



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA PESQUERA



TESIS DE PREGRADO

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA
POBLACIONAL DE *Crassostrea iridescens*
UTILIZANDO COMO MARCADORES LOS GENES
COI Y 16S rARN EN TUMBES EL AÑO 2012.**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
PESQUERO

PRESENTADO POR:

Est. Charles Levi Roque Cortez
Est. Alejandrino Ticlihuanca Labán

TUMBES, PERÚ

2012



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA PESQUERA



TESIS DE PREGRADO

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA
POBLACIONAL DE *Crassostrea iridescens*
UTILIZANDO COMO MARCADORES LOS GENES
COI Y 16S rARN EN TUMBES EL AÑO 2012.**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
PESQUERO

PRESENTADO POR:

Est. Charles Levi Roque Cortez
Est. Alejandrino Ticlihuanca Labán

TUMBES, PERÚ

2012

RESPONSABLES

CHARLES LEVI ROQUE CORTEZ

EJECUTOR

ALEJANDRINO TICLIAHUANCA LABÁN

EJECUTOR

Dra. ENEDIA G. VIEYRA PEÑA

ASESORA

Ing. BEDER E. RAMÍREZ SEGURA

COASESOR

JURADO DICTAMINADOR

M.Sc. OSCAR A. MENDOZA NEYRA

PRESIDENTE

ING. ALBERTO ORDINOLA ZAPATA

SECRETARIO

ING. TESSY PERALTA ORTIZ

VOCAL

AGRADECIMIENTO

A DIOS, por su amor infinito, cuidado, fortaleza y la dicha de la vida.

Agradecemos a nuestros familiares: Roque Cortez y Ticliahuanca Labán.

El apoyo profesional a la empresa Incabiotec S.A.C. a través de sus integrantes, Director Científico: Eric Mialhe, y compañeros de trabajo: Emmerik Motte, Benoit Diringer, quienes demostraron su apoyo y colaboración con las actividades realizadas para el desarrollo de la presente tesis.

A nuestros asesores: Dra. Enedia G. Vieyra Peña, Beder E. Ramírez Segura y a los miembros del jurado calificador: MSc. Oscar Mendoza, Ing. Alberto Ordinola e Ing. Tessy Peralta Ortiz por sus observaciones, y recomendaciones para mejorar el presente informe.

Reconocemos la valiosa colaboración brindada por docentes y amigos durante nuestra formación profesional: Mg. Marco Zapata, Ing. Jorge Carrasco, Ing. John Sandoval, Mg. Braulio Morán, Dr. Auberto Hidalgo, Mg. César Poma, Ing. David Saldarriaga, Ing. Martin Amaya Ayala, Dr. Adan Alvarado Bernuy, Mg. Teodoro Seminario Chirinos, Dr. Leocadio Malca Acuña quienes con sus enseñanzas y su acertada orientación, ayudaron a nuestra formación profesional.

DEDICATORIA

A DIOS; por su cuidado y fortaleza en nuestro diario vivir y la dicha de estar con vida.

A ustedes MELCHORA CORTEZ y LUÍS ROQUE, Ronal, Carmen, Janeth, María Isabel quienes me brindaron, su amor, su confianza y su apoyo moral para salir adelante.

A mis abuelos Carmen Medina, quien vive en mi memoria, Mari Santillán y Pedro Cortez con quienes aun puedo compartir la felicidad de llegar a ser un profesional.

Charles L. Roque Cortez.

A mis padres:

Prudencio P. Ticliahuanca Huancas y Gregoria Labán Choquehuanca a mis hermanos y mi primo Luis Miguel Santos Laban quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación, siendo mí apoyo en todo momento.

Alejandro Ticliahuanca Labán

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág
Resumen	14
Abstract	16
I. INTRODUCCIÓN	18
II. MARCO TEORICO	21
2.1. Descripción de <i>Crassostrea iridescens</i>	21
2.2. Diversidad genética	22
2.3. Estructura genética poblacional	24
2.4. Factores que influyen el flujo genético en <i>C. iridescens</i> en el litoral de Tumbes	26
2.5. Marcadores moleculares	27
2.5.1. Marcadores moleculares de ADN mitocondrial	28
2.5.2. Gen de la citocromo oxidasa I	29
2.5.3. Gen de la subunidad 16S ribosómico	30
III. ANTECEDENTES	31
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	35
4.1. MATERIALES	35
4.2. MÉTODOS	37
4.2.1. Lugar y período de ejecución del experimento	37
4.2.2. Toma de muestras de <i>C. iridescens</i>	37
4.2.3. Extracción de AND de acuerdo al protocolo CTAB	39
4.2.4. Amplificación del fragmento del gen COI y 16S rARN	40
4.2.5. Observación de los resultados mediante electroforesis	41
4.2.6. Secuenciación del ADN	43
4.2.7. Análisis de secuencias de los productos amplificados para el fragmento del gen 16S rARN	43
V. RESULTADOS	
5.1. Gen de la citocromo oxidas I de <i>C. iridescens</i>	46
5.2. Gen de la subunidad 16S ribosómico de <i>C. iridescens</i>	46
5.2.1. Identificación de la secuencia	46

5.2.2. Diversidad genética	47
5.2.3. Estructura poblacional	49
VI. DISCUSIÓN	52
VII. CONCLUSIONES	54
VIII. RECOMENDACIONES	55
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
Anexos	64

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Zonas de muestreo	38
Tabla 2. Programación del termociclador para la amplificación del fragmento del gen COI y 16S rARN	41
Tabla 3. Nivel de similitud de las secuencias de ADN del fragmento del gen 16S rARN con secuencias en la base de datos de GenBank	47
Tabla 4. Principales parámetros de la diversidad genética obtenidas en base a las 20 secuencias del fragmento del gen 16S rARN de <i>C. iridescens</i>	48
Tabla 5. Diversidad haplotípica identificadas en las 20 muestras del fragmento del gen 16S rARN.	49
Tabla 6. Matriz de distancia genética de Nei para el fragmento del gen 16S rARN de <i>C. iridescens</i> .	49
Tabla 7. Análisis de varianza molecular de <i>C. iridescens</i> utilizando como marcador en fragmento del gen 16S rARN.	50
Tabla 8. Test de Mantel para evaluar la correlación entre la matriz de distancia genética (y) y la matriz de distancia geográfica (x).	50
Tabla 9. Posiciones de los nucleótidos variables de la secuencias de ADN según muestra	68

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Dirección de las corrientes en las zonas de muestreo	27
Figura 2. Zona costera de la provincia Contralmirante Villar	38
Figura 3. Disección de <i>C. Iridescens</i>	39
Figura 4. Amplificación del fragmento del gen COI	42
Figura 5. Amplificación del fragmento del gen 16S rARN	43
Figura 6. Pictograma obtenido de la secuenciación del fragmento del gen 16S rARN	44
Figura 7. Diagrama de dispersión y recta de regresión de los datos de distancia geográfica y distancia genética de <i>C. iridescens</i>	51

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Secuencias nucleotídicas en 20 ejemplares de <i>C. iridescens</i>	64
Anexo 2. Sitios variables encontrados en los 20 ejemplares de <i>C. iridescens</i>	68

Diversidad y estructura genética poblacional de *Crassostrea iridescens* utilizando como marcadores los genes COI y 16s rARN en Tumbes el año 2012.

Est. Charles Levi Roque Cortez¹
Est. Alejandrino Ticliahuanca Labán¹
Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña²

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar el nivel de diversidad y de estructura genética poblacional existente en las poblaciones de *C. iridescens* en lo largo de la costa de la región Tumbes. La investigación se realizó entre enero a junio del 2012 en 4 bancos naturales de *C. iridescens* en la región de Tumbes: la zona 1 (Nueva esperanza), la zona 2 (Zorritos), la zona 3 (Peña negra), y la zona 4 (Cancas). Se recolectaron 20 ostras (*C. iridescens*), cada una de las cuales se obtuvo muestras del manto; la extracción del ADN se realizó mediante el protocolo del cetil trimetil bromuro amonio (CTAB) antes de la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los *primers* LCO1490 y HCO2198 para el gen mitocondrial subunidad I de la citocromoxidasa (COI) y los *primers* 16Sar-L y 16Sbr-H para el gen de la subunidad 16S del ribosoma mitocondrial (16S rARN). Se obtuvo amplificación de un fragmento de 474 pb del gen 16S rARN. Los análisis de las secuencias con el programa Blast mostraron una similitud de 87 % con las secuencias almacenadas en GenBank correspondientes a fragmentos del gen 16S rARN de especies de ostras. Se determinó un bajo índice de diversidad, 2 haplotipos los cuales uno representa 65 % y se evaluó una diversidad de haplotipos a 0,478 9. La estructura genético poblacional determinada utilizando el análisis de varianza molecular (AMOVA) revela que 38 % de la variabilidad genética se

¹ Estudiantes de la Escuela de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes

² Profesora Principal de la Escuela de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes

dio entre los individuos dentro de las poblaciones y 62 % entre las poblaciones. Estos resultados indican una alta estructuración que se puede explicar por un bajo flujo genético entre poblaciones. Este hipótesis está confortada por el test de Mantel, no existió correlación ($r=-0,032$, $R^2=0,074$) entre la matriz de distancia geográfica y la matriz de distancia genética, concluyéndose que la diversidad genética fue baja y la estructura genética poblacional alta para *C. iridescens* en la costa de la región Tumbes el año 2012.

Palabras clave: *Crassostrea iridescens*, diversidad genética, estructura genética poblacional, COI, 16s rARN

Genetic diversity and genetic populational structure of *Crassostrea iridescens* using molecular markers of COI and 16s rRNA gens in Tumbes at 2012.

Est. Charles Levi Roque Cortez¹

Est. Alejandrino Ticliahuanca Labán¹

Dra. Enedia Graciela Vieyra Peña²

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the level of diversity and genetic structure of the population of the oysters, *C. iridescens* in the region of Tumbes. Works were realized between January and June 2012. Invidious were extracted by artisanal fishery in four natural beds of *C. iridescens* localized in Tumbes region: zone 1 (Nueva Esperanza), Zone 2 (Zorritos), Zone 3 (Peña Negra), and Zone 4 (Cancas). DNA extraction from muscle of twenty oysters of each zone was performed using the protocol of cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) before molecular characterization by polymerase chain reaction (PCR) based on mitochondrial genes: cytochrome oxidase subunit I (COI) using primers LCO1490 and HCO2198 and the gen 16S rRNA with primers 16Sbr 16Sar-L-H. Amplifications of fragment of 474bp were obtained with 16S rRNA gen. Analyses with the software Blast of sequences of fragments amplified showed 87 % of homology with sequences published in GenBank corresponding to fragments of 16S rRNA of species of oysters. A low diversity index was finally measured with 2 haplotypes founded which one represented by 65% and haplotype diversity evaluated at 0, 4789. Genetic structure of population determined using analysis of molecular variance (AMOVA) shows that 38 % of genetic variation occurred among individuals within populations and 62 % between populations. These results that revealed a high structure could be explained by a low gene flow between populations. This hypothesis seems to be confirmed by the Mantel test that determined no correlation ($r = -0,032$, $R^2 = 0,074$) between geographical and genetic distances matrix. It was concluded that genetic diversity was low and the high population genetic structure in *C. iridescens* on the coast of Tumbes region by 2012.

Keywords: *Crassostrea iridescens*, genetic diversity, genetic structure of population, COI, 16s Rrna.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú los estudios sobre diversidad y estructura genética, actualmente son escasos, esto debido a que se necesita equipamiento y el conocimiento sobre técnicas de biología molecular, genética, entre otras. En tal sentido, se desconoce la diversidad genética de muchas especies terrestres y marinas, entre peces, moluscos y crustáceos, siendo estos estudios necesarios para el manejo de especies silvestres, sobre todo si están amenazadas, así como también, cuando se requiere realizar el cultivo de esta especie.

Crassostrea iridescens, es un bivalvo que se distribuye desde el Golfo de California en México hasta el norte del Perú (Frias et al. 1999); en Tumbes, *C. iridescens* se halla distribuida de manera casi continua entre Grau a Huacura y desde Lavejal hasta Punta Sal Grande, encontrándose desde la zona intermareal hasta los 8 m de profundidad adherida a sustratos rocosos o arenos/rocosos (Ordinola et al. 2010). Esta ostra sustenta la pesquería de bivalvos más importante de la región Tumbes, la misma que en el año 2008 representó una captura de 111,8 t, cantidad que solo fue superada por la pesca de peces, langostino (*L. vannamei*) y del cangrejo del manglar (*U. occidentalis*) (IMARPE 2009). Por ser una pesquería comercial, esta especie podría estar siendo sobrexplotada lo que contribuiría a reducir las poblaciones de la misma, por ello se debería considerar la posibilidad de realizar un repoblamiento de esta ostra en el futuro.

C. iridescens tiene un buen mercado local y que potencialmente puede ser utilizada en la acuicultura, pues su cultivo es de interés para el desarrollo de la acuicultura nacional, tal como lo ha señalado PRODUCE (2009) en su Plan Nacional de Desarrollo Acuícola. Toda acuicultura debe iniciarse con la obtención de semillas, las cuales deben ser obtenidas a partir de reproductores extraídos del medio natural, para lo cual es necesario obtener los reproductores con las mejores características, no solo fenotípicas sino fundamentalmente genotípicas; estas características

no han sido aun estudiadas en *C. iridescens* a nivel local e incluso nacional e internacional, por lo que es necesario realizar estudios a nivel genético de este importante recurso.

A pesar de su importancia comercial, existen pocos estudios realizados sobre *C. iridescens*. A nivel local, se ha estudiado solamente su dinámica poblacional y la explotación de la misma (IMARPE 2009), pero no existe aun ningún estudio genético de esta ostra.

Una de las estrategias iniciales para seleccionar los padrotes que permitirán obtener las semillas para el cultivo o repoblamiento de *C. iridescens* es estudiar la variabilidad de genes que se encuentran dentro de la población, la variabilidad intrapoblacional total es lo que se denomina diversidad genética, al mismo tiempo, es necesario determinar si ésta variabilidad, sigue un patrón definido probablemente a nivel geográfico, dicho patrón, es lo que se conoce como estructura genética poblacional. El análisis de tales aspectos, se hace evaluando los individuos, a través de marcadores moleculares, entre ellos los genes mitocondriales de la subunidad I de la citocromoxidasa (COI) y de la subunidad 16S del ARN ribosómico (16S rARN).

Tanto la diversidad genética como la estructura genética poblacional son parámetros que se deben evaluar necesariamente cuando se trata de realizar la caracterización genética, por este motivo se realizó el presente estudio en *C. iridescens* que tuvo como objetivos:

Determinar el nivel de diversidad y de estructura genética poblacional existente en la población de *C. iridescens* en la región Tumbes el año 2012.

Y como objetivos específicos:

1. Determinar el nivel de diversidad y de estructura genética poblacional medida a través de la caracterización del gen COI,

existente en la población de *C. iridescens* en la región Tumbes el año 2012.

2. Determinar el nivel de diversidad y de estructura genética poblacional medida a través de la caracterización del gen 16S rARN, existente en la población de *C. iridescens* en la región Tumbes el año 2012.

II. MARCO TEORICO

2.1. *Crassostrea iridescens*.

Crassostrea iridescens, es un bivalvo que se distribuye desde el Golfo de California en México hasta el norte del Perú (Frias et al. 1999); es conocida a nivel mundial con los nombres de *Striostrea prismatica*, *Crassostrea prismatica*, *Ostrea prismatica* y *Ostrea iridescens*. El género más apropiado para esta especie es *Crassostrea* ya que se trata de una especie ovípara, mientras que las ostras del género *Ostrea* son larvíparas. Estos moluscos se reproducen durante todo el año, pasando por estadios larvales durante 30 días (Ramírez 2007).

En cuanto a la morfología y anatomía de estas ostras, se puede indicar que son moluscos bivalvos, de simetría fundamentalmente bilateral que poseen conchas formadas de dos valvas calcificadas, de formas variables, usualmente alongada y depende principalmente del tipo y forma del sustrato sobre el cual crece. La valva derecha, dorsal o superior es aplanada, de forma irregular oval; la izquierda ventral o inferior es cóncava o excavada y está adherida al sustrato por la mayor parte de la superficie siendo libre y alzada sólo en los bordes, la superficie externa es de color púrpura o bronceada, mientras que la superficie interna es de color aporcelanado blanquecino, a menudo con un lustre iridiscente o metálico. (Barnes 1989; FAO 1995; Lombeida 1997 citados por Ramírez 2007).

Estos moluscos son filtradores, se alimentan de partículas y organismos planctónicos diminutos, los cuales son atrapados cuando la corriente inhalante pasa a través de sus branquias, en las cuales se retienen y son agrupados, para luego ser desplazados hasta la boca. La huella del músculo aductor es grande y reniforme, más o menos central, de color variable, blanquecino hasta café rojizo (Ramírez 2007).

Con respecto a su hábitat se encuentran adheridas principalmente a sustratos rocosos expuestos a influencias directas del agua del mar

abierto y en zonas rocosas localizadas en el rompiente de las olas. Las profundidades en las cuales se pueden encontrar varían desde 0 m hasta los 15 m y las tallas máximas en las cuales se encuentra es de 25 cm, pero lo más común es encontrarlas con tallas de 15 cm (Castillo y García 1984; FAO 1995 citados por Ramírez 2007).

La extracción y comercialización de la ostra de piedra *Crassostrea iridescens* en aguas de jurisdicción de la región Tumbes es una actividad económica de importancia social que es necesario mantener en niveles sustentables, debido a que genera fuentes de empleos e ingresos para las comunidades ribereñas (IMARPE 2008)

2.2. Diversidad genética.

La diversidad genética se origina a nivel molecular en los ácidos nucleicos a partir de las mutaciones en las bases nucleotídicas del mismo individuo, las mutaciones originadas pueden ser eliminadas o fijadas por la selección natural o por procesos aleatorios como es la deriva genética (Moreno 2001).

La diversidad genética es la variedad de alelos (formas alternas de los genes) que ocupan un *loci*, así como su frecuencia relativa entre todos los miembros de una población; dicha diversidad, se puede medir a nivel individual evaluando los alelos que posee el individuo para el gen investigado, también se puede hacer a nivel de la población considerando todo el conjunto de alelos de todos los genomas que forman dicha población, e incluso a nivel de un conjunto de poblaciones, cuando se evalúa la diversidad de alelos entre todos los genomas de todos los individuos que forman parte de dichas poblaciones (González 2008).

La frecuencia génica que es uno de los componentes de la diversidad, se refiere a la proporción en que un alelo de un gen está presente en el conjunto de genomas de un grupo de evaluación (individuo, población o conjunto de poblaciones). Si un individuo es diploide, como ocurre en la mayor parte de animales, es posible que en sus 2 genomas contengan

alelos de igual tipo, con lo que se le denominaría homocigota o de diferente tipo, con lo que se le denominaría heterocigota, se deduce que un individuo que porta dos alelos diferentes, tiene una mayor diversidad de los que porta un solo tipo de alelo. La heterocigosis mide la presencia de individuos heterocigotos en una población y es un buen indicador de diversidad genética (González 2008).

La medición de la diversidad genética de las poblaciones se realiza con la ayuda de marcadores moleculares y utilizando 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 detectados 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* variable 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, dado que existe una diversidad de casos que deben ser analizados. Así la definición primigenia de gen polimórfico señala que posee más de una forma alterna, es decir más de un alelo. En la naturaleza lo más común es que un gen tenga más de un alelo, con lo que casi el 100 % de genes de un individuo serían polimórficos, con lo que esta medida sería inútil. Algunos investigadores han propuesto que se denomine polimórfico a aquel gen, en el cual, aún existiendo más de un alelo, la frecuencia del alelo más frecuente no sobrepase un límite fijado arbitrariamente y que puede ser 95 % o 99 %, es por ello que utilizando estas definiciones el polimorfismo quedaría fijado subjetivamente por valores arbitrarios lo que constituye en sí el principal problema de la medida denominada polimorfismo (González 2008).

Otra medida de la diversidad genética la constituye la heterocigosidad esperada (H_e), la que no debe ser confundida con la heterocigosidad observada (H_o). La heterocigosidad mide la proporción de individuos

heterocigotos para un determinado gen, la heterocigosidad observada mide la cantidad de individuos heterocigotos que se han obtenido en el muestreo, mientras que la heterocigosidad esperada es un valor teórico que se obtiene al estimar la cantidad de heterocigotos que se deberían presentar en la población estudiada si esta siguiese la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg, dicha ley explica que las frecuencias alélicas de una población se mantienen constantes de generación en generación cuando la población está en equilibrio y no actúa ninguna fuerza evolutiva (selección, mutación, migración ni deriva génica). La heterocigosidad esperada por lo tanto es un indicador de cuán bien la población estudiada se ajusta a la ley de Hardy-Weinberg (González 2008).

2.3. Estructura genética poblacional

La estructura genética es la cantidad y la distribución de la variabilidad genética dentro de las poblaciones (Henríquez 2003); en términos prácticos, González (2008) la ha definido como los diferentes tipos de alelos y sus frecuencias en dicha población, indicando 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.

Una población que se reproduce libremente tenderá a tener una diversidad más alta que una población donde la reproducción no sea así, puesto que la libre reproducción asegura a cada uno de los alelos la misma probabilidad de ser heredado a la descendencia con lo cual la diversidad de alelos y por lo tanto la diversidad genética se mantiene amplia, mientras que en aquellas poblaciones donde la reproducción no sea libre (no al azar), ciertos alelos tendrán más probabilidades de heredarse con lo que se harán más frecuentes mientras que los que no se hereden se perderán reduciendo la diversidad genética.

La existencia de comportamiento sexual o de barreras geográficas o de otro tipo que impida el libre cruzamiento o reproducción conducirá a una

reducción de la heterocigosidad, dicha reducción se mide particularmente a través de los estadísticos F de Wright (índices de fijación de Wright), que evalúan la declinación de la heterocigosidad debida a la subdivisión dentro de una población (Hartl and Clark 1997). El valor del índice de fijación va de 0 (si no existe diferenciación entre la población total y sus subpoblaciones) a un máximo teórico de 1 (cuando las subpoblaciones están completamente diferenciadas), cabe señalar que los valores de diferenciación casi siempre están bastante alejados del máximo teórico de 1, siendo y menores alcanzando algunas veces valores máximos reales de 0,15 a 0,25 (Hartl and Clark 1997).

Si bien los índices de fijación dan una noción de la estructura genética de la población al evaluar si existen diferencias a nivel genético entre las subpoblaciones, un mejor método de evaluarla se da a través de la técnica conocida como análisis de varianza molecular (AMOVA) desarrollada por Excoffier, Smouse and Quattro (1992), la que es parecida a un análisis jerárquico de varianza donde 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, siendo que las hipótesis son probadas usando métodos permutacionales.

La estructura genética poblacional se ve influenciada por el flujo génico, que considera el movimiento de alelos a través de la migración de formas adultas, juveniles o larvarias, que en el caso particular de las ostras se daría únicamente en el estadio larval; este flujo a su vez es influenciado por el periodo de tiempo que toma el desarrollo larval desde la fecundación hasta la fijación de la larva, así como por las velocidades y direcciones de las corrientes acuáticas que arrastran a tales larvas.

2.4. Factores que influyen el flujo genético en *C. iridescens* en el litoral de Tumbes

Como se ha mencionado los factores más importantes que afectan el flujo genético en las ostras y en particular en *C. iridescens* son el periodo que toma el desarrollo larval, así como las velocidades y direcciones de las corrientes acuáticas que las arrastran.

Al respecto, Loor (2012), señala que el desarrollo larval de *C. iridescens*, ocurre de la siguiente manera: 10 a 12 h luego de la fecundación el huevo se convierte en larva trocófora, 22 a 24 h después se transforma en larva D; permaneciendo en dicho estadio hasta el octavo día, cuando se convierte en una larva umbonada, luego de 18 a 25 días en larva pediveliger la cual se fija al sustrato convirtiéndose en bentónica. El desarrollo larval por lo tanto toma un tiempo de 20 a 26 días.

Otro de los factores que influyen en el flujo génico son las velocidades y direcciones de las corrientes acuáticas, Ordinola et al. (2010) han señalado que las zonas donde se ubican los principales bancos de *C. iridescens* en el litoral de Tumbes, que son las zonas de Quebrada Charán a Quebrada Bocapán, Quebrada Bocapán a El Rubio y El Rubio a Quebrada Fernández; tienen velocidades de corrientes que fluctúan entre 1,02 a 37,64 cm/s, lo que representa un transporte de entre 800 m/día a 32 km/día, estas velocidades son bastante grandes como para permitir el flujo adecuado de larvas, sin embargo las direcciones de las corrientes no siguen una dirección única, sino que se orientan de formas tales que podrían impedir el libre flujo de las larvas como se aprecia en la figura 1(a).

En dicha figura se aprecia que algunas corrientes en Zorritos, tienden a alejarse de la costa internándose mar adentro (flecha de color violeta), de la misma manera en La Cruz se observa una corriente que también evita el acercamiento de masas de agua de mar adentro hacia la costa (flecha de color rojo), estas corrientes dificultarían el posible traslado de larvas

entre los bancos de las zonas de Zorritos y La Cruz; en la zona de Peña Negra (que se ubica entre Bonanza y Acapulco) figura 1(b), se aprecia que existen corrientes que fluyen en dirección norte, pero una corriente al este de Peña Redonda las corrientes tienden a desplazarse de mar abierto a la costa, esto podría dificultar la migración de larvas en sentido de sur a norte.

Finalmente, en la zona de Cancas, se aprecia en la figura 1(c), que las corrientes cercanas a la playa fluyen en direcciones opuestas, una de ellas en dirección noreste y la otra en dirección suroeste, esto podría dificultar también la migración de larvas puesto que podrían avanzar en un sentido y luego retornar en el sentido opuestos arrastradas por las corrientes.

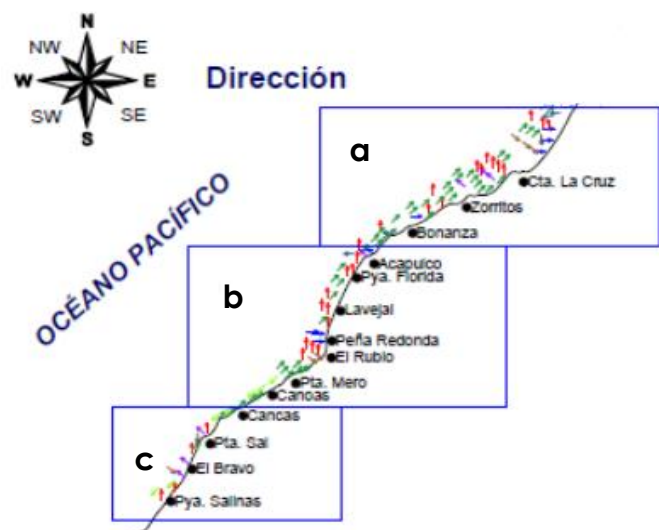


Figura 1. Dirección de las corrientes en las zonas de muestreo: zona a (Quebrada Charán a Quebrada Bocapán), Zona b (Quebrada Bocapán a El Rubio), zona c (El Rubio a Quebrada Fernández)
Fuente: Ordinola et al. (2010).

2.5. Marcadores moleculares:

Los marcadores moleculares corresponden a un conjunto de técnicas que permiten visualizar o indicar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de mutación establecida en las poblaciones a través del tiempo evolutivo (Astorga 2008).

Los marcadores moleculares pueden ser de tipo bioquímico (enzimático) o marcadores de ADN. Al contrario de las características fenotípicas de un individuo que muchas veces dependen de la influencia del ambiente, los marcadores moleculares tienen la ventaja de no depender del ambiente y de poder evaluarse incluso desde los primeros estadios de desarrollo de un individuo, pudiendo obtenerse de todo el individuo o de una parte de éste (Solís y Torres 2005).

En el caso de los marcadores moleculares de ADN, Arif and Khan (2009), han clasificado los marcadores del ADN nuclear en RAPD, AFLP y microsatélites y marcadores del ADN mitocondrial (ADNmt) en 12S rARN, 16S rARN, genes que codifican proteínas (entre ellos el gen COI) y la región de control (CR).

2.5.1. Marcadores moleculares del ADNmt

El ADN mitocondrial de los animales, se organiza como un cromosoma circular de 15 a 17 kpb, que porta 2 genes ribosomales (12S rARN, 16S rARN), 22 genes para ARN de transferencia (ARNT) y 13 genes que codifican proteínas, este ADN es haploide y se hereda vía materna, contando con una alta tasa de mutación y de deriva génica que es superior a la del ADN nuclear (Ewald 2006). Adicionalmente la cantidad de copias de ADN mitocondrial en una célula son varios miles de veces superior a la cantidad de copias del ADN nuclear. Shih et al (2011) menciona que estas características lo hacen útil como fuente de marcadores moleculares.

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 rARN es altamente conservado y por ello se usa para los niveles taxonómicos más altos: *phyla* y *subphyla*; por otro lado el gen 16S rARN se usa para diferenciación en taxos de categoría media tales como familias, mientras que los genes que

codifican proteínas, entre ellos el gen COI están algo 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, a pesar de ello, se dan casos en los cuales el gen 16S rARN ha sido utilizado en estudios a nivel de especies.

2.5.2. Gen de la Citocromo oxidasa I

La citocromo oxidasa (CO) es una enzima mitocondrial que conduce a la formación de ATP. La enzima está formada por 13 subunidades, 3 de las cuales se encuentran codificadas en el ADN de la mitocondria, siendo dichas subunidades: Citocromoxidasa I (COI), Citocromoxidasa II (CO II y Citocromoxidasa III (COIII) (Ewald 2006). El gen que codifica la sub unidad COI es un gen altamente conservado pero tiene regiones de alta tasa de mutación por lo que es utilizado algunas veces para distinguir diferencias genéticas a nivel de individuos (Arif and Khan 2009).

Folmer et al. (1994) diseñaron un juego de *primers* universales para poder amplificar un fragmento del gen COI de 710 pb, para el cual utilizaron secuencias de ADN publicadas de varios invertebrados como: el mejillón azul, la mosca de la fruta, la abeja, el mosquito, la artemia, algunos nematodos, el erizo de mar. El juego de *primers* dio resultados sobre un gran conjunto de invertebrados por lo que se le consideró un juego de *primers* universales. La secuencia nucleotídica de dicho juego de *primers* es:

Primer forward: LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

Primer reverse: HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3'

Los *primers* antes señalados han sido muy utilizados en la evaluación de diferentes estudios sobre el gen COI en diferentes animales como son: el cangrejo verde *Carcinus maenas* (Roman and Palumbi 2004), la ostra portuguesa *Crassostrea angulata* (Foighil et al. 1998; Huvet et al. 2000;

Lapègue et al. 2004), la ostra *Crassostrea ariakensis* (Zhang, Standish and Reece 2005; Wang and Guo 2008), las ostras *Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, y *Saccostrea cucullata* (Klinbunga et al. 2003), la ostra *Crassostrea rhizophorae* (Costa et al. 2010), así como en otras varias especies de ostras asiáticas (Reece et al. 2008), en ostras de los géneros *Crassostrea*, *Saccostrea* y *Striostrea* (Klinbunga et al. 2005).

2.5.3. Gen de la subunidad 16S ribosómico (16S rARN)

El ADN mitocondrial contiene los genes que codifican para las subunidades 12S y 16S de los ribosomas mitocondriales, mientras que el gen de la subunidad 12S es altamente conservado y ha sido ampliamente utilizado para comprender la diversidad genética en los más altos niveles taxonómicos como son los *phyla*, el gen de la subunidad 16S se ha utilizado para estudiar la diversidad genética a nivel medio como son los niveles de familia y género (Arif and Khan 2009), sin embargo se han dado estudios en los cuales se ha evaluado a nivel de especies e incluso intraespecíficas como en el caso de las investigaciones realizadas por Lapègue et al. (2002), Klinbunga et al. (2005), Bendezu, Slater and Carney (2005), entre otros.

La subunidad 16S rARN es un polinucleótido de aproximadamente 1500 nucleótidos y es codificado por el gen *rrs*, a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el 16S rARN se pliega en una estructura secundaria, caracterizada por la presencia de segmento de doble cadena alternado con regiones de cadena sencilla (Neefs et al. 1990 citado en Weisburg et al. 1991). En eucariotas la subunidad 18S rARN es la macromolécula equivalente. Dado que las subunidades 16S rARN y 18S rARN proceden de las subunidades pequeñas de los ribosomas, el acrónimo ARNr SSU (del inglés, *small subunit*) se utiliza para ambos. El gen 16S rARN se utiliza para la filogenética (Weisburg et al. 1991), los ARNr SSU se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen

además variaciones que se concentran en zonas específicas (Woese et al. 1985 citado en Weisburg et al. 1991).

Existen varios *primers* que han sido diseñados con el fin de amplificar fragmentos del gen 16S rARN de la mitocondria animal, uno de los más utilizados es el juego de *primers* diseñado por Palumbi et al. (1991):

Primer forward: 16Sar-L 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'

Primer reverse: 16Sbr-H 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'

Estos *primers* han sido muy utilizados en la evaluación de la diversidad genética de múltiples animales, como por ejemplo: nudibranquios (Tholleson 1999), camarones y langostas del fango de la familia Thalassinidea (Tudge and Cunningham 2002) la ostra *Crassostrea rivularis* (Tian et al. 2004).

III. ANTECEDENTES

El uso de marcadores moleculares basados en ADNmt, para evaluar la diversidad genética de moluscos bivalvos es bastante frecuente, así se tiene que Stepien et al. (2001) secuenciaron los genes mitocondriales COI y 16S rARN en el bivalvo *Congerius kusceri* encontrando una diversidad haplotípica de 0,66 y 0,50 respectivamente para cada gen, a pesar de una ligera diferencia entre los 2 genes estudiados estos resultados revelaron una variabilidad intraespecífica relativamente alta a pesar que provinieron de una población pequeña y aislada.

En otros estudio, Mahidol et al. (2007), utilizaron el método de secuenciación de la región mitocondrial 16S rARN en el bivalvo *Pleuronectes amusium* encontrando en promedio un 23,45 % de variabilidad genética en las 7 poblaciones estudiadas a lo largo de la costa de Tailandia.

En el caso de las especies del género *Crassostrea*, En un estudio realizado por Lapègue et al. (2004) en poblaciones de ostra portuguesa (*C. angulata*), en el norte de China, se evaluó el gen COI amplificado por los *primers* universales de Folmer (1994), dicho gen fue estudiado a través de la técnica de PCR-RFLP, encontrándose 5 haplotipos adicionales que denominaron A, B, G, J y F, uno de los cuales, el haplotipo F tuvo una frecuencia de 5 %, de lo que se infiere que en el caso del gen COI en la población de ostras *C. angulata* estudiada hubo polimorfismo. En este trabajo también se evaluó la divergencia nucleótida entre los pares de haplotipos, encontrando que estas variaron desde 0,55 % (en el caso de los pares de haplotipos A y B así como entre B y G) hasta un 1,66 % (en el caso del par de haplotipos F y J).

Estudios realizados por Milbury et al. (2004), evaluaron la efectividad de un protocolo basado en RFLP y secuenciamiento para detectar haplotipos del gen 16S rARN que podrían permitir diferenciar ostras *C. virginica* nativas y de repoblamiento en la Bahía Chesapeake en la costa atlántica

de Estados Unidos, demostrando que la utilización del gen 16S rARN permitió detectar la diversidad genética de las ostras de dicha zona, encontrando haplotipos de ostras de la costa atlántica norte en un 95 % de los ejemplares muestreados, de ostras de la costa atlántica sur en un 5 % y de ostras de las costas del Golfo de México en un 0,03 %. Teniendo en cuenta el criterio de polimorfismo al 95 %, se puede inferir que el gen 16S rARN fue polimórfico en el caso del estudio realizado.

Foighil et al. (1998), utilizaron un fragmento del gen COI amplificado usando los *primers* diseñados por Folmer et al. (1994), para evaluar la filogenia de la ostra portuguesa (*C. angulata*) comparándola con secuencias similares de otras ostras, en este estudio se utilizaron 10 ejemplares y se observó una distancia nucleotídica de 0,2 % a 0,7 % en el caso de los haplotipos de *C. angulata*. Zhang et al. (2005) utilizaron fragmentos del gen COI e ITS-1, que fueron analizados mediante PCR-RFLP y marcadores microsatélites, a fin de evaluar la variabilidad genética de poblaciones silvestres y de hatchery de *C. ariakensis* (la ostra Suminoe), encontrando que en estas poblaciones, a pequeña escala y en cortas distancias geográficas, tenían una estructura genética poblacional homogénea; sin embargo, se distinguía una estructura genética poblacional a mayor escala cuando se comparaba las poblaciones del norte y del sur. Había una gran cantidad de homocigotos, y deficiencia en heterocigotos, apartándose de la Ley de Hardy – Weinberg (HWE), sin embargo, en esta parte de sus conclusiones, no hubo la suficiente seguridad de si los resultados eran reales o productos de algún sesgo en el método.

La utilización del gen 16S rARN para identificación de especies de bivalvos, ha sido realizada con éxito en diferentes estudios tales como por ejemplo: el trabajo realizado por Bendezu Slater and Carney (2005) quienes identificaron especies de *Mitilus* y *Pecten* en aguas de Irlanda usando multiplex PCR con *primers* de los genes 16S rARN y 18S rARN, encontrando que era más fácil visualizar los productos de amplificación cuando se utilizó el gen 16 S rARN, por otro lado Ludwig et al. (2011)

desarrollaron un método para detectar e identificar las especies nativas de *Crassostrea* de la costa sudeste del Brasil (*C. rhizophorae* y *C. brasiliana*), para ello utilizaron *primers* que amplificaron fragmentos del gen 16S rARN tanto universales, como específicos para las especies en investigación. Los *primers* universales que utilizaron fueron:

Primer forward: 16S rARN - Ar 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'

Primer reverse: 16S rARN - Br 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'

Estos lograron amplificar un fragmento de 333 pb de *C. brasiliana* y fragmentos de 454 pb y 467 pb de *C. rhizophorae*.

Tian et al. (2004) estudiaron la diversidad genética de *C. rivularis* en la bahía Zhenhai (China), utilizando un fragmento del gen 16S rARN, se evaluaron 27 individuos y se amplificó un fragmento de 414 pb identificándose 3 haplotipos con un número promedio de diferencias nucleótidas extremadamente baja de 0,000 36 y 0,148 15, respectivamente para 2 sitios polimórficos evaluados, esta situación no es convencional, pues la mayoría de bivalvos muestran una alta diversidad genética. Sin embargo, el estudio muestra la utilidad del fragmento del gen 16S rARN en la evaluación de la diversidad genética.

El gen 16S rARN ha sido útil incluso para distinguir haplotipos en poblaciones de ostras ubicadas a distancias de escala continental, así por ejemplo, Lapègue et al. (2002) evaluaron la distribución trasatlántica de especies de ostras del manglar, comparando poblaciones de la costa atlántica de Brasil y de la costa atlántica de África, encontraron que las poblaciones africanas de *C. gasar* fueron monomórficas para el haplotipo a, mientras que en las poblaciones de ostras de Brasil, se hallaron tanto los haplotipos a y b, hallaron adicionalmente una divergencia nucleótida del 11 % entre las especies de Brasil y África, lo que confirma que se trata de especies distintas.

Los antecedentes señalados respaldan el uso de los genes COI y 16S rARN para estudios de diversidad genética en ostras, mostrando que en

el caso del COI, la mayor parte de las veces se ha identificado alta diversidad genética intrapoblacional, mientras que en el caso del gen 16S rARN, los resultados son variables, identificándose en algunos casos alta diversidad y en otros baja.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

Material biológico

- 20 ejemplares de *C. iridescens*.

Equipos y materiales

Equipos y material de campo

- 1 GPS marca Garmin modelo gps76
- 1 balanza gramera marca Sartorius modelo TE2101
- 12 bolsas de hielo de 50 g
- 4 cajas de tecnopor

Material de laboratorio

- 40 maceradores de acero
- 10 tubos Falcon de 50 ml
- 400 puntas con filtro de 10 μ l
- 400 puntas con filtro de 100 μ l
- 600 puntas con filtro de 1000 μ l
- 300 tubos Eppendorf de 1,5 y 0,2 ml
- 1 micropipeta de 0,5-10 μ l marca Axygen modelo AP-10
- 1 micropipeta de 10-100 μ l marca Axygen modelo AP-100
- 1 micropipeta de 100-1000 μ l marca Axygen modelo AP-1000
- 40 hojas de bisturí N° 20
- 4 rollos de papel absorbente
- 1 rollo de papel aluminio
- 1 paquete de algodón
- 3 matraces de 500 ml
- 1 probeta de 1000 ml

Equipos de laboratorio

- 1 cámara de flujo laminar marca Esco modelo AVC-6AX
- 1 balanza analítica marca Sartorius modelo TE214S

- 1 balanza gramera marca Sartorius modelo TE2101
- 1 estufa marca Binder
- 1 autoclave marca All American modelo 25X-2
- 1 termociclador marca Techne modelo FTC3102D
- 1 equipo de baño maría marca Bionet modelo BM5
- 1 centrífuga marca Sigma modelo 1-15K
- 1 horno de microonda marca Panasonic modelo NN-S52PE
- 1 transiluminador marca UVP modelo White/UV
- 1 cámara fotográfica marca Olympus modelo E-330
- 1 congeladora marca Bosch modelo GSD32

Insumos

- 20 g de cloruro de sodio grado reactivo
- 1 L de alcohol al 95 %
- 2 L de agua desionizada autoclavada
- 3 L de agua destilada
- 40 ml de agua ultra pura
- 2 ml de proteinasa K
- 800 mg de lisozima
- 100 ml de fenol
- 100 ml de cloroformo
- 20 ml de alcohol isoamil
- 100 ml de etanol al 75 %
- 100 ml de etanol al 95 %
- 500 µl de MgCl₂
- 400 µl de dNTP's
- 200 µl de taq polimerasa
- 100 µl de *primer forward* LCO1490.
- 100 µl de *primer reverse* HCO2198.
- 100 µl de *primer forward* 16Sar-L
- 100 µl de *primer reverse* 16Sbr-H
- 60 µl de marcador de peso molecular

- 10 g de agarosa
- 2 L de TAE 1X (Tris 2 M, EDTA 0,1 M, pH 8,0 ajustado con ácido acético)
- 5,0 µl de bromuro de etidio
- 2 ml de TE (Tris, EDTA)
- 30 ml de tampón CTAB (Tris-NaCl-EDTA-CTAB)
- 90 µl de tampón de depósito

Material de oficina

- 2 millares de papel bond tamaño A-4 de 75g.
- 1 memoria USB de 2 Gb.
- 1 libreta de campo.
- 5 CD Rom.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Lugar y período de ejecución del experimento

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular ubicado en el local de la Facultad de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes en la localidad de Puerto Pizarro en el distrito, provincia y departamento de Tumbes en Perú. La investigación se desarrolló desde el mes de enero a junio de 2012.

4.2.2. Toma de muestras de *C. iridescens*

Veinte ejemplares de *C. iridescens* se recolectaron de los principales bancos de este recurso que se distribuye en el litoral de la provincia de Contralmirante Villar. Para la recolección se estableció 4 zonas de muestreo de las cuales se extrajeron 5 ostras por zona. Las zonas de muestreo se indican en la tabla 1 y figura 2.

Tabla 1. Zonas de muestreo (corresponden a la zona UTM 17 M)

N° de zona	Zona	Coordenadas UTM	
		Latitud	Longitud
1	Nueva Esperanza	0544104	9598178
2	Zorritos	0537994	9594704
3	Peña Negra	0529291	9589044
4	Cancas	0507334	9564304



Figura 2. Zona costera de la provincia de Contralmirante Villar, señalando las 4 zonas de muestreo.

Las estaciones de muestreo fueron ubicadas con la ayuda de un GPS. Los ejemplares de *C. iridescens* fueron extraídos por un buzo profesional. De cada estación de muestreo se obtuvo 5 ostras que fueron colocadas en una caja de tecnopor con hielo y etiquetadas adecuadamente.

Las ostras fueron transportadas al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera donde se obtuvieron muestras del manto (figura 3) de cada uno de los ejemplares recolectados, las ostras se abrieron utilizando un cincel y martillo, luego se extrajo un

fragmento del manto de un peso de 2 g que fue colocado en un tubo eppendorf de 1,5 ml con solución fisiológica al 85 %.



Figura 3: Disección de *C. iridescens*

4.2.3. Extracción de ADN de acuerdo al protocolo CTAB

Se tomaron 0,5 g de la muestra extraída del manto, se colocó en un tubo eppendorf de 1,5 ml con 500 μ l de solución fisiológica al 85 %, las muestra se congelaron a -20 °C por 10 minutos y luego se maceraron utilizando maceradores de acero esterilizados; a cada uno de los microtubos eppendorf, se le adicionó 500 μ l de buffer de lisis (CTAB), 2 μ l de proteinasa K, seguidamente se incubó a baño maría a 55 °C durante 2 h; transcurrido ese tiempo se adicionó 1 μ l de ARNasa y se incubó durante 10 min a baño maría a 55 °C, luego se incorporó 300 μ l de fenol, 300 μ l de cloroformo/alcohol isoamil en proporción 24:1, y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min.

El sobrenadante fue recobrado y al producto se le adicionó cloroformo/alcohol isoamil en igual proporción que el sobrenadante recuperado, por segunda vez se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min. Se recuperó 450 μ l de sobrenadante y se adicionó 900 μ l de etanol absoluto helado al 95 %.

Se homogenizó y centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante, y luego se le agregó 1 ml de etanol al 95 %. Se

centrifugó a 10 000 rpm durante 2 min y se descartó el sobrenadante. Obteniendo como producto final un *pellet* de ADN, el que se dejó secar durante 10 min a temperatura ambiente y luego se resuspendió en 50 µl de TE 1X y almacenó a -20 °C.

4.2.4. Amplificación del fragmento del gen COI y 16S rARN por PCR.

Para cada muestra, se adicionó en un microtubo eppendorf de 0,5 ml:

- 33,5 µl de agua ultra pura
- 5,0 µl de solución buffer 5X
- 5,0 µl de MgCl₂
- 1,0 µl del mix deoxi nucleótidos trifosfato (dNTPS)
- 2,0 µl de suero de albúmina de bovino (BSA)
- 1,0 µl del *primer forward* LCO1490
- 1,0 µl del *primer reverse* HCO2198
- 1,0 µl del *primer forward*: 16Sar-L
- 1,0 µl del *primer reverse*: 16Sbr-H
- 0,5 µl de Taq polimerasa
- 1,0 µl del ADN extraído

La amplificación se realizó en un termociclador programado como se aprecia en la tabla 2:

Tabla 2. Programación del termociclador para la amplificación del fragmento del gen COI y 16S rARN

Fase	Temperatura (°C)		Tiempo		Número de ciclos	
	Gen COI	Gen 16S rARN	Gen COI	Gen 16S rARN	Gen COI	Gen 16S rARN
Pre-desnaturalización	95	95	5 min	5 min	1	1
Amplificación					40	35
Desnaturalización	94	94	30 s	30 s		
Hibridación	50	52	45 s	1 min		
Polimerización	72	72	1 min	1 min		
Polimerización final	72	72	7 min	7 min	1	1

4.2.5. Observación de los resultados mediante electroforesis.

Los amplicones (producto de la amplificación del ADN en la PCR) fueron migrados en gel de agarosa al 2 %, conteniendo 5 µl de bromuro de etidio, además se utilizó como tampón de migración 120 ml de TAE 1X, 2 µl de tampón de depósito y 10 µl de cada amplicón procedentes de la PCR. La migración se realizó a 68 V durante 30 min; conjuntamente se hizo migrar un marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb. Los geles fueron visualizados utilizando un transiluminador, y fotografiados con cámara digital.

En la figura 4 se aprecia los geles de agarosa en que se realizó la migración de amplicones correspondientes al gen COI; como se observa en las figuras 4a y 4b, no existen bandas fluorescentes, lo que indica que no existió producto amplificado para ninguna de las muestras de ostras analizadas. Sin embargo si se observó producto de amplificación en la muestra de control positivo (C+), lo que demostró que el procedimiento de amplificación mediante PCR fue correcto. El ensayo fue realizado nuevamente para reconfirmar los datos obtenidos, dando resultados similares.



Figura 4. Amplificación del fragmento del gen COI. Los códigos numéricos representan: primer dígito, la zona de muestreo y el segundo dígito, el número del individuo. a) Zona 1 (Nueva Esperanza) y la zona 2 (Zorritos). b) Zona 3 (Peña Negra) y zona 4 (Cancas).

En la figura 5 se observa los geles en que se migró los amplicones correspondientes a un fragmento del gen 16S rARN, en la figura 5a y 5b se aprecia que para cada una de las muestras hay presencia de productos amplificados evidenciados por la presencia de bandas fluorescentes en el gel, asimismo se aprecia una banda fluorescente correspondiente al control positivo (C+) y ninguna banda en el control negativo (C-) constatando que la amplificación se realizó adecuadamente y sin contaminación. En la parte derecha se observa el marcador de peso molecular (MPM) de 100 a 1000 pb, lo que indica que los productos de amplificación tuvieron un tamaño de aproximadamente 600 pb.

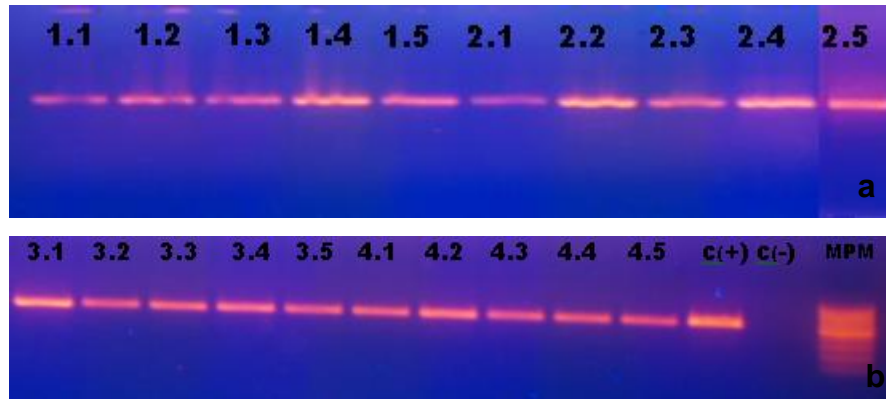


Figura 5. Amplificación del fragmento del gen 16S rARN. Los códigos numéricos representan: primer dígito la zona de muestreo y el segundo dígito el número del individuo. a) Zona 1 (Nueva Esperanza) y la zona 2 (Zorritos). b) Zona 3 (Peña Negra) y zona 4 (Cancas). MPM es el marcador de peso molecular de 100 – 1000 pb.

4.2.6. Secuenciación del ADN.

En tubos eppendorf de 0,5 ml se suspendió 10 µl de los productos obtenidos por amplificación de la PCR en 5 µl de agua ultrapura (AUP) para cada uno de los *primers* correspondientes. En otro tubo eppendorf de 0,5 ml se añadió 3 µl de *primer reverse* y *forward*. Cada uno de los tubos eppendorf fue debidamente rotulado y empacado, luego se enviaron a la empresa Macrogen en Maryland (U.S.A) para la secuenciación respectiva.

4.2.7. Análisis de las secuencias de los productos amplificados para el 16SRNA.

En la figura 6, se observa el pictograma obtenido a partir de la lectura de fluorescencia en el secuenciador, correspondiente a cada nucleótido de la secuencia, se aprecia que a partir del nucleótido 60 al nucleótido 480, el pictograma muestra un pico definido de un color determinado para cada nucleótido, esto indica que los nucleótidos fueron confiables, también se aprecian que existen unos picos muy bajos casi imperceptibles, lo que indica que no existió contaminación.

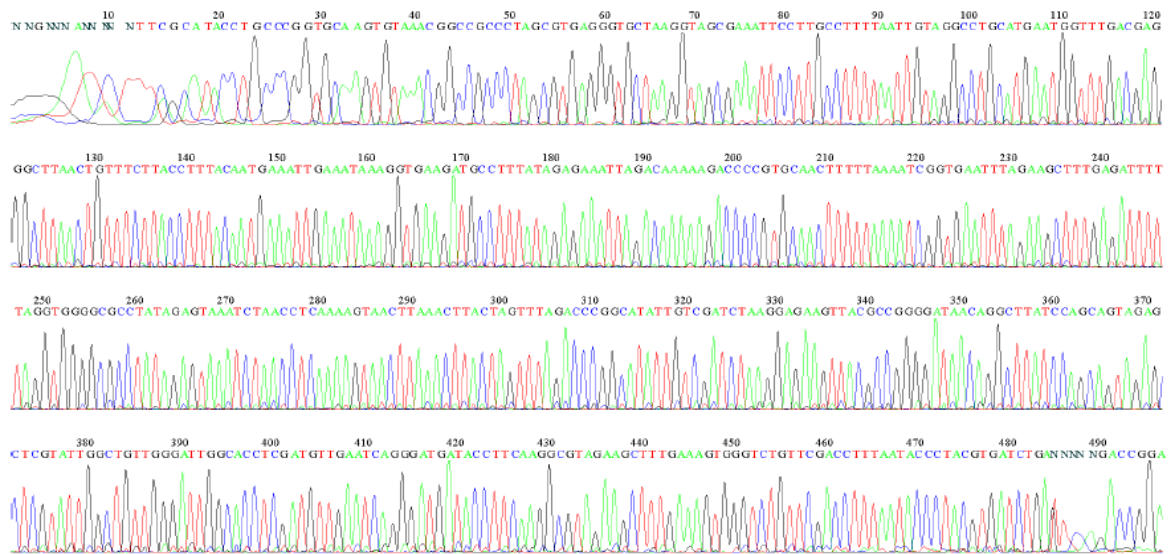


Figura 6. Pictograma obtenido de la secuenciación del fragmento del gen 16S rARN para un individuo de *C. iridescens*.

Las secuencias nucleotídicas del fragmento del gen 16S rARN correspondientes a los 20 ejemplares de *C. iridescens* (anexo 1), tuvieron un tamaño aproximado de 500 pb las mismas que fueron alineadas, contra las secuencias reversas complementarias utilizando el algoritmo ClustalW implementado en el software Mega versión 5 (Tamura et al. 2011).

Luego del alineamiento se obtuvieron secuencias de un tamaño de 474 pb, las que fueron exportadas al programa DnaSp 5.10 (Librado and Rozas 2009) a fin de obtener indicadores de diversidad genética como:

El número de alelos (N_a), el número de alelos efectivos (N_e), la diversidad de haplotipos (h), la matriz de distancia genética de Nei, (Nei and Li 1979; Nei and Tajima 1981; Nei 1987 citado por Thawnon et al. 2004). Se usó Arlequin versión 3.5 para calcular la diversidad nucleotídica entre muestras (π).

La existencia de estructura genética poblacional se evaluó comparando la varianza genética entre poblaciones y dentro de poblaciones usando el análisis molecular de varianza (AMOVA) (Peakall and Smouse 2006) en GenAlex versión 6. De igual manera se aplicó el test de Mantel en GenAlex 6, para determinar si existió correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica.

V. RESULTADOS

5.1. Gen de la citocromo oxidasa I de *C. iridescens*

El juego de *primers* universales LCO1490 y HCO2198, no fueron eficaces para amplificar un fragmento del gen COI en *C. iridescens*. Al no existir producto de amplificación no se pudo realizar la secuenciación del ADN y tampoco se pudo calcular la diversidad y estructura genética basados en el fragmento del gen COI.

5.2. Gen de la subunidad 16S ribosómico de *C. iridescens*

5.2.1. Identificación de la secuencia.

Las secuencias de ADN correspondientes al fragmento del gen 16S rARN de *C. iridescens* fueron identificadas contrastándolas con secuencias de ADN almacenadas en la base de datos de GenBank, esto se muestra en la tabla 3, donde se observa que las secuencias más similares corresponden a fragmentos del gen 16S rARN de especies de ostras emparentadas con *C. iridescens* tales como *Cryptostrea permolis*, *Ostrea denselamellosa*, *O. chilensis*, *O. edulis*, *O. equestris* y *O. pulchearna*. Los niveles de similitud con respecto a estas especies fueron de 87 % siendo demasiado bajos para declarar similitud de ADN a nivel de especie o género, pero si permitieron identificar que las secuencias amplificadas correspondieron al gen 16S rARN.

Tabla 3. Secuencias de ADN en la base de datos de GenBank que mostraron mayor nivel de similitud (87 %) con las secuencias de *C. iridescens*

Especies	Secuencia de ADN
<i>Cryptostrea permollis</i>	Gen 16S rARN, secuencia parcial mitocondrial
<i>Ostrea denselamellosa</i>	Aislado JC_A 16S del gen 16 S rARN, secuencia completa mitocondrial
<i>Ostrea chilensis</i>	Gen 16S rARN, secuencia parcial mitocondrial
<i>Ostrea edulis</i>	Gen 16S rARN, secuencia parcial mitocondrial
<i>Ostreola equestris</i>	Gen 16S rARN, secuencia parcial mitocondrial
<i>Ostrea puelchana</i>	Gen 16S rARN, secuencia parcial mitocondrial

5.2.2. Diversidad genética

Los parámetros de diversidad genética para *C. iridescens* obtenidos en base a las 20 secuencias del fragmento del gen 16S rARN se muestran en la tabla 4, aquí se aprecia en relación a la diversidad genética medida en relación a los haplotipos presentes (2 haplotipos), de los cuales el más frecuente alcanzó el 65 %, esto indica que la secuencia es polimórfica, pues, el haplotipo más frecuente no superó el 95 %; de igual manera al evaluar el índice de diversidad haplotípica, esta alcanzó el valor de 0,4789, esto aunado al hecho de haberse encontrado solo 2 haplotipos indica que la diversidad genética es baja.

Respecto a la diversidad medida a nivel de nucleótidos, se aprecia en la tabla 5 que el promedio de diferencias nucleotídica fue de 7,663 nucleótidos en la secuencia de 474 pb. La diversidad nucleotídica (π) fue de 0,017 14, estos valores también muestran una baja diversidad en el fragmento del gen 16S rARN de *C. iridescens* evaluado.

Tabla 4. Principales parámetros de la diversidad genética obtenidas en base a las 20 secuencias del fragmento del gen 16S rARN de *C. iridescens*.

Parámetro	Valor
Haplotipos	
Número de haplotipos (h)	2
Número de individuos con el haplotipo más frecuente	13
Frecuencia (%) del haplotipo más frecuente	65
Diversidad de haplotipos (Hd)	0,4789
Nucleótidos	
Número promedio de diferencias en nucleótidos	7,663
Diversidad nucleótida (π)	0,017 14

La diversidad haplotípica evaluada a través del número de haplotipos identificados en las 20 muestras de las 4 zonas estudiadas se observa en la tabla 5, aquí se aprecia que se encontraron 2 haplotipos los que se han denominado hap1 y hap2. Los sitios variables de la secuencia de nucleótidos por cada muestra obtenida se reporta en el anexo 2.

El hap1 se distribuyó en las cuatro zonas y el hap2 sólo en la zona 2 (Zorritos) y zona 4 (Cancas). En las zonas 1 (Nueva Esperanza) y 3 (Peña Negra) se encontró el hap1 lo que las caracteriza como poblaciones monomórficas. En el caso de la zona 2 (Zorritos), la frecuencia de los haplotipos hap1 y hap2 fueron de 40 % y 60 %, lo que la caracteriza como una población polimórfica y en el caso de la zona 4 (Cancas) las frecuencias fueron: 20 % para el hap1 y 80 % para el hap2, por lo que esta población también es polimórfica. En esta misma tabla también se observa que las frecuencias de los hap1 y hap2 son de 65 % y 35 %, respectivamente, por lo que la población total de las 4 zonas de muestreo se determina que es polimórfica.

Tabla 5. Diversidad haplotípica identificados en las 20 muestras del fragmento del gen 16S rARN de *C. iridescens*

Haplotipo	Frecuencia									
	Zona 1		Zona 2		Zona3		Zona 4		Total	
	Nueva Esperanza		Zorritos		Peña Negra		Cancas			
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
hap1	5	100	2	40	5	100	1	20	13	65
hap2	0	0	3	60	0	0	4	80	7	35
Total	5	100	5	100	5	100	5	100	20	100

En la tabla 6, se muestra la distancia genética de Nei para cada zona de muestreo, se observa que esta varió de 0,001 a 0,022 (no se tuvo en cuenta las distancias con valor 0, puesto que representan la distancia genética para la misma estación de muestreo); los valores de distancia genética son bajos. La mayor distancia genética se encontró entre las zonas de muestreo de la zona 1 (Nueva Esperanza) y la zona 3 (Peña Negra).

Tabla 6: Matriz de distancia genética de Nei para fragmento del gen 16S rARN de *C. iridescens*.

Nueva Esperanza	Zorritos	Peña Negra	Cancas	
0,000				Nueva Esperanza
0,012	0,000			Zorritos
0,000	0,012	0,000		Peña Negra
0,022	0,001	0,022	0,000	Cancas

5.2.3. Estructura genética poblacional

En la tabla 7 se muestra el AMOVA de *C. iridescens* utilizando como marcador el gen 16S rARN, como se aprecia la variabilidad genética se debe en 62 % a la variabilidad entre las poblaciones de las 4 zonas, mientras que sólo el 38 % corresponde a la variabilidad genética de los individuos dentro de cada una de las poblaciones.

Esto indica la existencia de una alta estructuración genética en *C. iridescens*.

El índice de fijación (Φ_{FT}) calculado indica también una alta estructuración genética ($\Phi_{FT} = 0,624$ con $p < 0,02$).

Tabla 7. Análisis de varianza molecular de *C. iridescens* utilizando como marcador el fragmento del gen 16S rARN.

Fuente	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Variación estándar	Porcentaje de la variabilidad
Entre poblaciones	3	55,800	18,600	3,320	62 %
Dentro de poblaciones	16	32,000	2,000	2,000	38 %
Total	19	87,800		5,320	100 %

La asociación entre la distancia geográfica entre las poblaciones y la distancia genética se evalúa en la tabla 8, aquí se aprecia los resultados del test de Mantel, que indica que no existe correlación ($p > 0,05$) entre la distancia geográfica y la distancia genética de las poblaciones de las zonas estudiadas. De igual manera, en la figura 7, se observa el diagrama de dispersión, que grafica los datos de distancia geográfica y distancia genética, sobre estos se ha trazado la recta de regresión lineal cuyo coeficiente de determinación es muy bajo ($R^2 = 0,074$) lo que indica que no existe asociación entre la distancia geográfica y la distancia genética en las poblaciones estudiadas.

Tabla 8. Test de Mantel para evaluar la correlación entre la matriz de distancia genética (y) y la matriz de distancia geográfica (x).

Suma de cuadrados de x (SSx)	Suma de cuadrados de y (SSy)	Suma de productos de x e y (SPxy)	Coefficiente de correlación de Pearson (Rxy)	Nivel de significancia $P(r_{xy \text{ aleatorio}} \geq r_{xy \text{ datos}})$
62 614 632 668,982	12 138,442	7 504 723,965	0,272	0,060

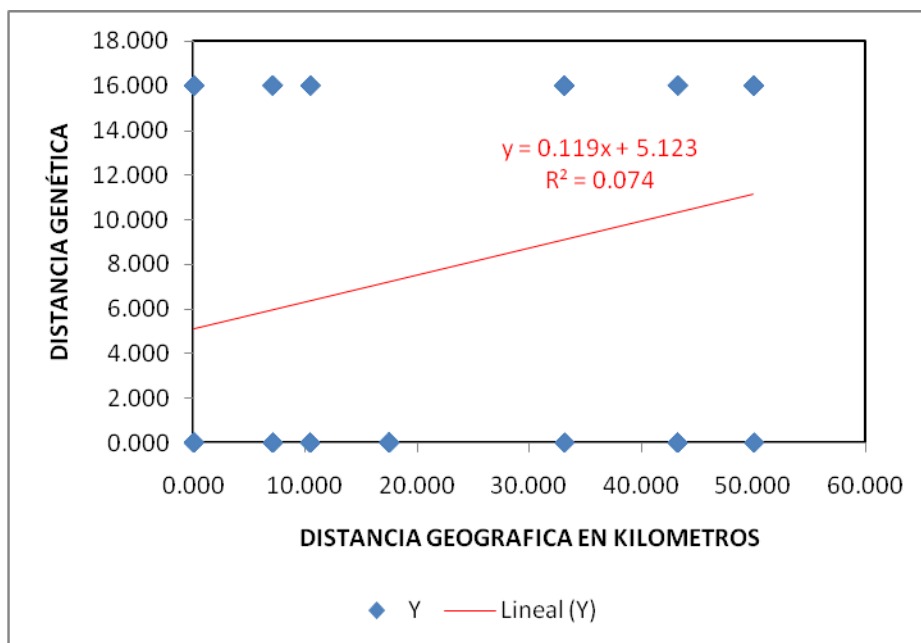


Figura 7. Diagrama de dispersión y recta de regresión de los datos de distancia geográfica y distancia genética en individuos de *C. iridescens* utilizando como marcador el gen 16S rARN

VI. DISCUSIÓN

En la presente investigación no fue posible amplificar un fragmento del gen COI en *C. iridescens*, cuando se utilizaron los *primers* diseñados por Folmer et al. (1994), esto a pesar de que tales *primers* se han designado como universales debido a que han podido amplificar un fragmento del gen COI en varios tipos de invertebrados (Roman and Palumbi 2004; Foighil et al. 1998; Huvet et al. 2000; Lapègue et al. 2004; Zhang, Standish and Reece 2005; Wang and Guo 2008; Klinbunga et al. 2003); sin embargo, existen precedentes de que los *primers* de Folmer et al. (1994) no han podido amplificar los fragmentos del gen COI en otros invertebrados, como por ejemplo en la langosta del género *Munida* (Cabezas, Macpherson, and Machordom 2008) y en el cangrejo verde del género *Carcinus* (Darling et al. 2008).

Respecto a la diversidad genética de *C. iridescens* evaluada en esta investigación, esta fue baja al ser medida a través del número de haplotipos, siendo para el caso 2, la baja cantidad de haplotipos no es un caso singular puesto que ya ha sido reportado en otras ostras del género *Crassostrea* por Tian et al. (2004) quienes estudiaron la diversidad genética de *C. rivularis* en la bahía Zhenhai (China), utilizando un fragmento del gen 16S rARN, encontrando 3 haplotipos en 27 individuos evaluados. Por otro lado, la diferencia nucleótida para la presente investigación fue de 0,017 14 que es una diferencia baja, pero que ya se ha encontrado en ostras como *C. rivularis* en la cual se ha determinado una diferencia nucleótida extremadamente baja en el rango de 0,000 36 a 0,148 15 (Tian et al. 2004).

Respecto a la estructura genética poblacional de *C. iridescens*, en este estudio se determinó que esta fue alta entre las 4 poblaciones estudiadas en el litoral de Tumbes. De acuerdo al AMOVA el 62 % de la variabilidad genética se debe a la variabilidad entre las poblaciones y solo el 38 % corresponde a la variabilidad genética entre individuos dentro de cada población. Este resultado de alta estructuración genética poblacional, puede sustentarse en un bajo flujo génico entre

los distintos bancos de ostras estudiados; si bien es cierto, el periodo larval de *C. iridescens* es largo, tomando 20 a 26 días según precisa Loor (2012), y que las corrientes acuáticas en los bancos muestreados, tienen velocidades entre 1,02 a 37,64 cm/s (Ordinola et al. 2010), lo que representa un transporte de entre 800 m/día a 32 km/día, que implicaría la posibilidad de un fuerte flujo de larvas; sin embargo, el estudio de las direcciones de las corrientes en dichos bancos que han realizado Ordinola et al. (2010), muestran que puede haber dificultad para el transporte de larvas, pues las corrientes en dichas zonas fluyen en direcciones opuestas y en algunos casos alejan a las larvas de las costas de los bancos, impidiendo que larvas que migren desde otros bancos se acerquen a nuevos bancos; esto sería la razón que explicaría el porqué de esta alta estructuración genética.

Esta dificultad de migración que afecta a la estructura genética poblacional incrementándola, ha sido reportada en *Mytella guyanensis* por De Oliveira et al. (2005), quienes señalan que el corto tiempo del estadio larvario en *Mytella charruana* (de sólo 10 a 15 días) es un impedimento para su efectiva migración e influye en que en las poblaciones estudiadas se muestren niveles más altos de estructuración genética poblacional. La influencia del tiempo del periodo larval y las condiciones oceanográficas sobre la estructuración genética poblacional, han sido descritas por Astorga y Ortiz (2006) para el tunicado *Pyura chilensis*, en el cual han reportado un alto nivel de estructuración genética, el cual lo atribuyen a (i) el corto tiempo de desarrollo larvario, de 12 a 24 h y (ii) las condiciones oceanográficas diferenciales entre localidades, junto a patrones de circulación cerrados que podrían llegar a restringir el flujo génico.

VII. CONCLUSIONES

1. La diversidad genética de *C. iridescens* evaluada a través de un fragmento del gen 16S rARN en la región Tumbes el año 2012 fue baja según los principales indicadores de diversidad evaluados.
2. La estructuración genética en *C. iridescens* evaluada a través de un fragmento del gen 16S rARN en la región Tumbes el año 2012 fue alta.
3. El Test de Mantel realizado en los especímenes de *C. iridescens* demostró que no existió una correlación entre la distancia geográfica de las zonas de estudio y la distancia genética observada.
4. El juego de *primers* universales LCO1490 y HCO2198, no fueron eficaces para amplificar un fragmento del gen COI en *C. iridescens*.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Diseñar nuevos *primers* que permitan amplificar un fragmento del gen COI, en *C. iridescens*.
2. Realizar estudios de diversidad genética sobre *C. iridescens* en la región Tumbes, utilizando otros genes mitocondriales tales como el gen 12S rARN, la región de control (CR), como también marcadores de ADN nuclear: microsatélites, AFLP y RAPD.

IX. 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.
- ASTORGA, M.P. 2008. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. En A. LOVATELLI, A. FARIAS e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. No. 12. Roma, Italia FAO. pp. 277–287.
- ASTORGA, M. P. y ORTIZ, J. C. 2006. Variabilidad genética y estructura poblacional del tunicado *Pyura chilensis* Molina, 1782, en la costa de Chile. *Rev. chil. hist. nat.* 79(4): 423-434. <http://www.scielo.cl/pdf/rchnat/v79n4/art02.pdf>
- BENDEZU, I. F., J. W. SLATER, and B. F. CARNEY. 2005. Identification of *Mytilus* spp. and *Pecten maximus* in Irish Waters by Standard PCR of the 18S rDNA Gene and Multiplex PCR of the 16S rDNA Gene.
- CABEZAS, P., E. MACPHERSON, AND A. MACHORDOM. 2008. A new genus of squat lobster (Decapoda: Anomura: Galatheididae) from the south west pacific and Indian ocean inferred from morphological and molecular evidence. *Journal of crustacean biology* 28(1): 68–75. <http://decapoda.nhm.org/pdfs/27783/27783.pdf>
- COSTA, A.G., E. SOUSA, C. R. BEASLEY, H. SCHNEIDER, I. SAMPAIO, P. M. GAFFNEY, K. S. REECE, and C. H. TAGLIARO. 2010. Molecular identification, phylogeny and geographic distribution of Brazilian mangrove oysters (*Crassostrea*). *Genetics and Molecular Biology* 33(3): 564-572. <http://www.scielo.br/pdf/gmb/v33n3/30.pdf>.

- DARLING, J. A., M. BAGLEY, J. ROMAN, C. TEPOLT AND J. GELLER. 2008. Genetic patterns across multiple introductions of the globally invasive crab genus *Carcinus*. *Molecular Ecology*. 17, 4992–5007. http://www.uvm.edu/giee/publications/Roman_darling_paradoxlost_07.pdf
- EWALD, M. 2006. Isolation and characterization of nuclear and mitochondrial genetic markers for population studies of *Ucides cordatus cordatus*. Doctor of Natural Sciences Dissertation, 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>
- FOIGHIL, D. O, P. M. GAFFNEY, A. E. WILBUR, and T. J. HILBISH. 1998. Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata*. *Marine Biology*. 131: 497-503. http://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/2027.42/42028/1/227-131-3-497_81310497.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.
- FRIAS, M. G., M. ORTIZ, J. I. OSUNA y J. A. RONSON. 1999. Heavy metals in the rock oyster *Crassostrea iridescens* (Filibranchia: Ostreidae) from Mazatlan, Sinaloa, Mexico. *Rev. biol. trop* 47(4): 843-849. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-77441999000400021&lng=es&nrm=isso

- 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>.
- HUVET, A., S. LAPÈGUE, A. MAGOULAS and P. BOUDRY. 2000. Mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of *Crassostrea angulata*, the Portuguese oyster endangered in Europe. *Conservation Genetics* 1(3): 251 - 262. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1011505805923>.
- IMARPE (INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ). 2008. *Ostra*. Tumbes, Perú: IMARPE. http://www.imarpe.gob.pe/tumbes/especies_comerciales/invertebrados/ostra.pdf
- IMARPE (INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ). 2009. Informativo pesquero Año 2008. Tumbes, Perú: Instituto del Mar del Perú. http://www.imarpe.gob.pe/tumbes/boletines/boletin_informativo_pesquero/BIP_Tumbes_3_n2_SP_IMARPE.pdf
- KLINBUNGA, S., B. KHAMNAMTONG, N. PUANGLARP, P. JARAYABHAND, W. YOOSUKH, and P. MENASVETA. 2005. Molecular Taxonomy of Cupped Oysters (*Crassostrea*, *Saccostrea*, and *Striostrea*) in Thailand Based on COI, 16S, and 18S rDNA

Polymorphism. *Mar. Biotechnol.* 7:306–317. <http://www.vliz.be/imisdocs/publications/74611.pdf>

KLINBUNGA, S., N. KHAMNAMTONG, A. TASSANAKAJON, N. PUANGLARP, P. JARAYABHAND, and W. YOOSUKH. 2003. Molecular genetic identification tools for three commercially cultured oysters (*Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, and *Saccostrea cucullata*) in Thailand. *Mar. Biotechnol.* 5: 27 – 36

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>

LAPÈGUE, S., I. BOUTET, A. LEITÃO, S. HEURTEBISE, P. GARCIA, C. THIRIOT, and P. BOUDRY. 2002. Trans-Atlantic distribution of a mangrove oyster species revealed by 16S mtDNA and karyological analyses. *Biol. Bull.* 202: 232–242. <http://www.biolbull.org/content/202/3/232.full.pdf#page=1&view=FitH>

LIBRADO, P. and J. ROZAS. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451 - 145. <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/25/11/1451.full.pdf+html>

LOOR, A. G. 2012. *Desarrollo de protocolos de manejo para la inducción al desove y larvicultura de la ostra nativa Crassostrea iridescens*. Tesis de Biólogo. Escuela Superior Politécnica del Ecuador.

LUDWIG, S., R. PATELLA, S. STOIEV, G. CASTILHO, M.V.F. GIROTTO and A. OSTRENSKY. 2011. A molecular method to detect and identity the native species of southwestern Atlantic *Crassostrea*

(Mollusca: Ostreidae). *Zoologia* 28 (4): 420–426.
<http://www.scielo.br/pdf/zool/v28n4/v28n4a02.pdf>

MAHIDOL C., U. NAKORN , S. SUKMANOMON, N. TANIGUCHI, and T. T. NGUYEN. 2007. *Mitochondrial DNA diversity of the Asian moon scallop, Amusium pleuronectes (Pectinidae), in Thailand. Mar Biotechnol (NY)*. 9(3):352-359. <http://www.springerlink.com/content/ht6n2283755r4p11/>

MILBURY, C. A., D. W. MERITT, R. I. E. NEWELL and P. M. GAFFNEY. 2004. Mitochondrial DNA markers allow monitoring of oyster stock enhancement in the Chesapeake Bay. *Marine Biology* 145: 351–359. <http://www.hpl.umces.edu/faculty/newell/Millburyetal2004.pdf>

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>

DE OLIVEIRA, M. E. G. C., C. A. M. RUSSO, C. LAZOSKI, P. R. F. G. VIANNA and M. SOLÉ-CAVA. 2005. Genetic variation and population structure of two species of neotropical mud-mussels (*Mytella* spp.). *Genetics and Molecular Research* 4(2): 197-202. http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2005/vol2-4/gmr0127_full_text.htm

- ORDINOLA, E., E. LÓPEZ, I. GONZALES, P. MONTERO, K. AGURTO, E. TORRES, M. VERA Y C. INGA. 2010. Delimitación y caracterización de bancos naturales de invertebrados bentónicos comerciales y áreas de pesca artesanal en el litoral de Tumbes. Tumbes, Perú: Instituto del Mar del Perú. http://www.imarpe.gob.pe/tumbes/noticias/Ident_delimit_B_N_Z_12-04-2010.pdf
- PALUMBI, S., MARTIN, A., ROMANO, S., MCMILLAN, W.O., STICE, L., and GRABOWSKI, G. 1991. *The simple fool's guide to PCR*. Honolulu, USA: Kewalo Marine Laboratory of the University of Hawaii.
- 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>
- PRODUCE (MINISTERIO DE LA PRODUCCIÓN). 2009. *Plan nacional de desarrollo acuícola*. Lima, Perú: Produce. http://www.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/TALLER_PNDA/PNDA.pdf
- RAMÍREZ, L.A. 2007. *Estado de ostra de piedra (Crassostrea iridescens) en los principales bancos naturales de extracción en la zona costera de los Departamentos de La Unión, San Miguel y Usulután. Construcción de bancos artificiales y colocación de arrecifes artificiales para recuperación de la ostra de piedra (Crassostrea iridescens), en la zona costera del Departamento de La Unión*. Puerto El Triunfo, El Salvador: JICA- CENDEPESCA.
- REECE, K. S., J. F. CORDES, J. B. STUBBS, K. L. HUDSON, and E. A. FRANCIS. 2008. Molecular phylogenies help resolve taxonomic confusion with Asian *Crassostrea* oyster species. *Marine Biology* 153(4): 709-721. <http://www.scsagr.com/upimg/2008530163520.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>
- 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.
- 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 *Congeria 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. PHANWICHIEEN, 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

TIAN, S., J.SHI, Z. CAI, and W. JIN. 2004. Genetic Diversity of *Crassostrea rivularis* in Zhenhai Bay by Analyzing mtDNA 16S rRNA. Gene Sequence. *Journal of Zhanjiang Ocean University*. 4. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotat-SHDX200404000.htm

TUDGE, C. C. and C. W. CUNNINGHAM. 2002. Molecular phylogeny of the mud lobsters and mud shrimps (Crustacea : Decapoda : Thalassinidea) using nuclear 18S rDNA and mitochondrial 16S rDNA. *Invertebrate Systematics*. 16: 839-847. <http://isopods.nhm.org/pdfs/23663/23663.pdf>

WANG, H. and X. GUO. 2008. Identification of *Crassostrea ariakensis* and related oysters by multiplex species-specific PCR. *Journal of Shellfish Research* 27(3): 481–487. http://www.njseagrant.org/Sea_Grant/PublicationPDFs/08_687_Wang.pdf

WEISBURG, W. G., S. M. BARNS, D. A. PELLETIER and D. J. LANE. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173 (2): 697-703. <http://jb.asm.org/content/173/2/697.abstract>

ZHANG, Q., K.A. JR. STANDISH, and K.S. REECE. 2005. Genetic variation in wild and hatchery stocks of Suminoe oyster (*Crassostrea ariakensis*) assessed by PCR-RFLP and microsatellite markers. *Mar. Biotechnol.* 7: 588-599. <http://www.scsagr.com/upimg/2008530163334.pdf>

Anexos

Anexo 1. Secuencias nucleotídicas en 20 ejemplares de *C. iridescens*

Muestra: 1-1- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

```
1 acctgcccgg tgcaaagtgt aaacggccgc cctagcgtga gggtgctaag gtagcgaat
61 tccttgccct ttaattgtag gcctgcatga atggtttgac gagggcttaa ctgtttctta
121 cctttacaat gaaattgaaa taaagggtga gatgccttta tagagaaatt agacaaaaag
181 agacaaaaag actttttaa atcgggtgat ttagaagctt tgagattttt aggtggggcg
241 cctatagagt aatcctaacc tcaaaagtaa cttaactta ctagttaga cccggcatat
301 tgtcgatcta aggagaagtt acgccggga taacaggctt atccagcagt agagctcgta
361 ttggctgttg ggattggcac ctcgatgttg aatcagggat gataccttca aggcgtagaa
421 gctttgaaag tgggtctgtt cgacctttaa taccctacgt attcttcttc gtga
```

Muestra: 1-2- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

```
1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccgcc gccctagcgt gagggtgcta
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggctgcat gaatggtttg acgagggctt
121 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggctgcat gaatggtttg acgagggctt
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aatcgggtga atttagaagc tttgagattt
241 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aatcgggtga atttagaagc tttgagattt
301 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aatcgggtga atttagaagc tttgagattt
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 caaggcgtag aagctttgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga
```

Muestra: 1-3- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

```
1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccgcc gccctagcgt gagggtgcta
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggctgcat gaatggtttg acgagggctt
121 aactgtttct tacctttaca atgaaattga aataaagggtg aagatgcctt tatagagaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aatcgggtga atttagaagc tttgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gtaaactctaa cctcaaaagt aacttaaact tactagttta
301 gaccggcat attgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccagca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 caaggcgtag aagctttgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga
```

Muestra: 1-4- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

```
1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccgcc gccctagcgt gagggtgcta
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggctgcat gaatggtttg acgagggctt
121 aactgtttct tacctttaca atgaaattga aataaagggtg aagatgcctt tatagagaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aatcgggtga atttagaagc tttgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gtaaactctaa cctcaaaagt aacttaaact tactagttta
301 gaccggcat attgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccagca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 caaggcgtag aagctttgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga
```

Muestra: 1-5- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaacggcc gccctagcgt gagggtgcta
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggcctgcat gaatggtttg acgagggcct
121 aactgtttct tacctttaca atgaaattga aataaagggtg aagatgcctt tatagagaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc tttgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gtaaactctaa cctcaaaagt aacttaaact tactagttta
301 gacccggcat attgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccagca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 caaggcgtag aagctttgaa agtgggtctg ttcgaccttt aataccctac gtga

Muestra: 2-1- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaacggcc gccctagcgt gagggtgcta
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggcctgcat gaatggtttg acgagggcct
121 aactgtttct tacctttaca atgaaattga aataaagggtg aagatgcctt tatagagaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc tttgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gtaaactctaa cctcaaaagt aacttaaact tactagttta
301 gacccggcat attgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccagca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 caaggcgtag aagctttgaa agtgggtctg ttcgaccttt aataccctac gtga

Muestra: 2-2- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaacggcc gccctagcgt gagggtgcca
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggcctgcat gaatggttcg acgagggcct
121 aactgtttct tacctttata atgaaattga aatatagggtg aagatgcctt tatgaaaaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc ttcgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gcaaactctaa cctcaaaagt aatttaaact tactagtcta
301 gacccggcat atcgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccaaca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 tagggcgtag aagctctgaa agtgggtctg ttcgaccttt aataccctac gtga

Muestra: 2-3- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaacggcc gccctagcgt gagggtgcta
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggcctgcat gaatggtttg acgagggcct
121 aactgtttct tacctttaca atgaaattga aataaagggtg aagatgcctt tatagagaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc tttgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gtaaactctaa cctcaaaagt aacttaaact tactagttta
301 gacccggcat attgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccagca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 caaggcgtag aagctttgaa agtgggtctg ttcgaccttt aataccctac gtga

Muestra: 2-4- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaacggcc gccctagcgt gagggtgcca
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggcctgcat gaatggttcg acgagggcct
121 aactgtttct tacctttata atgaaattga aatatagggtg aagatgcctt tatgaaaaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc ttcgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gcaaactctaa cctcaaaagt aatttaaact tactagtcta
301 gacccggcat atcgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccaaca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt

421 tagggcgtag aagctctgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga

Muestra: 2-5- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccggcc gccctagcgt gaggggtgca
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggcctgcat gaatggttcg acgagggcct
121 aactgtttct tacctttata atgaaattga aatatagggtg aagatgcctt tatgaaaaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc ttcgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gcaaatctaa cctcaaaagt aatttaaact tactagtcta
301 gaccocggcat atcgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccaaca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 tagggcgtag aagctctgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga

Muestra: 3-1- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccggcc gccctagcgt gaggggtgca
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggcctgcat gaatggtttg acgagggcct
121 aactgtttct tacctttaca atgaaattga aataaagggtg aagatgcctt tatagagaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc tttgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gtaaatctaa cctcaaaagt aacttaaact tactagttta
301 gaccocggcat attgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccagca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 caagcgtag aagctttgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga

Muestra: 3-2- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccggcc gccctagcgt gaggggtgca
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggcctgcat gaatggtttg acgagggcct
121 aactgtttct tacctttaca atgaaattga aataaagggtg aagatgcctt tatagagaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc tttgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gtaaatctaa cctcaaaagt aacttaaact tactagttta
301 gaccocggcat attgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccagca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 caagcgtag aagctttgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga

Muestra: 3-3- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccggcc gccctagcgt gaggggtgca
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggcctgcat gaatggtttg acgagggcct
121 aactgtttct tacctttaca atgaaattga aataaagggtg aagatgcctt tatagagaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc tttgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gtaaatctaa cctcaaaagt aacttaaact tactagttta
301 gaccocggcat attgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccagca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 caagcgtag aagctttgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga

Muestra: 3-4- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccggcc gccctagcgt gaggggtgca
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggcctgcat gaatggtttg acgagggcct
121 aactgtttct tacctttaca atgaaattga aataaagggtg aagatgcctt tatagagaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc tttgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gtaaatctaa cctcaaaagt aacttaaact tactagttta
301 gaccocggcat attgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccagca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt

421 caaggcgtag aagctttgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga

Muestra: 3-5- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccggc gccctagcgt gagggtgcta
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggctgcat gaatggtttg acgagggctt
121 aactgtttct tacctttaca atgaaattga aataaagggtg aagatgcctt tatagagaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc tttgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gtaaactctaa cctcaaaagt aacttaaact tactagttta
301 gaccocggcat attgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccagca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 caaggcgtag aagctttgaa agtgggtctg ttcgacctt taataccctac gtga

Muestra: 4-1- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccggc gccctagcgt gagggtgcca
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggctgcat gaatggttcg acgagggctt
121 aactgtttct tacctttata atgaaattga aatatagggtg aagatgcctt tatgaaaaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc ttcgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gcaaactctaa cctcaaaagt aatttaaact tactagtcta
301 gaccocggcat atcgctcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccaaca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 Tagggcgtag aagctctgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga

Muestra: 4-2- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccggc gccctagcgt gagggtgcta
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggctgcat gaatggtttg acgagggctt
121 aactgtttct tacctttaca atgaaattga aataaagggtg aagatgcctt tatagagaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc tttgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gtaaactctaa cctcaaaagt aacttaaact tactagttta
301 gaccocggcat attgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccagca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 caaggcgtag aagctttgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga

Muestra: 4-3- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccggc gccctagcgt gagggtgcca
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggctgcat gaatggttcg acgagggctt
121 aactgtttct tacctttata atgaaattga aatatagggtg aagatgcctt tatgaaaaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc ttcgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gcaaactctaa cctcaaaagt aatttaaact tactagtcta
301 gaccocggcat atcgctcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccaaca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
421 tagggcgtag aagctctgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga

Muestra: 4-4- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaaccggc gccctagcgt gagggtgcca
61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggctgcat gaatggttcg acgagggctt
121 aactgtttct tacctttata atgaaattga aatatagggtg aagatgcctt tatgaaaaaa
181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc ttcgagattt
241 ttaggtgggg cgcctataga gcaaactctaa cctcaaaagt aatttaaact tactagtcta
301 gaccocggcat atcgctcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccaaca
361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt

421 tagggcgtag aagctctgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga

Muestra: 4-5- 16S Tamaño: 474 bp

Secuencia de nucleótidos

1 actttcagca atacctgccc ggtgcaaagt gtaaacggcc gccctagcgt gaggggtgcga
 61 aggtagcgaa attccttgcc ttttaattgt aggctgcat gaatggttcg acgagggctt
 121 aactgtttct tacctttata atgaaattga aatatagggtg aagatgcctt tatgaaaaaa
 181 ttagacaaaa agaccccgtg caacttttta aaatcgggtga atttagaagc ttcgagattt
 241 ttaggtgggg cgcctataga gcaaatctaa cctcaaaagt aatttaaact tactagtcta
 301 gaccocggcat atcgtcgatc taaggagaag ttacgccggg gataacaggc ttatccaaca
 361 gtagagctcg tattggctgt tgggattggc acctcgatgt tgaatcaggg atgatacctt
 421 tagggcgtag aagctctgaa agtgggtctg ttcgacctt aataccctac gtga

Anexo 2. Sitios variables encontradas en los 20 ejemplares de *C. iridescens*

Tabla 9. Posiciones de los nucleótidos variables de la secuencias de ADN según muestra.

haplotipos	ZONA MUESTRAS	Sitios Variables(nucleótidos de las secuencias de ADN)															
		59	109	139	155	174	175	177	233	262	283	298	313	358	421	423	436
hap1	1-1-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap1	1-2-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap1	1-3-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap1	1-4-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap1	1-5-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap1	2-1-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap2	2-2-16Sbr	G	C	T	T	G	A	A	C	C	T	C	C	A	T	G	C
hap1	2-3-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap2	2-4-16Sbr	G	C	T	T	G	A	A	C	C	T	C	C	A	T	G	C
hap2	2-5-16Sbr	G	C	T	T	G	A	A	C	C	T	C	C	A	T	G	C
hap1	3-1-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap1	3-2-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap1	3-3-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap1	3-4-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap1	3-5-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap2	4-1-16Sbr	G	C	T	T	G	A	A	C	C	T	C	C	A	T	G	C
hap1	4-2-16Sbr	T	T	C	A	A	G	G	T	T	C	T	T	G	C	A	T
hap2	4-3-16Sbr	G	C	T	T	G	A	A	C	C	T	C	C	A	T	G	C
hap2	4-4-16Sbr	G	C	T	T	G	A	A	C	C	T	C	C	A	T	G	C
hap2	4-5-16Sbr	G	C	T	T	G	A	A	C	C	T	C	C	A	T	G	C