald 2006).

Arif and Khan (2009) han señalado que los diferentes genes que conforman el genoma mitocondrial tienen diversas tasas de mutación, por lo que se pueden usar para evaluar la diversidad a diferentes niveles taxonómicos, así por ejemplo, el gen 12S rADN es altamente conservado y por ello se usa para los niveles taxonómicos más altos: *phyla* y *subphyla*; por otro lado el gen 16S rADN se usa para diferenciación en taxos de categoría media tales como familias, mientras que los genes que codifican proteínas están poco conservados y se usan en categorías taxonómicas más bajas como familias,

géneros y especies. Finalmente la región de control (CR) es hipervariada; y puede ser usada para la identificación de especies y sub-especies.

2.7. Gen de la citocromo oxidasa I

La citocromo oxidasa es una enzima propia de las mitocondrias y algunas bacterias, que forma parte de la cadena de transporte de electrones que conduce a la formación de la molécula energética maestra el adenosintrifosfato (ATP). La enzima está formada por 13 subunidades, de las cuales 10 se codifican en el ADN nuclear y las otras 3 en el ADN mitocondrial, estas últimas corresponden a las denominadas citocromo oxidasa I (COI), citocromo oxidasa II (COII) y citocromo oxidasa III (COIII).

El gen que codifica a la citocromo oxidasa es uno de los genes más altamente conservados dentro del genoma mitocondrial; sin embargo, también es una zona en la cual la tasa de mutación es bastante alta como para poder distinguir diferencias genéticas a nivel de individuos.

Folmer et al. (1994) diseñaron un juego de *primers* universales para poder amplificar un fragmento del COI de 710 pb, para ello utilizaron secuencias de ADN publicadas de las siguientes especies: mejillón azul (*Mytilus edulis*), mosca de la fruta (*Drosophila yakuba*); abeja (*Apis mellifera*); mosquito (*Anopheles gambiae*), artemia (*Artemia franciscana*), los nematodes *Ascaris suum* y *Caenorhabditis elegans*; erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*), carpa (*Cyprinus carpio*), rana (*Xenopus laevis*), pollo (*Gallus gallus*), ratón (*Mus musculus*), vaca (*Bos taurus*), ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*); y el ser humano (*Homo sapiens*), encontrando que el siguiente par de *primers* consistentemente amplificaron un fragmento de COI de 710 pares de bases (pb) a través del más amplio conjunto de invertebrados:

Primer forward LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

Primer reverse HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

Los nombres de los *primers* se construyeron incluyendo las letras L y H para referirse a la cadena de ADN ligera, *light* (L), o a la pesada, *heavy* (H), CO se refiere a la citocromo oxidasa, y los números 1490 y 2198 se refieren a la posición del nucleótido 5' en la secuencia de la mosca de la fruta (*Drosophila yakuba*).

Algunos fragmentos del gen COI se han utilizado para evaluar la diversidad genética de varios crustáceos como el camarón de agua dulce *Paratya australensis* (Cook, Bunn and Hughes 2007), el cangrejo herradura *Limulus polyphemus* (Pierce and Gaffney 2000), el langostino blanco *Litopenaeus vannamei* (Francisco and Galetti 2005), el langostino tigre *Penaeus monodon* (Khamnamtong, Klinbunga and Menasveta 2008), el langostino chino *Feneropenaeus chinensis* (Yu et al. 2009).

Particularmente existe una gran cantidad de investigaciones en los cuales la evaluación de la diversidad genética basada en un fragmento del gen COI, se han realizado usando los *primers* diseñados por Folmer et al. (1994), tales como por ejemplo: en el cangrejo verde *Carcinus maenas* (Roman and Palumbi 2004), en el cangrejo de río *Potamonautes perlatus* (Daniels 2003), en el cangrejo de río *Austropotamobius torrentium* (Schubart and Huber 2006), en la langosta espinosa de California *Panulirus interruptus* (García and Pérez 2006) e incluso en el cangrejo del manglar brasileño *U. cordatus* (Ewald 2006). Mostrando la amplia utilidad que tienen los *primers* diseñados por Folmer et al. (1994) en el estudio de invertebrados y en particular en crustáceos.

2.8. Investigaciones relacionadas con la diversidad y estructura genética poblacional de los cangrejos del género *Ucides*.

Existen pocos estudios sobre *Ucides occidentalis*, los cuales en su mayoría se centran en aspectos relacionados con su dinámica poblacional, pero hay muy pocos sobre la diversidad genética del mismo.

Dentro de estos pocos trabajos, se señala el realizado por Ratti y Muñoz (2010) quienes optimizaron el sistema AFLP (amplificación de fragmentos de longitud polimórfica) para la determinación de la variabilidad genética de *U. occidentalis* en 3 zonas del manglar del Golfo de Guayaquil; estos autores determinaron que la técnica de AFLP demostró ser útil para determinar la diversidad genética de *U. occidentalis*, adicionalmente encontraron un bajo nivel de diversidad genética entre las poblaciones evaluadas (con un índice de fijación de Wright o F_{st} de 0,0163); siendo la principal causa de diversidad la deriva génica, mientras que la migración no pareció ser una fuerza evolutiva que influyó significativamente en la variación. La diversidad genética se dio primordialmente dentro de las poblaciones estudiadas.

El cangrejo del manglar brasileño ha sido mejor estudiado a nivel genético, se puede mencionar los trabajos de Oliveira (2009) quien estudió la diversidad genética de *U. cordatus* en la costa del Brasil, a nivel local (puntos de muestreo distantes un máximo de 100 km) y regional (puntos de muestreo distantes más de 5 000 km) mediante 4 técnicas: amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), reacción en cadena de polimerasa – polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (PCR-RFLP), análisis de secuencias de la región controladora del ADN mitocondrial (D-Loop) y microsatélites, estas técnicas fueron aplicadas a 99 individuos en el estudio a escala local y a 280 individuos en el estudio a escala regional, encontrando en ambos alta diversidad genética con niveles de estructuración geográfica extremadamente bajos o nulos. Los resultados de los análisis utilizando microsatélites mostraron mayor grado de estructuración, aunque siempre bajos. Estos resultados muestran que es posible el flujo génico entre poblaciones muy alejadas (separadas por cerca de 4 500 km) y que incluso la desembocadura del Río Amazonas, no constituyó una barrera para la migración de las larvas de este cangrejo. Estos resultados son compatibles con una estrategia reproductiva de exportación de larvas y amplio flujo génico entre todas las poblaciones estudiadas.

En otra investigación realizada sobre *U. cordatus*, Pie et al. (2008), estudiaron 5 ejemplares de este cangrejo recolectados en la bahía de

Guaratuba, en Brasil, de los cuales se obtuvo ADN mitocondrial y se amplificó un fragmento de la región de control (CR), determinando la existencia de un considerable nivel de variabilidad medida como función entrópica de la variabilidad nucleotídica que llegó a 42,7 %.

De igual manera, Britto et al. (2009) realizaron un estudio utilizando marcadores microsatélite para evaluar una muestra de 46 ejemplares de *Ucides cordatus* procedentes de los manglares brasileños, encontrando que el número de alelos en cada *locus* estudiado varió de 3 a 25, con una media de 9 alelos. Los niveles de heterocigosidad observada ($0,709 \pm 0,183$) y esperada ($0,716 \pm 0,170$) fueron altos mostrando también una diversidad genética alta.

En este mismo sentido, se puede mencionar la investigación realizada por Ewald (2006) quien determinó la diversidad y estructura poblacional de *U. cordatus* utilizando como marcador molecular un fragmento del gen COI amplificado usando los mismos *primers* que los empleados en esta investigación (LCO1490 y HCO2198), este autor recolectó 223 ejemplares de *U. cordatus* en tres zonas: Amapa (al norte del río Amazonas), Pará y Maranhão (al sur del río Amazonas) y São Paulo y Paraná (en el sur de Brasil). La zona al norte y al sur del río Amazonas fue seleccionada a pesar de su relativa cercanía (200 km), debido a que el río Amazonas pudo representar la mayor barrera geográfica tanto para juveniles, adultos, así como para la dispersión de las larvas. La zona al sur de Brasil distó más de 5000 km de la zona al sur del Amazonas. De los ejemplares recolectados, se extrajo muestras del músculo que se usaron para amplificar y secuenciar un fragmento del gen COI de 600 pb. Estas secuencias fueron alineadas mostrando 101 posiciones variables y ninguna brecha (*gap*) en el alineamiento. La traducción de la secuencia de nucléotidos usando el código mitocondrial no mostró codones de detención en la secuencia de aminoácidos. Este autor también realizó la búsqueda usando Nucleotide Blast en la base de datos de GenBank encontrando que sus secuencias tenían alta similaridad con las secuencias parciales de COI del cangrejo *Portunus trituberculatus* (número de acceso: AY303613) con una identidad

de 84 %. Adicionalmente encontró similitud con genes COI de otros crustáceos como *Celuca pugilator* AF466700, *Munida* sp. AY351029, *Gaetice depressus* AF317339, *Pseudocarcinus gigas* AY562127, *Hemigrapsus oregonensis* DQ022526.

Al analizar la diversidad genética Ewald (2006), encontró en 223 individuos muestreados, 132 haplotipos distintos; 103 de los cuales fueron únicos, 27 aparecieron entre 2 a 5 veces, 1 pareció 9 veces; el haplotipo #H_3 fue el más frecuente estando presente en 35 individuos. El número promedio de diferencias nucleotídicas por parejas en 600 pb fue de 3,87 bp.

Respecto a la distribución de la composición nucleotídica Ewald (2006) reporta en su investigación en diferentes poblaciones que ésta tuvo un alto contenido de adenina y timina (AT) como se observa en muchos ADN mitocondriales. La citosina ocurrió con una frecuencia de 20,75 %, la timina con 33,10 %, la adenina con 29,8 % y la guanina con 16,35 %.

Los haplotipos hallados por Ewald (2006) fueron 24 para 43 individuos del norte de Amazonas, 50 para 102 individuos en el sur del Amazonas y 41 para 78 individuos la del sur del Brasil. Las poblaciones del norte y el sur del Amazonas compartieron 3 haplotipos, las del norte del Amazonas y del sur del Brasil 5 y las del sur del Amazonas y sur del Brasil 6. Las 3 poblaciones compartieron solo 4 haplotipos, siendo un único haplotipo el #H_3 el más frecuente al ser encontrado en 35 individuos.

Las 3 poblaciones estudiadas por Ewald (2006) mostraron valores altos de haplotipos (diversidad de genes $H = 0,97$) y diversidad nucleotídica ($\pi = 0,0063$ a $0,0065$). Las poblaciones mostraron poca diferenciación medida a través del valor Φ_{st} que fue menor al 5 %, que se debe a una baja estructuración genética de las poblaciones (Wright 1978 citado por Hartl 1987). Los valores más altos fueron encontrados entre las poblaciones de la zona al norte del Amazonas y la zona al sur de Brasil ($0,0393$).

Ewald (2006) también evaluó el grado de estructuración genética dentro y entre las poblaciones de *U. cordatus* usando AMOVA con diferentes composiciones de grupos, la variabilidad más alta se dio entre los individuos de la población (97,44 %), mientras que la variabilidad entre poblaciones fue sólo de 2,56 % con un Φ_{st} de 0,0256.

Ewald (2006) concluyó que en las poblaciones estudiadas usando un fragmento del gen COI de *U. cordatus*, se halló alta diversidad genética y muy baja estructuración genética poblacional, argumentando que el efecto de la migración (flujo génico) fue el factor homogenizador entre las poblaciones; que dicha migración se da en la etapa larval cuando éstas salen al mar y son arrastradas por las corrientes; y que ni siquiera la desembocadura del río Amazonas fue una barrera geográfica que pudiese limitar el intercambio de larvas entre las diferentes zonas.

En todas las investigaciones en que se ha evaluado la diversidad genética y la estructura genética poblacional en *U. cordatus*, se ha determinado que poseen una alta diversidad genética y un bajo nivel de estructura genética poblacional, esto contrasta con el caso de que la única investigación encontrada sobre diversidad genética en *U. occidentalis* (Ratti y Muñoz 2010) han indicado una diversidad baja. Sin embargo, lo más probable es que la diversidad sea alta dado que el flujo génico en estas especies es asegurado por la exportación de larvas que salen al mar y son arrastradas por las corrientes asegurando una adecuada migración lo cual incrementa las posibilidades de mantener una diversidad genética mayor y disminuir la estructuración genética.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Lugar y periodo de ejecución de la investigación.

La investigación se realizó entre los meses de junio a julio de 2012 en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicado en la localidad de Puerto Pizarro en el distrito, provincia y región de Tumbes.

3.2. Tipo y diseño de investigación.

La investigación fue de tipo básica y descriptiva, por cuanto se buscó determinar el valor de las variables independientes de interés: diversidad poblacional y estructura genética poblacional; sin manipular dichas variables.

El diseño de investigación fue no experimental y transversal puesto que la evaluación de las variables se realizó en un solo momento.

3.3. Población y muestra de estudio.

La población en estudio correspondió a la población de cangrejos del manglar (*Ucides occidentalis*) que habitan el ecosistema de manglar de Tumbes, que en base a los datos reportados por Ordinola, Montero y Gonzales (2010) se pudo inferir que para el año 2012, la población podría ser de 57,5 millones.

Teniendo en cuenta que el interés de la investigación fue determinar la diversidad genética, la cual se evalúa en principio mediante la frecuencia de haplotipos, y teniendo como base el estudio realizado por Ratti y Muñoz (2010) quienes encontraron una frecuencia de 10 % de haplotipos en *U. occidentalis* en Guayaquil, se pudo inferir que la probabilidad de hallar haplotipos (p) sería de 0,10 y aplicando la fórmula para el tamaño de muestra en base a proporciones y para poblaciones finitas se obtuvo el siguiente tamaño muestral:

$$n = \frac{Z^2 \cdot N \cdot p \cdot q}{(N-1) \cdot \delta^2 + Z^2 \cdot p \cdot q}$$

Donde:

n = tamaño de muestra

Z = valor de la tabla normal con $\alpha = 5 \%$, equivale a 1,96.

N = tamaño poblacional: 57 500 000 cangrejos

δ = Error de estimación: 0,10

p= Proporción de haplotipos = 0,10

q= 1- p= 0,90

Al calcular el tamaño muestral se obtuvo: n = 35

Dado que la muestra se tomó en 3 zonas, y para tener un número similar de individuos muestreados para cada zona, se fijó en principio el tamaño de muestra en 36 individuos (12 por cada una de las 3 zonas).

Las zonas de muestreo correspondieron a las 3 áreas principales del manglar de Tumbes, que son muestreadas periódicamente por el Laboratorio Costero Tumbes del Imarpe y que son: zona norte (Zarumilla), zona centro (Puerto Pizarro) y zona sur (Corrales).

De cada zona de muestreo se planificó obtener 12 cangrejos, pero en realidad se obtuvieron entre 18 a 19 cangrejos. Se señala adicionalmente que de cada zona de muestreo se seleccionaron 3 estaciones de recolección como se especifica en la tabla 1 y la figura 2.

Tabla 1. Ejemplares de *U. occidentalis* recolectados por estación de muestreo

Zona	Canal de marea o isla	Coord geográficas		Coord UTM		Ejemplares recolect.
		Latitud	Longitud	X(m)	Y(m)	
Norte (Zarumilla)	Zarumilla	03° 26' 36,5" S	80° 16' 05,2" O	581297	9619357	7
	El Algarrobo	03° 26' 44,6" S	80° 15' 49,4" O	581784	9619108	6
	Isla Matapalo	03° 26' 19,8" S	80° 16' 43,3" O	580122	9619871	6
Centro (Puerto Pizarro)	Jelí	03° 29' 37,5" S	80° 22' 16,2" O	569846	9613807	6
	Isla El Tanque	03° 30' 07,4" S	80° 23' 56,1" O	566763	9612891	6
	El Monteo	03° 30' 53,0" S	80° 25' 16,4" O	564284	9611493	6
Sur (Corrales)	La Chepa	03° 33' 50,1" S	80° 31' 31,2" O	552718	9606061	6
	Corrales	03° 33' 11,7" S	80° 31' 06,4" O	553483	9607240	6
	Corrales	03° 32' 32,8" S	80° 30' 49,6" O	554002	9608434	6
Total						55

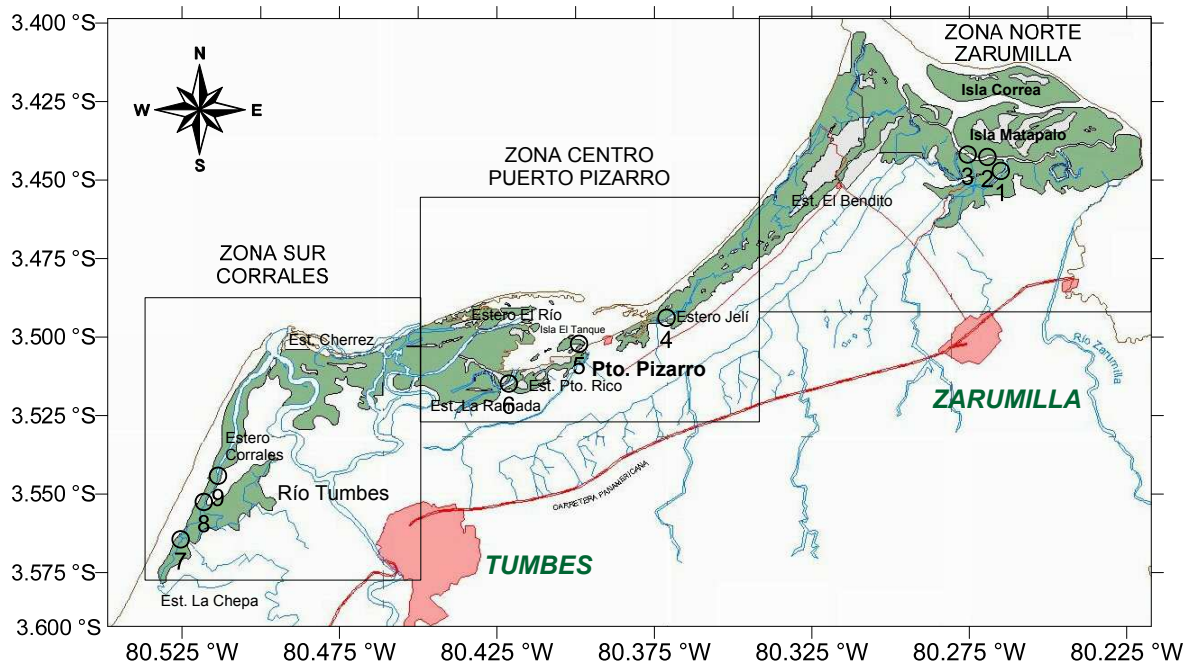


Figura 2. Mapa del manglar tumbesino señalando las 9 estaciones de muestreo.

3.4. Métodos.

3.4.1. Obtención de ejemplares de *U. occidentalis*

Las estaciones de muestreo fueron ubicadas con la ayuda de un GPS. La recolección de cangrejos *U. occidentalis* se realizó en el periodo en que la marea bajaba y estuvo a cargo de un recolector (cangrejero) experimentado. De cada estación de muestreo se obtuvo 6 cangrejos *U. occidentalis*, a excepción de la estación 1 del canal de marea de Zarumilla en que se obtuvo 7. Los cangrejos de manglar fueron colocados dentro de bolsas de paño anchovetero (jicras) etiquetadas adecuadamente. Los cangrejos recolectados fueron llevados al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera para la extracción de muestras de hemolinfa y músculo.

3.4.2. Obtención de muestras de hemolinfa de *U. occidentalis*

Se obtuvo muestras de hemolinfa de cada uno de los ejemplares de *Ucides occidentalis* recolectados, para lo cual se siguió una metodología modificada basada en la empleada por Ratti y Muñoz (2010), que consistió en tomar la hemolinfa de cada individuo por medio de una punción con jeringuilla de 5 ml, conteniendo 1 ml de solución de citrato de sodio al 10 %, pH 7,5 en las articulaciones de los quelípedos. Se retiró 1 ml de hemolinfa de cada individuo.

Se colocó 1 ml de la hemolinfa de cada cangrejo en su respectivo microtubo eppendorf de 1,5 ml el que fue rotulado indicando la zona de extracción y el número de ejemplar; la hemolinfa fue colocada en un congelador para su posterior procesamiento.

3.4.3. Obtención de muestras de músculo de *U. occidentalis*

Se obtuvieron muestras del músculo de los ejemplares de *Ucides occidentalis* recolectados, para lo cual se extrajo de cada ejemplar uno de los periópodos o quelípodos y de estos se extrajo una cantidad aproximada de 0,1 g del músculo utilizando un bisturí.

La muestra de músculo se colocó en su respectivo microtubo eppendorf de 1,5 ml conteniendo 1 ml de alcohol etílico al 95 %. El microtubo fue rotulado indicando la zona de extracción y el número de ejemplar para luego ser colocado en un congelador para su posterior procesamiento.

3.4.4. Extracción de ADN

Las 110 muestras obtenidas (1 de hemolinfa y 1 de músculo de cada uno de los 55 ejemplares muestreados) fueron procesadas para extraer el ADN, de acuerdo al siguiente protocolo:

Los tubos eppendorf conteniendo las muestras de hemolinfa fueron centrifugados a 13 000 rpm durante 3 min en una centrífuga marca Sigma modelo 1-15K, la centrifugación tuvo como finalidad sedimentar los hemocitos. Luego, de cada uno de los tubos eppendorf se retiró el sobrenadante dejando en el tubo eppendorf los hemocitos sedimentados a los que luego se agregó 500 µl de solución CTAB y se homogenizó.

En el caso de los tubos conteniendo muestras de músculo, éstos fueron homogenizados dentro sus mismos tubos, usando maceradores de acero esterilizados.

Ambos tipos de muestras: hemolinfa y músculo posteriormente fueron procesados como sigue:

Se agregó 2 µl de proteinasa K (895 U/ml; 19,6 mg/ml marca Fermentas) a cada uno de los microtubos eppendorf, se les colocó seguros metálicos en sus tapas para evitar que éstas se abran con el calor, luego se les incubó en un equipo de baño maría marca Bionet modelo BM5, a 55 °C durante 2 h. Pasado este tiempo se retiraron los tubos eppendorf y se les adicionó 1 µl de ARNasa a cada uno. Los tubos eppendorf fueron nuevamente incubados a 55 °C en el baño maría durante 10 min. Transcurrido dicho tiempo se agregó a cada tubo eppendorf: 300 µl de fenol saturado marca Invitrogen y 300 µl de cloroformo/alcohol isoamil marca Merck, y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min.

En cada uno de los tubos eppendorf centrifugados se formaron 3 fases; la fase superior (el sobrenadante) se recuperó y se colocó en un nuevo tubo eppendorf etiquetado de la misma manera que el tubo original. Luego se agregó a cada uno de estos nuevos tubos, solución de cloroformo/alcohol isoamil en igual proporción que el sobrenadante recuperado, y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min.

De cada tubo eppendorf centrifugado, se recuperó cierto volumen del sobrenadante (no menos de 150 µl) que fue colocado en un nuevo tubo eppendorf etiquetado de la misma manera que el tubo del que se retiró el sobrenadante; en cada uno de estos nuevos tubos se adicionó alcohol al 95 % helado, en cantidad equivalente al doble del volumen del sobrenadante recuperado. Se homogenizó el contenido de cada tubo eppendorf y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min; luego de lo cual se observó que en el fondo de cada tubo eppendorf se formó un *pellet* de ADN. Se eliminó el líquido sobrenadante, dejando el *pellet* en el fondo del tubo eppendorf, luego se le agregó 1 ml de etanol al 75 % para realizar el lavado del ADN. Se centrifugó los tubos eppendorf a 10 000 rpm durante 2 min y se descartó el sobrenadante, dejando el *pellet* de ADN con la menor cantidad

posible de líquido. Posteriormente se dejó secar el *pellet* de ADN manteniendo el tubo eppendorf destapado en una gradilla a temperatura ambiente durante al menos 10 min. Finalmente se resuspendió el *pellet* de ADN en 50 µl de solución TE 1X y se almacenó en un congelador vertical a -20 °C.

3.4.5. Amplificación del fragmento del gen COI por PCR.

De las 110 muestras de ADN extraídas, se seleccionaron 56 muestras para amplificar el fragmento del gen COI, para ello se tomaron de 5 a 8 muestras de ADN de la hemolinfa por cada estación de muestreo y en el caso de la zona de Corrales, también se seleccionaron 2 a 3 muestras de ADN del músculo.

Luego se calculó el número de reacciones necesarias para realizar la amplificación, siendo éste el número de muestras de ADN extraído que se debió amplificar al que se le adicionó una reacción más para el control negativo y otra para el control positivo. El volumen de *mix* (mezcla de reactivos) para realizar la amplificación se obtuvo multiplicando el número de reacciones antes calculado por los volúmenes de reactivos que se especifican en la tabla 2.

Tabla 2. Volumen de reactivos para preparar el *mix* necesario para una reacción de la PCR

Reactivo	Volumen(µl)
Agua ultra pura	16,75
Solución buffer 10X PCR RXn buffer (no incluye MgCl ₂) marca Invitrogen	2,50
MgCl ₂ (10 mM marca Invitrogen)	2,50
Mix de dNTP (desoxinucleótidos trifosfato) (10 mM marca Fermentas)	0,50
BSA (albúmina de suero bovino)	1,00
<i>Primer</i> directo LCO1490 (10 pMol/µl)	0,50
<i>Primer</i> inverso HCO2198 (10 pMol/µl marca Fermentas)	0,50
<i>Taq</i> polimerasa (5 U/ µl marca Invitrogen)	0,25
Total	24,50

La amplificación del ADN se realizó en un termociclador marca Techne modelo FTC3102D programado como se aprecia en la tabla 3:

Tabla 3. Programación del termociclador

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Pre desnaturalización	95	5 min	1
Amplificación			40
Desnaturalización	94	30 s	
Hibridación	50	45 s	
Polimerización	72	1 min	
Polimerización final	72	7 min	1

3.4.6. Electroforesis.

Las 56 muestras en las que se realizó la amplificación del fragmento del gen COI mediante PCR, fueron sometidas a la electroforesis a fin de verificar si hubo o no amplificación, para lo cual se siguió el siguiente protocolo:

La migración de los amplicones se realizó en geles de agarosa al 2 % conteniendo 5 µl de bromuro de etidio, se utilizó como tampón de migración, 120 ml de TAE 1X y 2 µl de tampón de depósito al cual se agregó 10 µl de cada amplicón procedentes de la PCR. La migración se realizó a 68 V durante 30 min.

Los geles fueron visualizados utilizando un transiluminador marca UVP modelo White/UV, luego se realizaron fotografías digitales del mismo.

3.4.7. Secuenciación del ADN.

De las 56 muestras de ADN que se procesaron en la PCR, 52 fueron exitosamente amplificadas, de estas últimas se seleccionaron 45 para ser enviadas para el secuenciamiento del ADN, para lo cual se retiró 20 µl del producto obtenido por amplificación en la PCR y de los *primers* correspondientes, estos fueron colocados en tubos eppendorf de 0,5 ml y empacados en hielo seco para ser enviados a la empresa Macrogen en Maryland (EE.UU.) la que brindó el servicio de secuenciamiento del ADN.

Los resultados del secuenciamiento del ADN realizado por Macrogen fueron recibidos vía email; de las 45 muestras enviadas, solo 42 pudieron ser secuenciadas adecuadamente.

3.5. Recolección de datos.

De cada uno de los 55 ejemplares de *U. occidentalis* recolectados se registró: zona y estación de muestreo, así también, en el caso de las 42 muestras de ADN que fueron secuenciadas exitosamente, se registró la correspondiente secuencia de ADN del fragmento del gen COI amplificado. Estos datos se colocaron en una hoja de Excel.

3.6. Procesamiento y análisis de datos.

Las 42 secuencias nucleotídicas del fragmento del gen COI correspondientes a ejemplares de *U. occidentalis*, fueron alineadas entre sí utilizando el algoritmo ClustalW implementado en el software Mega versión 5 (Tamura et al. 2011).

Posteriormente se alineó dichas secuencias contra 2 secuencias reversas complementarias de cadenas antisentido del fragmento del gen COI de *U. occidentalis* (números de acceso de GenBank: JX524479 y JX524480) dichas secuencias fueron amplificadas utilizando los *primers* de Folmer et al. (1994) y se obtuvieron en un análisis previo realizado

por el autor a 2 ejemplares de *U. occidentalis* en octubre de 2011. La alineación contra estas 2 secuencias permitió descartar nucleótidos no confiables en el extremo 3' y 5' de las secuencias investigadas, quedando reducidas cada una de las 42 secuencias de ADN a 543 pb.

Las secuencias fueron analizadas en Mega 5 y DnaSP 5.0, para determinar la composición nucleotídica.

Las secuencias recortadas y alineadas fueron verificadas contra la base de datos de GenBank (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando el software en línea Nucleotide Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Zhang et al. 2000), buscando verificar si dichas secuencias tuvieron similitud con fragmentos del gen COI de organismos emparentados que estuvieron registrados en dicha base de datos.

A continuación las secuencias alineadas en Mega 5 fueron exportadas en formato mega y analizadas usando DnaSP 5.0 obteniendo el número de haplotipos (Nh), la diversidad de haplotipos (h), la diversidad nucleotídica (π), estos mismos datos fueron exportados a GenAlex 6 (Peakall and Smouse. 2006) de donde se obtuvo la matriz de distancia genética de Nei (Nei and Li 1979; Nei and Tajima 1981; Nei 1987 citado por Thawnon et al. 2004).

La existencia de estructura genética poblacional se evaluó comparando la varianza genética entre y dentro de poblaciones haciendo uso del análisis molecular de varianza (AMOVA), así también se evaluó la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica mediante el test de Mantel, ambos análisis se procesaron utilizando el software GenAlex versión 6 (Peakall and Smouse. 2006).

Las 42 secuencias del fragmento del gen COI de *U. occidentalis* figuran en el anexo 1. Estas fueron enviadas a GenBank, habiéndoles sido asignado los números de acceso: JX564556 - JX564597 (tabla 12 del anexo 2).

4. RESULTADOS

4.1) AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DEL GEN COI

En la tabla 4 se observa el número de muestras de ADN que fueron extraídas de hemolinfa y músculo de *U. occidentalis*, así como aquellas que fueron amplificadas exitosamente y las que no lo fueron. La mayor parte de las muestras (52 de 56) pudieron ser amplificadas exitosamente, mientras que sólo 4 no pudieron serlo. Se debe mencionar que en el caso de la zona de Corrales, se migraron muestras del fragmento del gen COI aisladas de la hemolinfa y del músculo mientras que en el resto de las zonas (Zarumilla y Puerto Pizarro) sólo se realizó la migración con muestras de hemolinfa.

Tabla 4. Muestras de ADN de *U. occidentalis*, extraídas, amplificadas y no amplificadas según lugar de muestreo

Zona	Canal de marea o isla	Código	N ° de muestras de ADN		
			Extraídas	Amplificadas exitosamente	No amplificadas
Norte (Zarumilla)	Zarumilla	ZZ	6	6	0
	El Algarrobo	ZA	6	5	1
	Isla Matapalo	ZM	6	6	0
Centro (Puerto Pizarro)	Jelí	PJ	5	5	0
	Isla El Tanque	PT	5	5	0
	El Monteo	PM	5	5	0
Sur (Corrales)*	La Chepa	CP	8	7	1
	Corrales	C.1	8	6	2
	Corrales	C.2	7	7	0
Total			56	52	4

* En el caso de las muestras de la zona de Corrales, se amplificó muestras de hemolinfa y de músculo

En la figura 3, se observan los geles de agarosa en los que se realizó la migración de los amplicones (fragmentos de ADN amplificado de aproximadamente 681 pb a 691 pb) obtenidos de las muestras de ADN de cada una de las zonas de muestreo. En la figura, Los códigos de las muestras corresponden a aquellos que se hallan en la tabla 4, mientras que el número que acompaña a dichos códigos indica el número de individuo que fue recolectado en dicha zona. Se aprecia que en la

mayoría de muestras migradas (52 de 56) hay una banda fluorescente indicando la presencia de un amplicón, sin embargo, hay 4 muestras que no fueron amplificadas y no migraron (careciendo de banda fluorescente), es el caso de las muestras ZM3 (individuo 3 de la Isla Matapalo en Zarumilla), C1.2 (individuo 2 de la estación 1 en Estero Corrales), C1.3 (individuo 3 de la estación 1 en Estero Corrales), CP1 (individuo 1 del estero La Chepa en Estero Corrales). En la misma figura las muestras etiquetadas con códigos subrayados corresponden a muestra de ADN obtenidos del músculo, mientras que los códigos no subrayados corresponden a muestras de ADN de la hemolinfa.

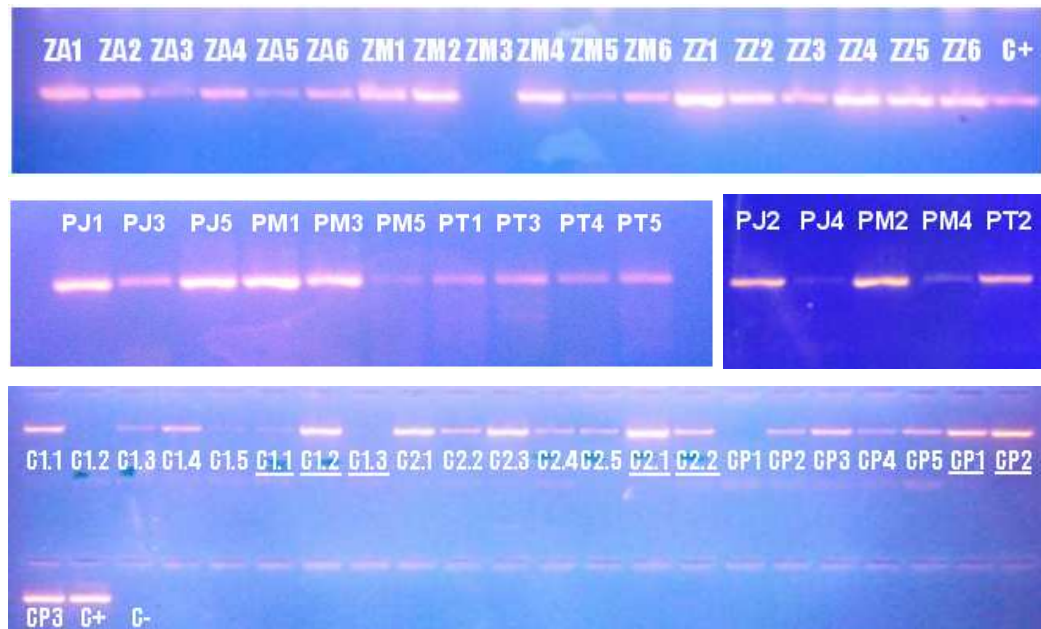


Figura 3. Geles de agarosa mostrando los amplicones de aproximadamente 681 pb a 691 pb correspondientes al fragmento del gen COI amplificado de 48 cangrejos (*U. occidentalis*). Los códigos están compuestos por el primer carácter que indica la zona: P=Puerto Pizarro, C=Corrales, Z= Zarumilla; el 2do carácter indica la estación de muestreo. Los códigos subrayados indican muestras obtenidas del músculo y los no subrayados, muestras obtenidas de la hemolinfa. C+ es el control positivo y C- el control negativo.

4.2. VERIFICACIÓN DE LA IDENTIDAD DEL FRAGMENTO DEL GEN COI

En la tabla 5, se aprecian los principales parámetros que caracterizan a las 42 secuencias de ADN de *U. occidentalis* alineadas y procesadas, estas tuvieron una longitud de 543 pb y dentro de estas se encontró 501 posiciones invariables o monomórficas siendo las restantes 42 posiciones de tipo variables o polimórficas. Es importante señalar que no se detectó ningún *gap* o brecha en la alineación, lo cual es un indicador de una adecuada alineación. En esta misma tabla se muestra que la composición porcentual de nucleótidos de las secuencias indica un bajo nivel de citosina y guanina y un nivel más elevado de adenina y timina.

En la tabla 5 también se aprecia que la secuencia del fragmento del gen COI codifica para un polipéptido de 180 pb y no tiene ningún codón de detención, lo que indica que es muy probable que la secuencia codifique para algún tipo de proteína.

Tabla 5. Características de las secuencias del fragmento de COI de *U. occidentalis*

Parámetro	Valor
Longitud en pares de bases (pb)	543
Posiciones invariables (monomórficas)	501
Posiciones variables (polimórficas)	42
Número de <i>gaps</i> (brechas)	0
Composición porcentual de nucleótidos	
Porcentaje de adenina (A)	30,3
Porcentaje de citosina (C)	20,7
Porcentaje de guanina (G)	15,4
Porcentaje de timina (T)	33,5
Polipéptido traducido	
Longitud (número de aminoácidos)	180
Codones de detención (<i>stop codons</i>)	0

En la Tabla 6, se observa el resultados de la búsqueda de las 42 secuencias de 543 pb de ADN correspondientes al fragmento del gen COI de *U. occidentalis* en la base de datos del GenBank, aquí se aprecia que todas las secuencias que tienen la mayor similitud con las secuencias de ADN obtenidas en esta investigación, corresponden a fragmentos del gen COI o del genoma mitocondrial, del cual forma parte también dicho gen, con lo que se tiene que las secuencias amplificadas de *U. occidentalis* correspondieron al gen COI.

Tabla 6. Secuencias de ADN de la base de datos de GenBank que presentan el mayor índice de identidad (%) con las 42 secuencias de ADN del fragmento del gen COI de *U. occidentalis*

Especie	Zona del ADN	Identidad (%)
<i>Neosarmatium meinerti</i>	Fragmento del gen COI	87
<i>Xenograpsus testudinatus</i>	Genoma mitocondrial completo	86
<i>Xanthias teres</i>	Fragmento del gen COI	86
<i>Uca arcuata</i>	Fragmento del gen COI	86
<i>Uca</i> sp.	Fragmento del gen COI	86
<i>Uca argillicola</i>	Fragmento del gen COI	86
<i>Uca herradurensis</i>	Fragmento del gen COI	85
<i>Uca lactea lactea</i>	Fragmento del gen COI	85
<i>Uca vocator</i>	Fragmento del gen COI	85
<i>Uca insignis</i>	Fragmento del gen COI	86
<i>Uca herradurensis</i>	Fragmento del gen COI	85

De igual manera se aprecia en dicha tabla que la especies registradas en la base de datos y cuyas secuencias de ADN que tuvieron mayor similitud con las secuencias evaluadas, corresponde a crustáceos braquiuros, la mayoría de los cuales son del género *Uca* correspondiente a la familia Ocypodidae, que es la misma familia a la cual pertenece *U. occidentalis*.

4.3) DIVERSIDAD GENÉTICA POBLACIONAL

Los parámetros de diversidad genética obtenidos en base a las 42 secuencias del fragmento del gen COI de *U. occidentalis* se muestran en la tabla 7, aquí se aprecia un número particularmente elevado de haplotipos: 30, teniendo en cuenta que el número de individuos analizados fue de sólo 42, esto indica una alta variabilidad, de igual manera se aprecia que el haplotipo más frecuente sólo se ha hallado en 6 individuos de los 42 muestreados con una frecuencia de 14,29 %, lo cual demuestra un alto nivel de polimorfismo de *U. occidentalis*.

Respecto a la diversidad medida a nivel de nucleótidos, se aprecia en la tabla 7 que el promedio de diferencias nucleótidas fue de 4,396 nucleótidos en la secuencia de 543 pb. La diversidad nucleótida (π) fue de 0,00810, estos valores también muestran un alto nivel de diversidad en el fragmento del gen COI de *U. occidentalis* evaluado.

Tabla 7. Principales parámetros de diversidad genética obtenidos en base a las 42 secuencias del fragmento del gen COI de *U. occidentalis*

Parámetro	Valor
Haplotipos	
Número de haplotipos (h)	30
Número de individuos con el haplotipo más frecuente	6
Frecuencia (%) del haplotipo más frecuente	14,29
Diversidad de haplotipos (Hd)	0,9721
Nucleótidos	
Número promedio de diferencias en nucleótidos	4,396
Diversidad nucleótida (π)	0,00810

En la tabla 8, por su parte, se muestra la distribución de los haplotipos según las zonas evaluadas. Como se observa, sólo 3 haplotipos (Hap2, Hap3 y Hap5) están presentes simultáneamente en las 3 zonas de estudio; mientras que sólo 2 haplotipos están en 2 zonas (Hap6 en las

zonas de Zarumilla y Corrales, y Hap9 en las zonas de Puerto Pizarro y Corrales), el resto de haplotipos (25) se hallan distribuidos en una sola zona muestreada. Los sitios variables que diferencian a los haplotipos se muestran en la tabla 13 del anexo 3.

Tabla 8. Frecuencia de haplotipos del gen COI en *U. occidentalis* según zona de muestreo

Haplotipo	Frecuencia							
	Zona norte Zarumilla		Zona centro Puerto Pizarro		Zona sur Corrales		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Hap1	0	0,00	0	0,00	1	7,69	1	2,38
Hap2	1	5,88	1	8,33	1	7,69	3	7,14
Hap3	1	5,88	2	16,67	3	23,08	6	14,29
Hap4	0	0,00	0	0,00	1	7,69	1	2,38
Hap5	1	5,88	1	8,33	1	7,69	3	7,14
Hap6	1	5,88	0	0,00	1	7,69	2	4,76
Hap7	0	0,00	0	0,00	1	7,69	1	2,38
Hap8	0	0,00	0	0,00	2	15,38	2	4,76
Hap9	0	0,00	1	8,33	1	7,69	2	4,76
Hap10	0	0,00	0	0,00	1	7,69	1	2,38
Hap11	0	0,00	1	8,33	0	0,00	1	2,38
Hap12	0	0,00	1	8,33	0	0,00	1	2,38
Hap13	0	0,00	1	8,33	0	0,00	1	2,38
Hap14	0	0,00	1	8,33	0	0,00	1	2,38
Hap15	0	0,00	1	8,33	0	0,00	1	2,38
Hap16	0	0,00	1	8,33	0	0,00	1	2,38
Hap17	0	0,00	1	8,33	0	0,00	1	2,38
Hap18	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Hap19	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Hap20	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Hap21	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Hap22	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Hap23	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Hap24	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Hap25	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Hap26	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Hap27	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Hap28	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Hap29	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Hap30	1	5,88	0	0,00	0	0,00	1	2,38
Total	17	100,00	12	100,00	13	100,00	42	100,00

Adicionalmente analizando la tabla 9, donde se muestra la distancia genética de Nei calculada para cada estación de muestreo, se observa que ésta varió de 0,001 a 0,005 (descartando las distancias de 0 que

representan la distancia genética para la misma estación de muestreo), estos valores son bastante bajos. La mayor distancia genética se encontró entre la estación de muestreo de El Jelí (en la zona de Puerto Pizarro) y la estación de muestreo 1 del estero Corrales (en la zona de Corrales).

Tabla 9. Matriz de distancia genética de Nei según zona y estación de muestreo.

Zona Norte (Zarumilla)			Zona Centro (Puerto Pizarro)			Zona Sur (Corrales)			Estaciones de muestreo
El Algarrobo	Isla Matapalo	Zarumilla	El Jelí	Monteo-La Ramada	Isla El tanque	Corrales 1	Corrales 2	La Chepa	
0,000									El Algarrobo
0,001	0,000								Isla Matapalo
0,002	0,002	0,000							Zarumilla
0,002	0,001	0,002	0,000						El Jelí
0,003	0,001	0,002	0,003	0,000					Monteo-La Ramada
0,003	0,001	0,001	0,002	0,002	0,000				Isla El Tanque
0,002	0,001	0,001	0,005	0,001	0,001	0,000			Corrales 1
0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,002	0,002	0,000		Corrales 2
0,002	0,001	0,002	0,002	0,001	0,002	0,003	0,001	0,000	La Chepa

4.4) ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

El nivel de estructuración genética poblacional de *U. occidentalis* medido a través de un fragmento del gen COI se observa en la tabla 10, como se aprecia la variabilidad genética se encuentra distribuida en un 96 % en las variaciones de los individuos dentro de las poblaciones, en un 4 % entre las poblaciones, consideradas para este caso como las estaciones de muestreo y no existiendo variabilidad cuando se compara las 3 zonas de muestreo. Esto indica que la mayor variabilidad se halla distribuida uniformemente entre los individuos dentro de las poblaciones y la estructuración genética poblacional es muy baja.

Tabla 10. Análisis de varianza molecular de *U. occidentalis* utilizando como marcador el gen COI.

Fuente	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Variación estándar	Porcentaje de la variabilidad
Entre regiones (Zonas)	2	2,739	1,369	0,000	0
Entre poblaciones (estaciones de muestreo)	6	15,530	2,588	0,088	4
Dentro de las poblaciones	33	71,850	2,177	2,177	96
Total	41	90,119		2,266	100

En la tabla 11 se aprecia el test de Mantel basado en 9999 permutaciones, que evalúa la correlación entre las distancias genéticas (medidas en base al fragmento del gen COI) y las distancias geográficas de cada uno de los 42 ejemplares de *U. occidentalis* evaluados, como se observa el coeficiente de correlación de Pearson es casi igual a cero ($r = -0,035$) indicando la no existencia de correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética evaluada. Este valor es estadísticamente significativo puesto que la probabilidad de que se halla obtenido por fluctuación aleatoria es demasiado alta ($P(r_{xy - \text{aleatorio}} \geq r_{xy - \text{data}}) = 0,18$).

Tabla 11. Test de Mantel para evaluar la correlación entre la matriz de distancia geográfica (x) y la matriz de distancia genética (y).

Suma de cuadrados de x	Suma de cuadrados de y	Suma de productos de xy	Coficiente de Pearson para x e y (r _{xy})	P(r _{xy - aleatorio} >= r _{xy - data})
105651,022	294,905	-197,379	-0,035	0,180

En la figura 4 se muestra un diagrama de puntos de las matrices de distancia geográfica (eje x) y distancia genética (eje y), los puntos ploteados son en total 861 que corresponden a la combinación por parejas de cada uno de los 41 ejemplares muestreados.

Sobre dicho diagrama de puntos se ha ploteado la recta de regresión que como se observa tiene un coeficiente de determinación (R^2) de 0,0013 y muestra que no hay ningún tipo de asociación entre las matrices. Los puntos se observan que forman 3 nubes, estas corresponde a las distancias calculadas por parejas para las 3 zonas de muestreo (Zarumilla, Puerto Pizarro y Corrales).

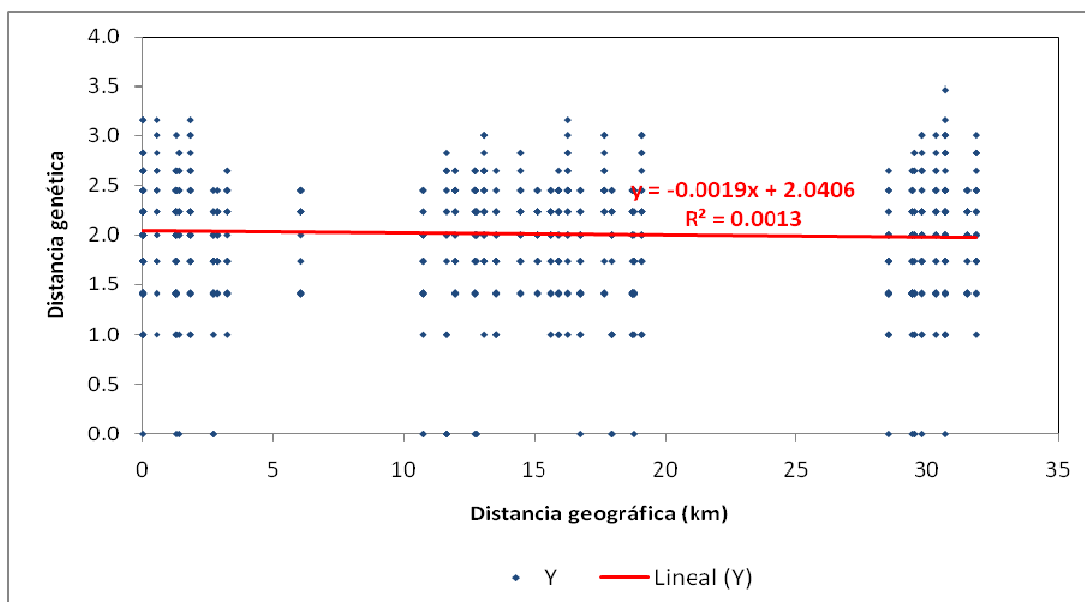


Figura 4. Diagrama de dispersión de las matrices de distancia geográfica y distancia genética. Se muestra la recta de regresión de ambas matrices y el coeficiente de determinación (R^2) el cual indica la no existencia de correlación entre ambas matrices.

5. DISCUSIÓN

La amplificación del fragmento del gen COI en muestras de hemolinfa y músculo de *U. occidentalis* fue exitosa, habiendo sido posible amplificar 52 de las 56 muestras de ADN extraído; esto es consistente con el éxito que se reporta para la amplificación de fragmentos del gen COI utilizando los *primers* de Folmer et al. (1994), es por ello que estos se han designado como *primers* universales, por su capacidad de amplificar el gen COI en una gran variedad de invertebrados, como el cangrejo verde *Carcinus maenas* (Roman and Palumbi 2004), el cangrejo de río *Potamonautes perlatus* (Daniels 2003), el cangrejo de río *Austropotamobius torrentium* (Schubart and Huber 2006) la langosta espinosa de California *Panulirus interruptus* (García and Pérez 2006) e incluso en el cangrejo del manglar brasileño *U. cordatus* (Ewald 2006).

Las secuencias de ADN amplificadas y alineadas tuvieron una longitud de 543 pb poseyendo 501 posiciones invariables o monomórficas, 42 posiciones polimórficas y no teniendo ninguna brecha o *gap* en las mismas; al respecto es adecuado precisar que en el caso del estudio realizado por Ewald (2006), quien estudio la diversidad y estructura genética poblacional del cangrejo del manglar brasileño (*Ucides cordatus*) utilizando un fragmento del gen COI amplificado con los *primers* de Folmer et al. (1994), el mismo que obtuvo secuencias de ADN de aproximadamente 600 pb de longitud, las cuales mostraron 489 posiciones invariables (monomórficas) y 101 posiciones variables (polimórficas), tampoco hubieron brechas o *gaps* en las secuencias investigadas. Los datos reportados por Ewald (2006) muestran ciertas diferencias con respecto a lo encontrado en este estudio, lo cual es justificable teniendo en cuenta que no se tratan de organismos de la misma especie sino de especies distintas, sin embargo, y tal como lo precisó Ewald (2006), el número relativamente alto de posiciones variables (polimórficas) asegura una mayor diversidad y la no existencia de brechas o *gaps* son un buen indicador de que las secuencias son congruentes en sus alineamientos.

La composición porcentual de nucleótidos de las secuencias del gen COI de *U. occidentalis* evaluadas en esta investigación fueron adenina: 30,3 %, citosina: 20,7 %, guanina: 15,4 % y timina: 33,5 % estos valores son muy similares a la composición porcentual del mismo fragmento del gen COI en *U. cordatus* reportada por Ewald (2006) que fue adenina: 29,8 %, citosina: 20,75 %, guanina: 16,35 % y timina: 33,1 %, que muestra menos de 1 % de diferenciación en la composición nucleótida, la composición del gen COI también es bastante similar con otros crustáceos como es el caso del cangrejo de río *Potamonautes perlatus* cuyo gen de COI contiene 35,88 % de adenina, 13,33 % de adenina, 21,52 % de guanina y 29,21 % de timina (Daniels 2003) y del anfípodo *Echinogammarus ischnus*, que tuvo 26,6 % de adenina, 34,9 % de timina, 20,7 % de citosina y 17,8 % de guanina (Cristescu et al. 2004), esto muestra que el gen COI es bastante constante en su composición nucleótida entre los crustáceos.

Respecto a la identidad del fragmento del gen COI en las muestras de *U. occidentalis*, este mostró una similitud de 85 % a 87 % con el gen COI de otros cangrejos entre ellos varios del género *Uca* que corresponde a la misma familia (Ocypodidae) que *U. occidentalis*, estos valores de similitud son bastante parecidos a los reportados por Ewald (2006) para el gen COI de *U. cordatus* quien encontró similitud con genes COI del cangrejo *Portunus trituberculatus* (número de acceso en GenBank: AY303613) con una identidad de 84 % así como con otros crustáceos (*Celuca pugilator* AF466700, *Munida* sp. AY351029, *Gaetice depressus* AF317339, *Pseudocarcinus gigas* AY562127, *Hemigrapsus oregonensis* DQ022526).

La diversidad genética de *U. occidentalis* fue alta, lo que se expresa a través de un elevado número de haplotipos (30 de 42) y del hecho de que existe polimorfismo en este gen, pues el haplotipo más frecuente (Hap3) tuvo una frecuencia de 14,29 %, que es bastante menor que el porcentaje mínimo para declarar monomorfismo que se ha fijado en 95 % (González 2008). El polimorfismo es bastante frecuente en el gen COI como lo han determinado investigaciones como las realizadas por Lapègue et al. (2004), quienes

encontraron que ninguno de los haplotipos determinados mediante la evaluación del gen COI en la ostra portuguesa (*Crassostrea angulata*) sobrepasó el 95 % de frecuencia, con lo que existió polimorfismo; un hecho similar es el reportado por Ewald (2006) en *U. cordatus* quien señala que el haplotipo más frecuente al analizar las secuencias del gen COI alcanzó una frecuencia de 15,7 % con lo que estuvo muy por debajo del 95 % y por lo tanto se determinó polimorfismo para dicho gen.

Respecto a la diversidad de haplotipos (H_d) en el caso de esta investigación, *U. occidentalis* alcanzó una $H_d = 0,9721$ lo que indica una alta diversidad, en forma parecida Stepien et al. (2001) encontraron también alta diversidad haplotípica evaluada en el gen COI en el bivalvo *Congeria kusceri* la cual alcanzó el valor de 0,66; en el caso de la investigación realizada por Ewald (2006), en el gen COI de *U. cordatus* la diversidad de haplotipos fue de 0,97, siendo muy similar a la encontrada para *U. occidentalis* en esta investigación (0,9721), todos estos resultados muestran que la alta diversidad de haplotipos el gen COI es posible en invertebrados.

Otra forma de medir la diversidad genética, es a través de la evaluación de la diversidad nucleótida (π) que para el caso de la presente investigación alcanzó el valor de 0,00810 (0,8 %) para el gen COI de *U. occidentalis*; otras investigaciones también han hallado valores similares en otros invertebrados, cabe señalar a Ewald (2006) quien obtuvo una diversidad nucleótida (π) de 0,0063 a 0,0065 en *U. cordatus*.

Los parámetros de diversidad antes mencionados indican una alta diversidad genética en *U. occidentalis*, lo cual concuerda con varias investigaciones realizadas sobre otros invertebrados y cangrejos, siendo particularmente similar en el caso del estudio realizado por Ewald (2006) en *U. cordatus*

Respecto a la estructura genético poblacional de *U. occidentalis*, en este estudio usando AMOVA se ha determinado que esta es muy baja, pues del 100 % de variabilidad genética, 96 % se da entre los individuos dentro de las poblaciones y sólo 4 % de variabilidad se justifica por las diferencias entre

poblaciones, con lo que se concluye que las poblaciones en las zonas de muestreo estudiadas son bastante similares y poseen baja estructuración genética, estos resultados concuerdan con los realizados por investigadores como Britto et al. (2011) quienes reportaron una baja estructuración poblacional en *U. cordatus* evaluada mediante microsatélites al determinar que 92,2 % de la variabilidad genética se debía a las diferencias entre individuos y sólo el 7,8 % restante se justificaba por las diferencias entre poblaciones; de igual manera el trabajo realizado por Ewald (2006) en *U. cordatus* usando el gen COI muestra que el 97,44 % de la variabilidad genética se halla entre los individuos dentro de las poblaciones con lo que concluye que existe baja estructuración genética poblacional.

Los trabajos realizados por varios investigadores (Ewald 2006; Oliveira 2009; Cottens 2009; Britto et al. 2011) respecto a la estructura genético poblacional de *U. cordatus* en Brasil, han puesto de manifiesto invariablemente la baja estructuración genética poblacional de este cangrejo, tanto Ewald (2006) como Oliveira (2009) han mostrado que incluso poblaciones de cangrejos muy distantes (alejadas por más de 4500 km en la costa del Brasil) muestran poca variabilidad genética entre sus poblaciones, incluso esto se da entre poblaciones que se encuentran a ambos lados de la desembocadura del río Amazonas que podría suponer una barrera geográfica importante para dicha especie, estos autores justifican la falta de estructuración genética poblacional debido al flujo génico que se desarrolla por el transporte de larvas.

La carencia de estructura genética poblacional es explicado también por Britto et al. (2011) argumentando que se debe al flujo génico originado por la eficiente dispersión larval de *U. cordatus*, pues mientras que los estadios de zoea I y zoea II de este cangrejo son eurihalinos, los siguientes no lo son y es por ello que las larvas se ven obligadas a salir a mar abierto. Las larvas permanecen allí por espacio de 20 a 69 días (dependiendo de la temperatura y salinidad) hasta que se transforman en megalopas, mientras que están en mar abierto las larvas pueden ser transportadas por las corrientes (cuya velocidad es de 0,6 a 1,0 m/s) varios miles de kilómetros en un solo mes lo

que permite un intercambio efectivo de genes portados por las larvas, de esta misma opinión es Cottens (2009) quien señala que las poblaciones de *U. cordatus* están conectadas por flujos de larvas por lo que se denominan metapoblaciones meroplanctónicas, pues a pesar de que los adultos no se cruzan directamente pueden presentar una elevada similaridad genética con la consecuente carencia de estructura genética poblacional.

El análisis de Mantel realizado a *U. occidentalis* ha mostrado que la distancia genética no está relacionada con la distancia geográfica, este hecho es respaldado por trabajos como los de Ewald (2006); Oliveira (2009); Cottens (2009); Britto et al. (2011) quienes han reportado que poblaciones de *U. cordatus* distantes más de 4500 km se muestran genéticamente similares, con lo cual evidencian que la distancia geográfica no es un factor que influya en la diferenciación genética tanto de *U. cordatus* como de *U. occidentalis*.

De lo antes señalado se concluye que existe baja estructura genética poblacional en *U. occidentalis* y que este hecho es compatible con los resultados mostrados por otros investigadores para una especie muy emparentada como es *U. cordatus*, de igual manera se demuestra que no existe relación entre la distancia geográfica y la distancia genética en *U. occidentalis*.

6. CONCLUSIONES

1. La diversidad genética de *U. occidentalis* evaluada a través de un fragmento del gen COI en los manglares de la región Tumbes el año 2012 es muy alta de acuerdo a los principales indicadores de diversidad evaluados.
2. La estructura genética poblacional de *U. occidentalis* evaluada a través de un fragmento del gen COI en los manglares de la región Tumbes el año 2012 fue baja según el AMOVA realizado.
3. El test de Mantel, demuestra que no existe correlación entre la distancia geográfica de las zonas de estudio y la distancia genética observada.

7. RECOMENDACIONES

1. Continuar con los estudios genéticos sobre *U. occidentalis* y otros recursos de importancia en la región Tumbes, pues los estudios realizados sobre el particular son demasiado escasos. En particular se debería continuar la investigación empleando otros genes que permitan evaluar la diversidad y estructura genético poblacional como son los marcadores moleculares mitocondriales entre ellos el gen 16S rARN, la región de control (CR) y en el caso de los marcadores moleculares, los microsatélites.
2. Realizar investigación a fin de determinar con precisión el efecto que el flujo génico que se realiza a través de la migración en fase larvaria de *U. occidentalis* tiene sobre la diversidad y estructura genético poblacional.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Arif, I. A. and H. A. Khan. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*. 32.1: 9–17. <http://www.raco.cat/index.php/ABC/article/viewFile/132215/182083>
- Britto, F. B., F. M. Diniz, I. Paterson and P. Bentzen. 2009. Polymorphic microsatellite DNA markers in the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). *Molecular Ecology Resources*. 9: 1249–1252. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2009.02658.x/abstract>
- Britto, F. B., D. S. F. Mendes, M. Ogawa, I. H. A. Cintra and F. M. Diniz. 2011. Single primer-based DNA amplification as a suitable and low-cost tool for assessing genetic diversity in mangrove crabs. *Genetics and Molecular Research* 10 (4): 4084-4092. <http://geneticsmr.com/year2011/vol10-4/pdf/gmr1501.pdf>
- Cook, B., S. E. Bunn and J. M. Hughes. 2007. A comparative analysis of population structuring and genetic diversity in sympatric lineages of freshwater shrimp (Atyidae: Paratya): concerted or independent responses to hydrographic factors?. *Freshwater Biology*. 52: 2156–2171. <http://dbs.umt.edu/courses/biol561/documents/Cooketal2007.pdf>
- Cottens, K. F. 2009. *Efeitos da temperatura, intensidade luminosa e da densidade de cultivo na larvicultura de Ucides cordatus (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda. Brachyura) em laboratório*. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná. <http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/17978/Dissertacao%20Kelly.pdf?sequence=1>

- Cristescu, M. E. A., J. D. S. Witt, I. A. Grigorovich, P. D. N. Hebert and H. J. MacIsaac. 2004. Dispersal of the Ponto-Caspian amphipod *Echinogammarus ischnus*: invasion waves from the Pleistocene to the present. *Heredity*, 92: 197–203. <http://web2.uwindsor.ca/courses/biology/macisaac/pages/Heredity.pdf>
- Daniels, S. R. 2003. Examining the genetic structure among populations of the common cape river crab *Potamonautes perlatus* from river systems in South Africa reveals hydrographic boundaries. *Journal of Crustacean Biology* 23(4): 936–950. <http://decapoda.nhm.org/pdfs/31270/31270.pdf>.
- Ewald, M. 2006. *Isolation and Characterization of Nuclear and Mitochondrial Genetic Markers for Population Studies of Ucides cordatus cordatus (Decapoda: Brachyura)*. Dissertation of Doctor of Natural Sciences, University of Bremen. http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=994613679&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=994613679.pdf
- Excoffier L., P. E. Smouse and J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. 131: 479–491. <http://www.genetics.org/content/131/2/479.full.pdf>
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, AND R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3(5): 294-299. http://www.mbari.org/staff/vrijen/PDFS/Folmer_94MMBB.PDF
- Francisco, A. K. and P. M. Galetti. 2005. Genetic distance between broodstocks of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda, Penaeidae) by mtDNA analyses. *Genetics and Molecular Biology* 28(2):258-261. <http://www.scielo.br/pdf/gmb/v28n2/a14v28n2.pdf>

- García, F. J. and R. Pérez. 2006. Genetic differentiation of the California spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) along the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Marine Biology*. 148: 621–629. <http://www.springerlink.com/content/t81377x576516302/fulltext.pdf>
- González, A. 2008. *Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de Especies Vegetales Amenazadas: Ilex perado ssp. lopezlilloi (Aquifoliaceae), Silene nocteolens (Caryophyllaceae) y Sorbus aria (Rosaceae). Resultados Preliminares*. Trabajo de investigación para culminar el programa de Doctorado. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. <http://acceda.ulpgc.es/bitstream/10553/1941/1/3211.pdf>
- Hartl, D. L., and A. G. Clark. 1997. *Principles of population genetics*. 3rd edition. Sunderland, United Kingdom: Sinauer Associates.
- Henríquez, M. A. 2003. Análisis de diversidad genética de patógenos con énfasis en *Phaeoisariopsis griseola* agente causal de la mancha angular. *Facultad de Ciencias Agropecuarias* 1(1): 30 – 37. <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol1/Art14.pdf>.
- INRENA (Instituto Nacional de Recursos Naturales). 2007. *Plan Maestro del Santuario Nacional de Los Manglares de Tumbes 2007 - 2011*. Lima, Perú: INRENA. <http://sinia.minam.gob.pe/admDocumento.php?accion=bajar&docadjunto=319>
- Khamnamtong, B., S. Klinbunga, and P. Menasveta. 2008. Genetic diversity and geographic differentiation of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in Thailand analyzed by mitochondrial COI sequences. *Biochem Genet.* 47(1-2):42-55. <http://www.springerlink.com/content/186w41645837jpm3/fulltext.pdf>

- Lapègue, S., F.M. Batista, S. Heurtebise, Z. Yu, and P. Boudry. 2004. Evidence for the presence of the portuguese oyster, *Crassostrea angulata*, in Northern China. *Journal of shellfish research* 23(3): 759-763. <http://archimer.ifremer.fr/doc/2004/publication-3173.pdf>
- Moreno, A. 2007. Tamaño efectivo de la población. En *Ecología Molecular*. Ed. Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre, 63-84. México D.F., México: Instituto Nacional de Ecología, Semarnat. http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/descarga.html?cv_pub=530&tipo_file=pdf&filename=530
- Moreno, C. 2001. *Métodos para medir la biodiversidad*. Zaragoza, España: CYTED, ORCYT/UNESCO y SEA. <http://www.sea-entomologia.org/PDF/M&TSEA01.pdf>
- Nei, M. and F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics*. 97:145-163. <http://www.genetics.org/content/97/1/145.full.pdf>.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (10): 5269-5273. <http://www.pnas.org/content/76/10/5269.full.pdf>
- Oliveira, J. F. 2009. *Filogeografía e demografía evolutiva de *Ucides cordatus* (Linnaeus 1763) (decapoda, brachyura) e *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825 (decapoda, brachyura) na costa do Brasil*. Tese de Doutor em Ciências área de concentração Zoologia., Universidade Federal do Paraná. http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/21413/tese_JFON.pdf?sequence=1
- ONU (Organización de las Naciones Unidas). 2011. *Resolución 65/161*. Nagoya, Japón: Departamento de Información Pública de la ONU. <http://www.un.org/es/comun/docs/?symbol=A/RES/65/161>

- Ordinola, E., P. Montero e I. Gonzáles. 2010. *Prospección bio ecológica de cangrejo del manglar (Ucides occidentalis) en la Región Tumbes, 07 al 13 Julio 2009. Informe Técnico Interno del Instituto del Mar Perú.* Tumbes, Perú: Instituto del Mar del Perú.
- Peakall, R. and P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6:288-295. <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Pie, M., J. F. Oliveira, W. A. Boeger, A. Ostrensky, and R. A. Baggio. 2008. The Organization of the Mitochondrial Control Region in 2 Brachyuran Crustaceans: *Ucides cordatus* (Ocypodidae) and *Cardisoma guanhumi* (Gecarcinidae). *Journal of Heredity* 99(4):432–437
- Pierce, J. and P. Gaffney. 2000. Delaware Bay and Chesapeake Bay populations of the horseshoe crab *Limulus polyphemus* are genetically distinct. *Estuaries* 23(5): 690-698. <http://www.jstor.org/pss/1352895>
- PUCP (Pontificia Universidad Católica del Perú). 2011. *Biodiversidad*. Lima, Perú: Instituto de Ciencias de la Naturaleza, Territorio y Energías Renovables. <http://inte.pucp.edu.pe/docs/m3.pdf>
- Ratti, M. F. y M. Muñoz. 2010. *Optimización del sistema AFLP para determinación de la variabilidad genética de Ucides occidentalis en tres zonas de manglar del Golfo de Guayaquil*. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral - Centro de Investigación Científica y Tecnológica. <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10280/1/Optimizaci%C3%B3n%20del%20Sistema%20AFLP%20para%20Determinaci%C3%B3n%20de%20la%20variabilidad.pdf>
- Roman, J. and S. R. Palumbi. 2004. A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. *Molecular*

Ecology. 13: 2891–2898. <http://palumbi.stanford.edu/manuscripts/Roman%20and%20Palumbi%202004.pdf>

Schubart, C. D. and M. G. J. Huber. 2006. Genetic comparisons of german populations of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (crustacea: astacidae). *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 380-381: 1019-1028. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.97.5094&rep=rep1&type=pdf>

Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2011. *Plan estratégico para la diversidad biológica 2011-2020 y las metas de Aichi*. Montreal, Canadá: ONU–CDB–PNUMA. <http://www.cbd.int/doc/strategic-plan/2011-2020/Aichi-Targets-ES.pdf>

Shih, C. H., H. L. Haung, T. J. Chu, Y. C. Lee, C. M. Wang and T. D. Tzeng. 2011. Genetic diversity and historical demography of kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) species complex off China based on mitochondrial DNA analysis. *African Journal of Biotechnology* 10(7): 1065-1072. www.academicjournals.org/AJB/PDF/pdf2011/14Feb/Shih%20et%20al.pdf.

Silva, U. 2007. *Recuperação populacional de caranguejo-uçá, Ucides cordatus (Linnaeus, 1763), através da liberação de formas imaturas em áreas antropicamente pressionadas*. Tese de Doutor em Zoologia, Universidade Federal do Paraná. <http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/10946/Tese%20de%20doutorado%20%20vers%c3%a3o%20final.pdf?sequence=1>.

Solano, F. 2006. *Aspectos pesqueros biológicos y socioeconómicos de la captura de cangrejo rojo (Ucides occidentalis) en los manglares del Ecuador*. Guayaquil, Ecuador: Instituto Nacional de Pesca. http://www.inp.gov.ec/files/67fb77d560_Aspectos%20pesqueros%20biologicos%20y%20socioeconomicos%20cap.pdf

- Solís, L. Y. y A. A. Torres. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares?. *Ciencia y el Hombre* 18(1): 12-13. <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm>
- Stepien, C. A., B. Morton, K. A. Dabrowska, R. A. Guarnera, T. Radja, and B. Radja. 2001. Genetic diversity and evolutionary relationships of the troglodytic living fossil *Congerius kusceri* (Bivalvia: Dreissenidae). *Mol Ecol.* 10(8): 1873-1879. <http://www.utoledo.edu/nsm/lec/pdfs/stepienetal2001.pdf>
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28(10): 2731-9. <http://mbe.oxfordjournals.org/content/early/2011/05/04/molbev.msr121.abstract>
- Thaewnon B., S. Klinbunga, K. Phanwichien, N. Sangduen, N. Lauhachinda, and P. Menasveta. 2004. Genetic diversity and molecular markers in introduced and Thai native apple snails (*Pomacea* and *Pila*). *J Biochem Mol Biol.* 37(4):493-502. http://bmbreports.org/jbmb/jbmb_files/%5B37-4%5D0408031457_493-502.pdf
- Ventura, R. 2006. *Canibalismo e assentamento de formas jovens de caranguejo-uçá, Ucides cordatus (L.) (Crustacea, Brachyura, ocypodidae), em condições de laboratório*. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná. <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/5078/1/Disserta%c3%a7%c3%a3o%20-20Robson%20Ventura%20de%20Souza.pdf>
- Ventura, R., U. Silva, K. Cottens, W. Boeger and A. Ostrensky. 2010. Restocking *Ucides cordatus* (decapoda: ocypodidae): interespecific associations as a limiting factor to the survival of released recruits.

Brazilian Journal of Oceanography, 58(3): 207-212. <http://www.scielo.br/pdf/bjoce/v58n3/v58n3a03.pdf>

Yu L. L., Y. K. Xiao, N. Y. Zi, K. Jie, M. Shen, and M. C. Li. 2009. Genetic diversity and historical demography of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in Yellow Sea and Bohai Sea based on mitochondrial DNA Analysis. *Afr J Biotechnol* 8 (7): 1193–1202. <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/60066/483207751C536.ambra02?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0017828&representation=PDF>

Zhang, Z., S. Schwartz, L. Wagner, and W. Miller .2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7(1-2):203-214.

ANEXOS

DEDICATORIA

A Dios, por quien tenemos la vida y a quien
rendiremos cuentas de nuestros actos.

A cada uno de los miembros de mi familia, y en
especial a mi madre: Merli Cristina Zapata
Torres, por todo el esfuerzo que realizó para
que pueda ser un profesional y quien ha sido y
sigue siendo mi referente y paradigma.

A Johana, mi novia, por todo el tiempo
que dejamos de vernos, para poder
invertir dicho tiempo en la ejecución y
redacción de esta tesis. Gracias por
toda tu comprensión.

AGRADECIMIENTO

A mi asesora: Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña, por su valioso apoyo en la realización de esta tesis.

A los miembros de mi jurado de tesis: Dr. Auberto Hidalgo Mogollón, Mg. Ing. Marco Antonio Zapata Cruz y M.Sc. Oscar Augusto Mendoza Neyra, por sus valiosos aportes y sugerencias que me permitieron mejorar la presente tesis.

Al Ing. Elmer Ordinola Zapata, mi hermano, por su valiosa colaboración en la recolección de las muestras de *U. occidentalis*.

Al personal de la Empresa IncaBiotec S.A.C., Ph. D. Eric Mialhe, Ph. D. Benoit Diringer, Ph.D. Ricardo Avellán e Ing. Beder Ramírez Segura por su apoyo constante con ideas, información bibliográfica e incluso con materiales que se usaron en las fases de extracción, amplificación y secuenciación del fragmento del gen COI.

Un agradecimiento muy especial a mis ex alumnos:

Charles Levi Roque Cortez, hoy personal de IncaBiotec S.A.C., quien brindó un desinteresado apoyo en el trabajo de laboratorio durante la extracción, amplificación y envío de ADN para su secuenciamiento.

Br. Carolina Milena Solano Chávez e Ing. Katherine Yuliana Saavedra Olivos, por todo su valioso apoyo para la extracción y amplificación del ADN.

Al personal directivo, docente y administrativo de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes, por brindar las facilidades necesarias para poder concretar este nuevo paso en mi desarrollo profesional.

A todos mil gracias

ANEXO 1

Muestra: C1-1-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564556

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc ccttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSLL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFM'TTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAI'TMLLTDRNLNTSF

Muestra: C1-3-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564557

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc ccttcattta gccggagat cttctattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSLL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFM'TTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAI'TMLLTDRNLNTSF

Muestra: C1-4-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564558

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc ccttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSLL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFM'TTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAI'TMLLTDRNLNTSF"

Muestra: C1-5-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564559

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattht tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaa
241 aagaggtgta ggaacgggat gaacagtcta tctctcttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 gggagcatct gtggacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aatthttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthttta ggaggagcta ttactatgct tthtaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVKSGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGGAITMLLTDRNLNTSF

Muestra: C2-1-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564560

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattht tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tctctcttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aatthttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthttta gcaggagcta ttactatgct tthtaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAGAITMLLTDRNLNTSF

Muestra: C2-2-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564561

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gctttccac gaataaataa
181 tataagattht tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tctctcttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aatthttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthttta gcaggagcta ttactatgct tthtaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAGAITMLLTDRNLNTSF

Muestra: C2-3-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564562

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcctttccac gaataaataa
181 tataagattht tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tctctcttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttggat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: C2-4-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564563

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tactaggagc cccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattht tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tctctcttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttggat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatact ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: C2-5-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564564

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattht tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tctctcttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttggat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatact ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: CP2-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564565

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactcctcc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatact ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: CP3-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564566

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatact ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: CP4-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564567

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: CP5-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564568

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc tcctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: PJ1-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564569

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtt attcttcttc tcctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatact ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: PJ2-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564570

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: PJ3-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564571

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactcctcc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatact ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: PJ4-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564572

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctc cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttctcc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatact ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: PM1-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564573

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: PM2-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564574

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacccttta tattaggagc tccagatata gctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgctgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSLL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: PM3-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564575

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttctattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSLL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: PM4-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564576

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSLL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: PT1-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564577

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccaaatacct ttatttgtat gagcaatctt cttacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatact ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGI FSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF

Muestra: PT2-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564578

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtggacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cttacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGI FSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF

Muestra: PT3-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564579

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat ggacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcatgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cttacagtc atccttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGI FSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF

Muestra: PT4-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564580

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gctttccac gaataaataa
181 tataagattht tgactccttc ccccatctct atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaatthtctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aatthtataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthttha gcaggagcta ttactatgct tthaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNLWVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGIFFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZA1-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564581

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gctttccac gaataaataa
181 tataagattht tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaatthtctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aatthtataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthttha gcaggagcta ttactatgct tthaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNLWVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGIFFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZA2-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564582

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gctttccac gaataaataa
181 tataagattht tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagga gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaatthtctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aatthtataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthttha gcaggagcta ttactatact tthaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNLWVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGIFFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZA3-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564583

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 gggagcatct gtagacttag gaatthttct cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aatthttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccaaatacct ttatthtgat gagcaattht cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthttta gcaggagcta ttactatgct tthaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGIFFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZA4-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564584

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgactg gtacctctta tattaggagc tccagatata gcctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaatthttct cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aatthttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthttta gcaggagcta ttactatgct tthaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGIFFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZA5-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564585

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcccccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaatthttct cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aatthttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaattht tattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthttta gcaggggcta ttaccatact tthaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGIFFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZA6-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564586

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctca tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagagggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtctta gcaggagcta ttactatgct ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNLWVPLMLGAPDMAFPRMNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZM1-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564587

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagaa gtatagtaga
241 aagagggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatact ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNLWVPLMLGAPDMAFPRMNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZM2-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564588

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attatgattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagagggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNLWVPLMLGAPDMAFPRMNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZM3-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564589

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaatthttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aatthttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gggcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthtta gcaggagcta ttactatgct ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGI FSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZM5-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564590

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaatthttctc cttcattta gccggagat cttctattct
361 aggagcagta aatthttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthtta gcaggagcta ttactatgct ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGI FSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZM6-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564591

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaatthttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aatthttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthtta gcaggagcta ttactatgct ttaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGI FSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPLFV
WAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZZ1-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564592

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgacttcttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagagggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttctattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGI FSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZZ2-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564593

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtaccctta tattaggagc tccagatata gctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagagggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgctgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat catccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccaaatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGI FSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZZ4-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564594

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gctttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacaagaa gtatagtaga
241 aagagggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aattttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatttgtat gagcaatctt cattacagtc attctccttc ttctatcttt
481 accagtttta gcaggagcta ttactatgct ttaaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGI FSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZZ5-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564595

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagtcac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtggacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aatthttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthttta gcaggagcta ttactatgct tthtaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZZ6-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564596

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc caccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtggacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aatthttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthttta gcaggagcca ttactatgct tthtaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

Muestra: ZZ7-LCO1490 Tamaño: 543 bp Número de acceso en Genbank: JX564597

Secuencia de nucleótidos

1 tgaactaagt caaccaggaa gattaattgg caacgaccaa atctataacg tagtagttac
61 agcccacgcc ttcggtataa ttttctttat agttatacca attataattg gaggattcgg
121 aaattgacta gtacctctta tattaggagc tccagatata gcttttccac gaataaataa
181 tataagattt tgactccttc ccccatcttt atctcttctt cttacgagaa gtatagtaga
241 aagaggtgta ggaacaggat gaacagtcta tcctccttta gctgccgcta tcgctcacgc
301 aggagcatct gtagacttag gaattttctc cttcattta gccggagat cttccattct
361 aggagcagta aatthttataa caacagtaat caatatacga tcttatggta taacaataga
421 ccagatacct ttatthtgat gagcaatctt cattacagtc attcttcttc ttctatcttt
481 accagthttta gcaggagcta ttactatgct tthtaactgac cgtaacctaa atacatcatt
541 ctt

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPPSLSL
LTSSMVESGVGTGWTVYPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMDQMPFLV
WAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

ANEXO 2

Tabla 12. Números de acceso en Genbank de las secuencias de ADN del fragmento del gen COI en *U. occidentalis*.

Zona Sur (Corrales)		Zona Centro (Puerto Pizarro)		Zona Norte (Zarumilla)	
Muestra	Número de acceso en GenBank	Muestra	Número de acceso en GenBank	Muestra	Número de acceso en GenBank
C1-1-LCO1490	JX564556	PJ1-LCO1490	JX564569	ZA1-LCO1490	JX564581
C1-3-LCO1490	JX564557	PJ2-LCO1490	JX564570	ZA2-LCO1490	JX564582
C1-4-LCO1490	JX564558	PJ3-LCO1490	JX564571	ZA3-LCO1490	JX564583
C1-5-LCO1490	JX564559	PJ4-LCO1490	JX564572	ZA4-LCO1490	JX564584
				ZA5-LCO1490	JX564585
				ZA6-LCO1490	JX564586
C2-1-LCO1490	JX564560	PM1-LCO1490	JX564573	ZM1-LCO1490	JX564587
C2-2-LCO1490	JX564561	PM2-LCO1490	JX564574	ZM2-LCO1490	JX564588
C2-3-LCO1490	JX564562	PM3-LCO1490	JX564575	ZM3-LCO1490	JX564589
C2-4-LCO1490	JX564563	PM4-LCO1490	JX564576	ZM5-LCO1490	JX564590
C2-5-LCO1490	JX564564			ZM6-LCO1490	JX564591
CP2-LCO1490	JX564565	PT1-LCO1490	JX564577	ZZ1-LCO1490	JX564592
CP3-LCO1490	JX564566	PT2-LCO1490	JX564578	ZZ2-LCO1490	JX564593
CP4-LCO1490	JX564567	PT3-LCO1490	JX564579	ZZ4-LCO1490	JX564594
CP5-LCO1490	JX564568	PT4-LCO1490	JX564580	ZZ5-LCO1490	JX564595
				ZZ6-LCO1490	JX564596
				ZZ7-LCO1490	JX564597

ANEXO 3

Tabla 13. Nucleótidos de las posiciones variables de la secuencias de ADN según haplotipo.

Hap	Cant	Muestra de ejemplo	Sitios variables (nucleótidos de las secuencias de ADN)																																															
			58	106	130	136	139	143	151	163	166	196	199	202	209	214	220	226	229	239	256	262	274	286	298	301	313	352	355	424	442	448	451	460	463	466	469	472	487	492	496	499	505	508						
1	1	ZZ5-LCO1490	C	A	A	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	G	T	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	C	A	T	T	T	G						
2	1	ZZ2-LCO1490	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	T	C	A	A	A	C	A	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	T	G					
3	1	PM2-LCO1490	T	A	A	C	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	T	C	A	A	A	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	T	G					
4	1	ZA6-LCO1490	T	A	A	T	C	T	T	T	C	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	A	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	C	C	A	T	T	T	G					
5	1	C2-4-LCO1490	T	A	A	T	T	C	C	T	T	C	T	C	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	A	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	A						
6	1	C1-1-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	C	C	C	T	C	T	T	A	A	G	A	A	T	C	C	A	A	T	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G						
7	1	ZM1-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	C	T	C	T	C	T	T	A	A	G	A	A	T	C	C	A	A	T	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	A						
8	6	ZM6-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	C	T	C	T	C	T	T	A	A	G	A	A	T	C	C	A	A	T	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G						
9	1	ZM3-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	C	T	C	T	C	T	T	A	A	G	A	A	T	C	C	A	A	T	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G						
10	1	ZA3-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	C	T	C	T	C	T	T	A	A	G	A	A	T	C	C	A	A	T	C	A	A	T	C	A	A	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G						
11	1	PT4-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	C	C	T	C	C	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	T	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G					
12	2	ZA1-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	C	C	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	T	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G					
13	3	ZM5-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	C	C	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	T	T	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G					
14	1	ZZ1-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	C	T	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	T	T	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G					
15	2	PJ3-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	C	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	A	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	A					
16	1	ZZ6-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	A	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	G	T	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	C	T	G					
17	1	CP5-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	C	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	A	C	G	A	C	C	C	T	T	T	C	T	C	A	T	T	G						
18	1	PJ4-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	C	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	A	C	G	A	C	C	C	T	T	C	T	T	C	A	T	T	A						
19	1	ZZ4-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	A	A	G	A	A	T	C	C	A	A	T	C	G	A	C	C	C	T	C	T	T	T	T	C	A	T	T	G					
20	1	ZA2-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	A	G	G	A	A	T	C	C	A	A	A	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	A						
21	1	C1-5-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	G	A	A	G	A	T	C	C	G	G	T	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	G	A	T	T	G					
22	1	ZA5-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	C	C	C	A	A	A	C	G	A	T	T	C	T	T	T	T	T	T	C	G	T	C	A					
23	1	PT1-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	A	C	A	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	A					
24	2	CP3-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	A	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	A				
25	1	PJ1-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	A	C	G	A	C	C	T	T	T	T	C	T	C	A	T	T	A						
26	3	ZZ7-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	T	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G					
27	1	PT2-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	G	T	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G					
28	1	PT3-LCO1490	T	A	A	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	G	A	G	A	G	T	C	T	A	A	T	C	G	A	C	C	C	C	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G					
29	1	ZA4-LCO1490	T	A	G	T	T	T	T	C	T	C	T	C	T	T	T	A	A	G	A	A	T	C	C	A	A	T	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G					
30	1	ZM2-LCO1490	T	G	A	T	T	T	T	T	T	C	T	C	T	T	T	G	A	G	A	A	T	C	C	A	A	A	C	G	A	C	C	C	T	T	T	T	T	T	C	A	T	T	G					