



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y
CIENCIAS DEL MAR
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA PESQUERA



TESIS DE PREGRADO

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA
GENÉTICA POBLACIONAL DEL CANGREJO DEL
MANGLAR (*Ucides occidentalis*) UTILIZANDO LA
REGIÓN DE CONTROL MITOCONDRIAL Y EL
GEN CITOCROMO OXIDASA I. TUMBES, 2014**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
PESQUERO

PRESENTADO POR:

Est. Ronald García Camizán
Est. Marvin Risco Sampértegui

TUMBES, PERÚ

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y
CINCIAS DEL MAR
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA PESQUERA



TESIS DE PREGRADO

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA
GENÉTICA POBLACIONAL DEL CANGREJO DEL
MANGLAR(*Ucides occidentalis*) UTILIZANDO LA
REGIÓN DE CONTROL MITOCONDRIAL Y EL
GEN CITOCROMO OXIDASA I. TUMBES, 2014**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
PESQUERO

PRESENTADO POR:

Est. Ronald García Camizán
Est. Marvin Risco Sampértegui

TUMBES, PERÚ

2015

RESPONSABLES

RONALD GARCÍA CAMIZÁN

EJECUTOR

MARVIN RISCO SAMPÉRTEGUI

EJECUTOR

Mg. ALBERTO ORDINOLA ZAPATA

ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dr. OSCAR A. MENDOZA NEYRA

PRESIDENTE

Ing. TESSY PERALTA ORTIZ

SECRETARIO

Ing. JORGE H. CARRASCO CASARIEGO

VOCAL

AGRADECIMIENTO

A DIOS, por habernos dado salud, vida, sabiduría y fuerza necesaria para poder llevar la presente tesis alcanzando esta gran meta que nos propusimos hace algún tiempo.

Agradecemos a nuestras respectivas familias: García Camizán y Risco Sampértegui

A la empresa Inca Biotec S.A.C, por su colaboración con el apoyo de sus profesionales, principalmente, Juan Solano quien nos apoyó durante las actividades realizadas en la presente tesis.

Al Mg. Béder Ramírez Segura por su apoyo incondicional durante todas las actividades realizadas en el presente trabajo, y también a Jerson Fiestas Guerrero por su gran aporte durante la recolección de las especies.

A nuestro asesor Mg. Alberto Ordinola Zapata y miembros del Jurado de Tesis, Dr. Oscar Mendoza Neyra, Ing. Jorge Carrasco Casariego e Ing. Tessy Peralta Ortiz, por su asesoramiento, observaciones y recomendaciones que condujeron a la mejora del informe final de tesis.

DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza necesaria, la vida y la salud. Por permitirme haber llegado a este momento tan importante de mi formación profesional.

A mis padres Catalino García y Hermelinda Camizán, por haberme apoyado en todo momento de mi vida, tanto en mi vida personal como en mi formación profesional, por brindarme sus consejos y valores que permitieron desarrollarme y desenvolverme como una persona de bien.

A cada uno de mis hermanos, Cranelio, Hermenegildo, Orfelinda, Ana Luisa y Elix por el apoyo incondicional que me dieron en cada momento de mi vida personal y profesional; en especial a mi hermano Ernesto Antonio quien me impulsó a estudiar y fue como un padre para mí.

Ronald García Camizán

A mis padres Nelly Sampértegui Tello y Miguel Risco Paico por darme el coraje, la fuerza, la voluntad y los principios morales para lograr este objetivo y no desistir ante los problemas de la vida. A mis hermanos Cristhian y Nathaniel Risco Sampértegui por ser modelos a seguir y por el apoyo moral e incondicional que me brindaron en cada momento de mi formación académica.

Marvin Risco Sampértegui

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
Resumen	xiv
Abstract	xv
I. INTRODUCCIÓN	16
II. ANTECEDENTES	18
2.1. El cangrejo del manglar <i>Ucides occidentalis</i>	18
2.2. Diversidad genética	21
2.3. Estructura genética poblacional	23
2.4. Marcadores moleculares	26
2.4.1. Marcadores moleculares basados en ADN mitocondrial	27
2.4.2. Gen de la región de control mitocondrial	29
2.4.3. Gen de la citocromo oxidasa I	30
2.5. Investigaciones relacionadas con la diversidad y estructura genética del genero <i>Ucides</i>	31
III. MATERIAL Y MÉTODOS	36
3.1. MATERIALES	36
3.2. MÉTODOS	38
4.2.1. Lugar y período de ejecución del experimento	38
4.2.2. Tipo y diseño de la investigación	39
4.2.3. Población y muestra de estudio	39
4.2.4. Obtención de ejemplares de <i>U. occidentalis</i>	41
4.2.5. Obtención de hemolinfa de <i>U. occidentalis</i>	42
4.2.6. Extracción del ADN	42
4.2.7. Amplificación del fragmento de la región de control y el gen de la citocromo oxidasa I	44
4.2.8. Electroforesis	45
4.2.9. Secuenciación del ADN	46
4.2.10. Procesamiento y análisis de datos	47
IV. RESULTADOS	49
5.1. Amplificación del fragmento de la región de control mitocondrial	49
5.2. Amplificación del fragmento COI	50
5.3. Verificación de la identidad del fragmento del gen COI	51

5.4. Diversidad genética poblacional	53
5.5. Estructura genética poblacional	56
V. DISCUSIÓN	59
VI. CONCLUSIONES	65
VII. RECOMENDACIONES	66
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	74

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Zona de muestreo de <i>U. occidentalis</i>	41
Tabla 2. Volumen de reactivos para preparar un <i>mix</i> necesario para una reacción de PCR.	45
Tabla 3. Programación del termociclador para la amplificación de los fragmentos de los genes de la región mitocondrial y de la citocromo oxidasa I.	45
Tabla 4. Muestras de ADN de <i>U. occidentalis</i> , extraídas, amplificadas y no amplificadas por el gen de la región de control mitocondrial	49
Tabla 5. Muestras de ADN de <i>U. occidentalis</i> , extraídas, amplificadas y no amplificadas por el gen COI.	50
Tabla 6. Características de las secuencias del fragmento del gen COI de <i>U. occidentalis</i> .	52
Tabla 7. Secuencias de ADN de la base de datos de GenBank que presentan el mayor índice de identidad (%) con las 13 secuencias del fragmento del gen COI de <i>U. occidentalis</i> .	53
Tabla 8. Principales parámetros de diversidad genética obtenidos en base a las 13 secuencias del fragmento del gen COI de <i>U. occidentalis</i>	54
Tabla 9. Frecuencia de haplotipos del gen COI en <i>U. occidentalis</i> según zona de muestreo	55
Tabla 10. Matriz de la distancia genética de Nei según zona y estación de muestreo.	56
Tabla 11. Análisis de varianza molecular de <i>U. occidentalis</i> utilizando como marcador el gen COI.	57
Tabla 12. Test de Mantel para evaluar la correlación entre la matriz de la distancia geográfica (x) y la matriz de distancia genética (y).	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del manglar tumbesino señalando las 9 estaciones de muestreo.	41
Figura 2. Amplificación de la región de control mitocondrial.	49
Figura 3. Amplificación del gen COI.	51
Figura 4. Diagrama de dispersión y recta de regresión de los datos de distancia geográfica y distancia genética de <i>U. occidentalis</i> .	58

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Secuencias de los 13 individuos de <i>U. occidentalis</i> utilizando el gen COI	75
Anexo 2. Nucleótidos de las posiciones variables de la secuencias de ADN según haplotipo.	80

Diversidad genética y estructura genética poblacional del cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) utilizando la región de control mitocondrial y el gen de la Citocromo Oxidasa I. Tumbes, 2014

Est. Ronald Garcia Camizan¹
Est. Marvin Crushindo Risco Sampertegui¹
Mg. Alberto Ordinola Zapata²

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la diversidad y estructura genético poblacional del cangrejo del manglar *Ucides occidentalis* en el manglar de Tumbes. El estudio se realizó entre julio de 2014 y julio de 2015, en 3 zonas del manglar de Tumbes: Zarumilla, Puerto Pizarro y Corrales. Se estableció 3 puntos de muestreo por zona y se recolectó un total de 45 ejemplares de *U. occidentalis*, a los que se extrajo hemolinfa para obtener ADN. Se intentó amplificar 39 de las muestras de ADN mediante PCR, 18 de ellas con los *primers* DL.USSA.F1 y DL.USSA.R1, correspondientes a un fragmento de la región de control mitocondrial (CR) (no logrando amplificarse ninguna) y las 21 muestras restantes con los *primers* universales LCO1490 y HCO2198 correspondientes al fragmento del gen COI (logrando amplificarse 18 muestras). Los amplicones fueron enviados a la Empresa MacroGen en EEUU. para ser secuenciadas, pudiendo serlo 16, de éstas se descartaron 3 por que sus secuencias no eran precisas, las 13 restantes fueron alineadas obteniéndose secuencias de 494 pb para el análisis. Los resultados mostraron una similitud de 85% a 99 % con secuencias similares a fragmentos del gen COI de varios cangrejos almacenadas en GenBank. Respecto a la diversidad genética se determinó un alto índice de diversidad a través de los parámetros: número de haplotipos (h): 13, frecuencia del haplotipo más frecuente: 7,69 % y diversidad de haplotipos: 1; promedio de diferencias en nucleótidos: 7,167 y diversidad nucleotídica (π): 0,01451. En cuanto a la estructura genética poblacional, se determinó utilizando el análisis de varianza molecular (AMOVA) fue bastante baja, dado que el 81 % de la variabilidad genética se presentó entre los individuos dentro de las poblaciones y sólo 3 % entre las poblaciones. Mediante el test de Mantel se demostró que no existió correlación ($r=-0,007$, $R^2=0,0005$) entre la distancia geográfica y la distancia genética. Se concluyó que la diversidad genética fue alta y la estructura genética poblacional baja en *U. occidentalis* en el manglar de Tumbes el año 2014.

Palabras claves: Diversidad genética, estructura genética poblacional, *Ucides occidentalis*, COI, región de control mitocondrial.

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

²Profesor Principal de la Escuela de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes

Genetic diversity and population genetic structure of the mangrove crab (*Ucides occidentalis*) using the mitochondrial control region and cytochrome oxidase I gene. Tumbes, 2014

Est. Ronald García Camizan¹
Est. Marvin Risco Sampertegui¹
Mg. Alberto Ordinola Zapata²

ABSTRACT

This research aimed to determine the genetic diversity and population genetic structure of the mangrove crab *Ucides occidentalis* in the mangrove of Tumbes in 2014. The study was conducted between July 2014 and July 2015, in 3 areas of the mangrove of Tumbes Zarumilla Puerto Pizarro and Corrales. three sampling points per area were established and were collected in total 45 specimens of *U. occidentalis*, which hemolymph was extracted for to obtain DNA. We attempted to amplify 39 DNA samples by PCR, including 18 with DL.USSA.R1 and DL.USSA.F1 primers corresponding to a fragment of the mitochondrial control region (CR) (failing amplified none) and the remaining 21 samples with HCO2198 and LCO1490 universal primers for the COI gene fragment (achieving 18 samples amplified). The amplicons were sent to the US company MacroGen to be sequenced and 16 may be, three of these were discarded because their sequences were inaccurate, the remaining 13 were aligned obtained 494 bp sequences for the analysis. The results showed a similarity of 85% to 99% with similar sequences from gene fragments COI of the several crabs stored in GenBank. Regarding the genetic diversity, a high diversity index was determined by the parameters: number of haplotypes (h): 13, frequency of the most common haplotype: 7.69% and haplotype diversity: 1; nucleotide differences in average: 7,167 and nucleotide diversity (π): 0.01451. The population genetic structure was determined using analysis of molecular variance (AMOVA) and was quite low, given that 81% of genetic variability occurred among individuals within populations and only 3% among populations. By Mantel test it showed that there was no correlation ($r = -0.007$, $R^2 = 0.0005$) between geographic distance and genetic distance. It was concluded that genetic diversity was high and the population genetic structure was low in *U. occidentalis* in the mangrove of Tumbes in 2014.

Keywords: Genetic diversity, population genetic structure, *Ucides occidentalis*, COI, mitochondrial control region.

¹ Students of the Fishery Engineering School of the National University of Tumbes.

¹ Principal Professor of the Fishery Engineering School and Marine Sciences of the National University of Tumbes

Thesis to obtain the professional title of Fishery Engineer
National University of Tumbes
Fishery Engineering and Marine Sciences Faculty
Fishery Engineering School
The Ceibos S/N Street, Puerto Pizarro, Tumbes-Perú
e-mail: ronald_9_cancer_10@hotmail.com , arcario@hotmail.com

I. INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se estudió la diversidad genética y estructura genética poblacional de *U. occidentalis*, este trabajo es sumamente importante debido a la fuerte explotación que recibe este recurso de los manglares, predisponiendo a un futuro no muy lejano tienda a desaparecer. Con este trabajo se da a conocer su diversidad genética y estructura genética poblacional, como uno de los principales pilares a tener en cuenta, porque a partir del conocimiento de su diversidad genética y su estructura genética poblacional se puede realizar investigación para la obtención de larvas de *U. occidentalis* con fines de repoblamiento.

Los únicos trabajos que se realizaron sobre la diversidad genética y estructura genética poblacional en *U. occidentalis*, fueron en el Ecuador por Ratti y Muñoz (2010), por su parte, en el Perú y específicamente en Tumbes, solo se ha realizado por Ordinola (2012).

U. occidentalis es el cangrejo del manglar más comercial en la región Tumbes, sin embargo está sobre explotado, su población según Ordinola, Montero y Gonzales (2010) se ha reducido en 11 años de 120 millones de individuos (año 1996) a 77,06 millones (año 2007), que indica una caída de su población del 35,8 %.

El cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) es una de las especies más importantes del ecosistema del manglar ya que se encarga del reciclamiento de hasta el 80 % de la hojarasca del mangle, también ayuda a airear el suelo del manglar cuando realiza sus madrigueras poniendo en actividad a las bacterias aeróbicas (Solano 2006).

La diversidad genética y estructura genética poblacional son parámetros que se deben tener en cuenta cuando se quiere evaluar una caracterización genética, por tal motivo se realizó el estudio en *U. occidentalis* y que tuvo como objetivo general.

Determinar la diversidad genética y estructura genética poblacional medida a través del gen de la región de control mitocondrial que presenta el cangrejo del manglar (*U. occidentalis*) en los manglares de la región Tumbes el año 2014.

Y como objetivos específicos:

1. Determinar la diversidad genética medida a través del gen de la región de control mitocondrial y el gen de la Citocromo Oxidasa I, que presenta el cangrejo del manglar (*U. occidentalis*) en los manglares de la región Tumbes el año 2014.
2. Determinar la estructura genética poblacional medida a través del gen de la región de control mitocondrial y el gen de la Citocromo Oxidasa I, que presenta el cangrejo del manglar (*U. occidentalis*) en los manglares de la región Tumbes el año 2014.

II. ANTECEDENTES

2.1. El cangrejo del manglar *Ucides occidentalis*.

Según Ficher et al. (1995), el género *Ucides* agrupa cangrejos braquiuros pertenecientes a la familia Ocypodidae que se encuentran en la región tropical de América, su hábitat se encuentra en zonas litorales, en substratos blandos y lodosos en el mangle y cerca al agua; Tazan y Wolf (2000) citados por Solano (2006), señalan que estos cangrejos se albergan en madrigueras que en su primera sección son verticales (20 a 30 cm), y luego se sesgan para alcanzar profundidades que pueden llegar hasta 2 m; los cangrejos salen a la superficie para forrajear cuando desciende el nivel de las aguas (Jones 1984 citado por Solano 2006). El género incluye 2 especies: *U. occidentalis* que habita la costa del Pacífico y *U. cordatus* que habita la costa del Atlántico (Moreno, Solano y Mendivez 2001); aunque Türkay (1970) citado por Ewald (2006), señala más bien que son una sola especie: *Ucides cordatus* con 2 sub-especies: *U. cordatus cordatus* en el Atlántico y *U. cordatus occidentalis* en el Pacífico, con forma intermedia en Panamá y Colombia.

Ucides occidentalis se localiza en la costa del Pacífico Americano, desde la isla Espíritu Santo en Baja California (México) hasta llegar a la desembocadura del río Tumbes, en Perú (Bright and Hoque 1972 citado por Moreno, Solano y Mendivez 2001).

U. occidentalis es un cangrejo adaptado al medio terrestre que habita en la zona intermareal. Una de sus características es que posee un caparazón ovalado; a demascámaras branquiales hinchadas bien delimitadas y fuertemente proyectadas a los lados que albergan 5 branquias cada una, pedúnculo ocular robusto casi vertical; siendo en el caso de los machos que los quelípedos son muy largos, algo asimétricos, con numerosos tubérculos y espinas. El color del caparazón es rojo grisáceo, con los márgenes laterales

rojoanaranjado; los periópodos y gran parte de los quelípedos son de color rojo oscuro; la región ventral es café o blanca (Ratti y Muñoz 2010).

El cangrejo del manglar es una especie de gran importancia para el manglar debido a que cumple un rol muy importante en la eliminación de hojas caídas del mangle. *U. occidentalis* es de inmensa importancia ecológica y su contribución al manglar ha sido demostrada en importantes estudios de simulación dinámica de eliminación de la hojarasca realizados por Tazán y Wolf (2000) citado por Solano (2006), quienes señalan que sin la existencia y la interacción del cangrejo del manglar con los manglares, cerca del 75 % al 84 % de la materia orgánica se escaparía de los manglares; es decir solamente del 16 % al 25 % de la materia orgánica se reciclaría lo que garantizaría un devastador empobrecimiento del suelo del manglar.

U. occidentalis es un crustáceo del orden decápodo por poseer 10 periópodos, además posee caparazón que mide aproximadamente de 8 - 10 cm de ancho cuando es adulto y llegan a vivir hasta 13 años. Existen diferencias muy notables entre machos (más grandes con quelas grandes, muchas vellosidades en los periópodos y abdomen estrecho) y hembras (más pequeñas y con abdomen amplio); *U. occidentalis* es una especie que se caracteriza por presentar dimorfismo sexual externo y presenta fecundación sexual interna, al encontrarse en situación de cópula el cangrejo macho transporta los espermatozoides a la hembra por medio de sus órganos copulares (Solano 2006).

U. occidentalis para lograr su desarrollo requiere cambiar de caparazón como todo crustáceo, sufre mudas para lograr su desarrollo; cuando se encuentra en estadio juvenil puede darse varias veces al año, pero en el caso de los adultos es diferente ya que sólo sucede una vez al año. Cuando el cangrejo se encuentra

en una situación de muda se entierra y tapa su madriguera, muda su caparazón apareciendo su exoesqueleto blando, presenta color blanco y por eso se le dice cangrejo lechoso, siendo en esta fase protegido por ley, Nº 007-2003/GOBIERNO REGIONAL-CR-P. En esta ordenanza se indican las vedas dadas para *U. occidentalis* tanto su primera veda, la veda reproductiva que comienza el 15 de enero al 28 de febrero y su segunda veda, que indica no debe ser extraído de su hábitad para no ser consumido desde el 15 de agosto al 30 setiembre, puesto que es dañino para la salud porque se encuentran produciendo sustancias químicas que traen como consecuencia diarrea, vómitos y dolores abdominales. En esta ordenanza también se estableció la talla mínima de extracción en 65 mm de ancho cefalotorácico que logran alcanzar entre 3 a 4 años de edad y las hembras jamás deben ser extraídas ni capturadas, para lograr un equilibrio poblacional (una hembra desova hasta 250 000 huevos), de los cuales sólo el 5 % llegan a ser adultos (Lomas et al. 2009).

A pesar de estas medidas, la población de *U. occidentalis* en los manglares de la región Tumbes ha sufrido una desmedida reducción pasando de 120 millones en el año 1996 a 77,06 millones en el año 2007; representando un decrecimiento del 35,8 % de la población en 11 años (Ordinola, Montero y Gonzales 2010).

La drástica reducción de su población de *U. occidentalis* en los manglares de Tumbes, pone a la especie en amenaza de desaparecer de dicha zona en un futuro cercano si no se toma a conciencia la situación del cangrejo de los manglares, esto originaría una reducción de su diversidad genética, que de ser el caso, constituiría una amenaza aún mayor, pues como han señalado por Povh et al. (2008), la reducción de la diversidad genética conduce a la disminución de la capacidad de la población para resistir a nuevas enfermedades y adaptarse a los cambios ambientales.

El cangrejo del manglar tumbesino se encuentra en una situación similar a la que afrontó el cangrejo del manglar brasileño (*Ucides cordatus*), por su captura indiscriminada, por la degradación de su hábitat y la aparición de la enfermedad del cangrejo letárgico, que llegó a reducir desmedidamente su población. En 2001 se logró iniciar una serie de programas de repoblamiento que produjeron masivamente larvas para su liberación al medio natural sin un estudio previo sobre su diversidad genética con lo que si bien se logró incrementar la población, sin embargo, se redujo la diversidad (Ventura 2006).

En la actualidad se está estudiando la diversidad genética de *U. cordatus* con el objetivo de mejorar las estrategias de manejo del repoblamiento (Oliveira 2009).

2.2 Diversidad genética.

La biodiversidad logra apreciarse en diferentes escalas, a nivel de comunidades, de poblaciones e incluso de individuos, pero toda esta diversidad es sólo la expresión fenotípica de una diversidad más profunda, la diversidad genética que determina la interacción de una especie con su ambiente y con otras especies. Toda la diversidad o variación genética se lleva a cabo en el ámbito molecular al comenzar las mutaciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Moreno 2001 citado por Ordinola 2012).

La diversidad genética es el componente en el que actúa la selección natural para dar origen a adaptaciones que permitan la supervivencia y perpetuidad de una especie; es por ello que una alta diversidad genética es indicador de buenas condiciones, lo contrario se obtendría una población con deficiente capacidad de respuesta al medio cambiante en el corto y largo plazo (Moreno 2007).

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

La diversidad genética logra medirse a diferentes escalas, como diversidad a nivel individual (o dentro de los individuos), cuando se mide la diversidad de alelos que posee el ADN de un individuo; a nivel de población (o dentro de la población) cuando se realiza la comparación entre el conjunto de alelos de todos los genes que forman parte de dicha población y a nivel de poblaciones (o entre poblaciones), cuando se hace una previa evaluación de la diversidad de alelos entre todos los genes de todos los individuos que forman parte de dichas poblaciones(González 2008).

Nei (1987) citado por González (2008), asegura que el promedio de diversidad genética o también llamada heterocigosidad es la metodología más adecuada de la variación genética. La heterocigosidad esperada de una población (H_e) es la media de los resultados obtenidos para cada locus en dicha población. Cuando las poblaciones que se encuentran bajo equilibrio Hardy-Weinberg, la heterocigosidad puede ser calculada a partir de la frecuencia alélica. Por lo tanto, la heterocigosidad esperada cuantifica la igualdad o equitatividad de las frecuencias alélicas en los loci(Hoelzel 1998; Sosa et al. 2002 citados en González 2008). Además, los resultados diferentes entre la heterocigosis observada (H_o) y la heterocigosis esperada (H_e) es un apoyo para hacer la evaluación entre la estructura genética de las poblaciones (Nei 1987 citado por González 2008).

La diversidad genética tiene una característica fundamental que posee una reserva genética que permite a la especie ser inmune a amenazas que atentan contra la supervivencia como son los diferentes factores: Enfermedades, los cambios climáticos o cambios en el equilibrio ecológico. La diversidad genética existente entre las poblaciones se logra encontrar distribuida de manera uniforme o no, constituyendo lo que se denomina estructura genética poblacional y que formalmente se conceptualiza como la cantidad y distribución de la diversidad genética dentro de las poblaciones, esto sucede cuando las frecuencias alélicas no logran distribuirse al azar sino que siguen un modelo de patrón o arquitectura, espacial o temporal.

En la cuestión de especies tales como *U. occidentalis*, cuyo tiempo de estadio larvario demanda de mucho tiempo, es posible que el flujo génico que significa el traslado de genes a través de la inmigración de individuos en estadio larval o adultos, tenga un gran efecto de tener en cuenta reduciendo la estructura genética e incrementando la diversidad genética. Esta situación ha sido constatada en el cangrejo del manglar brasileño (*Ucides cordatus*) que es la otra especie del género *Ucides* que se halla en el Atlántico; debido a numerosas investigaciones realizadas en el Brasil se ha llegado a la conclusión que la población de *U. cordatus* posee un alto nivel de diversidad genética y un deficiente nivel de estructura genética poblacional, por lo que, podría inferirse que la población de *U. occidentalis* tendría un comportamiento similar (Ordinola 2012).

2.3 Estructura genética poblacional:

La estructura genética es la cantidad y distribución de la variabilidad genética dentro de las poblaciones (Henríquez 2003); sin embargo, González (2008), indica que la estructura genética es el nivel en la que existen diferencias como son diferentes tipos de alélos y sus frecuencias en una población no se puede distribuir al

azar, sino que tienden a seguir un modelo de patrón o arquitectura que bien puede ser espacial o temporal.

Por otra parte, la estructura genética interpoblacional es el resultado de la distribución geográfica y en el espacio de subpoblaciones entre las cuales siempre existirán diferencias genéticas. Debe entenderse que la estructura genética de una población se ve influenciada por las 4 principales fuerzas evolutivas: la tasa de mutación, la deriva génica, el flujo genético y la selección natural (De la Rosa 2012).

La estructura genética poblacional se logra medir a través de:

- a) La distancia genética
- b) Estadísticos F de Wright (índices de fijación)
- c) El análisis de varianza molecular (AMOVA)

La estructura genética poblacional es evaluada por diversos parámetros entre los cuales destaca la distancia genética, que es la medida principal que se tomó como modelo para crear otras formas de medición, siendo una de las más puesta en práctica la distancia genética de Nei que logra estimar principalmente el número de genes o codones sustituidos por *locus* entre poblaciones. Nei (1972) citado por González (2008), conceptualizó como primer punto la identidad genética entre dos poblaciones como una de las probabilidades de que dos alelos (uno de cada población) logren ser idénticos, indicando que el valor de la identidad genética puede variar de cero (para poblaciones completamente distintas) hasta uno (si son genéticamente idénticas), una vez ya identificado el valor para la identidad genética (I), la distancia genética (D) se obtiene mediante el logaritmo de la primera: $D = -\ln I$. De esta manera, la distancia genética toma valores que oscilan entre cero y el infinito (Nei 1972 citado en González 2008).

Los estadísticos F de Wright también conocidos como índices de fijación, evalúan una característica de declinación de la heterocigosidad debida a la subdivisión en el interior de la población. El estadístico F es una medida de la diferencia entre la media de heterocigosidad entre las subdivisiones en la población, y la frecuencia potencial de heterocigotos si todos los miembros de una población interactuaran cruzándose libremente (Hartl and Clark 1997). El resultado de índice de fijación es cero (indicando que no existe ninguna diferenciación entre la población total y sus subpoblaciones) a un máximo teórico de 1. En la práctica el índice de fijación observado, es mucho menor que 1 en poblaciones características altamente diferenciadas.

Los índices de fijación logran ser determinados para diferentes niveles de la estructura poblacional, un ejemplo claro, es el grado de diferenciación dentro de una población entre grupos o demos (F_{SG}), dentro de grupos entre demos (F_{GT}), y dentro de una población entre demos (F_{ST}) (Hartl and Clark 1997).

Otra metodología de medir la estructura genética poblacional se debe a Excoffier, Smouse and Quattro (1992) quienes pusieron a propuesta, una de las medidas más utilizadas para evaluar la estructura poblacional en la actualidad, muy identificada como análisis de varianza molecular, AMOVA que es un método en el que se logra estimar la diferenciación de las poblaciones directamente desde los resultados moleculares y previamente una prueba de hipótesis acerca de la diversidad. Este método es aplicable a una variedad de datos moleculares procedentes de marcadores moleculares tales como por ejemplo el el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) o el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), a datos de secuenciamiento de ADN, a árboles filogenéticos basados en tales datos.

AMOVA es similar a un análisis jerárquico de varianza en que tiende a evaluar la diversidad genética en tres siguientes niveles: diversidad entre grupos de poblaciones, diversidad entre las poblaciones dentro de los grupos y la diversidad entre los individuos dentro de la población. Sin embargo, surge una distinción de un análisis jerárquico de varianza en que puede acoplarse diferentes asunciones evolucionarias sin ser modificadas la estructura básica de los análisis y que las hipótesis son probadas usando métodos permutacionales de tal manera que no se llega al punto de requerir a la asunción de que los datos siguen una distribución normal. Actualmente AMOVA es una de las medidas más eficaz para lograr la determinación la existencia de estructura genética poblacional (Ordinola 2012).

2.4 Marcadores moleculares:

Los marcadores moleculares pertenecen a cualquier gen cuya expresión establece un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas), y que además es detectado fácilmente. Posee la ventaja de ser evaluado desde los primeros estadios de desarrollo de un individuo, obteniéndose de todo el individuo o de una parte de él. Actualmente existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos y los marcadores de ADN (Solís y Torres 2005).

Arif and Khan (2009), señala que los principales marcadores moleculares basados en el ADN nuclear son ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), AFLP y los microsatélites, y en el caso de los marcadores moleculares basados en ADN mitocondrial los genes 12S ADNr y 16S ADNr (genes que codifican las subunidades de los ribosomas mitocondriales) y a la región de control (CR).

El secuenciamiento de ADN da a conocer exactamente la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN, con lo que cualquier

variabilidad en dicho fragmento se detectará, esto la hace una técnica superior a cualquiera de las restantes.

2.4.1 Marcadores moleculares basados en ADN mitocondrial

Los marcadores moleculares son biomoléculas que se relacionan con un rasgo genético, pero que posee variaciones o polimorfismos suficientes para agrupar a ciertos organismos, y funcionan como un señalador de diferentes regiones del genoma Picca et al. (2004) citado por Mori (2010). Estas biomoléculas pueden ser proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia). Los marcadores de ADN son secuencias que actúan como marcaje, siendo teóricamente posible observar y explotar la variación genética de las especies a través del ADN mitocondrial (ADNmt), ADN ribosomal (ADNr), minisatélites o número variables de repeticiones en tándem (VNTR), RFLP, RAPD, AFLP y los microsátélites (Avisé, Liu y Cordes 2004 citado por Mori 2010).

El ADN mitocondrial (ADNmt) de los crustáceos se asemeja al resto del reino animal, se trata de una molécula de ADN haploide que es heredado por vía materna y presenta un tamaño que oscila entre 15 000 a 17 000 pares de bases (pb), con una forma cerrada o circular. El ADNmt codifica 37 genes, de los cuales, 2 son genes ribosomales (12S rADN y 16S rADN), 22 son genes que codifican para ARN de transferencia (ARNt) y 13 son genes que codifican para proteínas (Ewald 2006).

Las sucesiones de ADN mitocondrial (ADNmt) son sumamente apropiadas para lograr evaluar la diversidad, estructura genética y la fitogeografía (Shih et al. 2011). El

ADNmt posee una gran ventaja fundamental frente al ADN nuclear, dado que en cada célula existen cientos y algunas veces miles de mitocondrias en cada una de ellas presentan copias del ADNmt, con lo que en cada célula puede haber miles de copias del ADNmt; en comparación con el ADN nuclear que sólo presenta una copia del ADN nuclear. Una de las ventajas es que el ADNmt, es haploide y se hereda únicamente por línea materna (salvo raras excepciones), también tiende a degradarse más lentamente que el ADN nuclear y puede usarse para analizar ADN antiguo, así también el efecto de la deriva genética es más fuerte en el ADNmt y la diferenciación poblacional logra apreciarse más fácilmente en el ADNmt que en el ADN nuclear pues el ADNmt evoluciona hasta 10 veces más rápido que el ADN nuclear (Ewald 2006; Shih et al. 2011).

Las características diferentes de los genes que conforman el genoma mitocondrial presentan diversas tasas de mutación, por lo que se han usado para evaluar la diversidad a diferentes niveles taxonómicos, así por ejemplo, el gen 12S ADNr presenta una conservación mucho mayor y se usa para determinar los *taxas* más altos *phyla* y *subphyla*; la conservación del gen 16S ADNr es deficiente, por lo que se utiliza para diferenciar *taxas* de categoría media tales como familias, mientras que los genes que codifican proteínas mitocondriales presentan una conservación deficiente 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 (Arif and Khan 2009).

2.4.2 Gen de la región de control mitocondrial.

La mayor región no codificante del ADNmt está localizado entre las regiones codificadoras de dos ARNs transportadores (ARNt-Pro y ARNt-Phe). Esta es la región control o D-Loop que contiene 1112 pb y se fija entre el gen que codifica el ARN de transferencia de la prolina y el de la fenilalanina, (*displacement loop structure*) porque contiene los sitios de inicio de la replicación de la hebra pesada (H) y los promotores de transcripción de las dos hebras (L – H). La región de control es responsable de la variación del tamaño del genoma mitocondrial, pues en algunos organismos la región de control posee inserciones de pares de bases que pueden llegar a centenas de nucleótidos (Mori 2010).

La región de control sobresale porque presenta una elevada tasa de mutación, aproximadamente 10 veces mayor que en las regiones codificantes (Mori 2010).

El estudio del gen la región de control mitocondrial implica tener que amplificarlo, para ello es necesario someterlo a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual se debe contar con *primers* que permitan amplificarlo. Existen varios *primers* que han sido diseñados con el fin de amplificar fragmentos de la región de control mitocondrial; para llevar a cabo esta investigación se utilizarán los *primers* de Pie et al. (2008):

Primer forward: DL.USSA.F1: 5'-GTATAACCGCGAATGCTGGCAC- 3'

Primerreverse: DL.USSA.R1: 5'-GGTTAGAGAGAAGGTTAGAGGAC-3'

2.4.3 Gen de la Citocromo Oxidasa I (COI).

La citocromo oxidasa es una enzima mitocondrial y de algunas bacterias que conduce a la formación de una molécula energética como la adenosintrifosfato (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 unidadCitocromoxidasa (COI), es un gen altamente conservado pero tiene regiones de alta tasa de mutación por lo que se utiliza 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 lo cual utilizaron secuencias de ADN de invertebrados como:mejillón azul(*Mytilus edulis*), mosca de la fruta (*Drosophila yakuba*); abeja (*Apis mellifera*); mosquito (*Anopheles gambiae*), artemia (*Artemia franciscana*), los nematodes *Ascaris suum* y *Caenorhabditis elegans*; erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*), carpa (*Cyprinus carpio*), rana (*Xenopus laevis*), pollo (*Gallus gallus*), ratón (*Mus musculus*), vaca (*Bos taurus*), ballena de aleta (*Balaenoptera physalus*) y del ser humano (*Homo sapiens*), encontrando que el siguiente par de *primers* consistentemente amplificaron un fragmento de COI de 710 pb a través del más amplio conjunto de invertebrados:

Primer forward LCO1490: 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

Primer reverse HCO2198: 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

Los *primers* señalados fueron utilizados en evaluación de diferentes estudios sobre el gen COI en animales como son: el cangrejo verde *Carcinus maenas* (Román and Palumbi 2004), en el cangrejo de río *Potamonautes perlatus* (Daniels 2003), en el cangrejo de río *Austropotamobius torrentium* (Schubart and Huber 2006), en la langosta espinosa de California *Panulirus interruptus* (García and Pérez 2006) e incluso en el cangrejo del manglar brasileño *U. cordatus* (Ewald 2006); mostrando la amplia utilidad que tienen los *primers* diseñados por Folmer et al. (1994) en el estudio de invertebrados y en particular en crustáceos.

2.5 Investigaciones relacionadas con la diversidad y estructura genética en el género *Ucides*.

Las investigaciones sobre *Ucides occidentalis*, son muy pocas, y de éstas la mayoría trata sobre la dinámica poblacional, siendo casi inexistentes la investigación sobre diversidad genética y estructura genética poblacional del mismo. Se han podido localizar pocas investigaciones de dicho tipo, como las realizadas por Ratti y Muñoz (2010) y Ordinola (2012). En el estudio que realizaron Ratti y Muñoz (2010), optimizaron el sistema AFLP (amplificación de fragmentos de longitud polimórfica) para determinar la diversidad genética de *U. occidentalis* en 3 zonas del manglar del Golfo de Guayaquil; obteniendo como resultado que la técnica optimizada de AFLP fue eficaz para determinar la diversidad genética de *U. occidentalis*. Encontraron también que el nivel de diversidad genética entre las poblaciones evaluadas fue bajo (F_{st} de 0,0163) a causa de la deriva génica, pero la migración no pareció ser una fuerza evolutiva que influyó significativamente en la variación. La diversidad genética

sedio primordialmente dentro de las poblaciones estudiadas. Mientras que Ordinola (2012), en su investigación amplificó el fragmento del gen de la citocromo oxidasa I (COI) para determinar la diversidad genética y estructura genética poblacional de *U. occidentalis* en 3 zonas del manglar de la región Tumbes (Zarumilla, Puerto Pizarro y Corrales); obteniendo como resultados que el nivel de diversidad genética fue alto ($\pi = 0,00810$) y el nivel de estructura genética poblacional fue bajo (la diferencia de diversidad entre poblaciones según AMOVA fue de 4 % y el análisis de correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica indicó una correlación nula, $r = -0,035$).

La diversidad genética y estructura genética poblacional en *U. occidentalis* está pobremente estudiada, al contrario, en su especie hermana, el cangrejo del manglar brasileño (*U. cordatus*) ésta ha sido mejor estudiada, por mencionar: Pie et al. (2008), estudiaron 5 ejemplares recolectados en la bahía de Guaratuba, en Brasil, de los cuales se obtuvo ADN mitocondrial y se amplificó un fragmento de la región de control (CR), determinando la existencia de un considerable nivel de variabilidad medida como función entrópica de la variabilidad nucleotídica que llegó a 42,7 %.

Por otro lado, Britto et al. (2009) citado por Ordinola (2012) realizaron un estudio sobre *U. cordatus* utilizando marcadores microsatélites en la evaluación del ADN de 46 ejemplares recolectados en las costas brasileñas, encontrando que el número de alelos en cada *locus* estudiado varió de 3 a 25, con una media de 9 alelos. Los niveles de heterocigosidad observada ($0,709 \pm 0,183$) y esperada ($0,716 \pm 0,170$) fueron altos mostrando también una diversidad genética alta.

Oliveira (2009), realizó un estudio de mayor escala sobre la diversidad genética de *U. cordatus* en la costa del Brasil, a nivel local (puntos de muestreo distantes un máximo de 100 km) y regional

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

Los estudios genéticos realizados tanto sobre *U. occidentalis* no han utilizado hasta la fecha la región de control mitocondrial, sin embargo, el uso de dicho gen es bastante común en estudios de diversidad genética, por mencionar, en crustáceos, se han realizado investigaciones usando dicho fragmento, tales como: Pie et al. (2008), utilizó la región de control (CR) mitocondrial para determinar la diversidad de poblaciones y la demografía evolutiva de *Ucides cordatus* en cinco regiones de las costas brasileñas, la distancia entre los sitios de recolección de los individuos superan los 3000 kilómetros. Para llevar a cabo esta investigación se eliminó el tejido muscular de los periópodos y se extrajo el ADN genómico, hubo una considerable variabilidad en el fragmento de estudio, con cada individuo que mostró un haplotipo CR distinto. Se utilizaron 100 individuos y se observaron 505 separaciones después de eliminar las regiones de la alineación ambigua de los sitios para definir 90 haplotipos, de los cuales sólo uno fue compartido entre localidades y

10 fueron encontrados en más de un individuo, estos haplotipos fueron depositados en el Gen Bank bajo los números de acceso EU057729 - EU05782. El valor P más bajo observado fue 0,035 lo que no es estadísticamente significativo donde no había un patrón de variabilidad genética entre las estudiadas ubicaciones de acuerdo con el NCA (análisis de clados anidados).

García (2006), realizó un trabajo sobre la diferenciación genética de las poblaciones de langosta roja (*Panulirus interruptus*) indicó que en la costa occidental de la Península de Baja California se distribuye una sola población de esta especie. Sin embargo, con el fin de determinar si en los extremos de la distribución de la especie este patrón se conserva, se realizó un análisis incluyendo muestras procedentes de California en los EE.UU. y del Golfo de California. En el presente trabajo se obtuvieron 229 muestras de tejido muscular de la langosta roja de seis sitios (Bahía Magdalena, San Juanico, Punta Abreojos, Punta Eugenia, Isla Guadalupe y Ensenada), para este trabajo se utilizó al gen de la región de control para analizar la diversidad genética de la población de la langosta roja que dio como resultado 65 haplotipos y los valores de diversidad genética fueron relativamente altos y similares entre las seis localidades. Las frecuencias de los haplotipos no fueron heterogéneas entre las poblaciones ($\chi^2= 338$, $P=0,104$) y únicamente el 0,84 % de la variabilidad genética fue explicada por diferencias entre las localidades y no fue significativamente diferente de cero ($\Phi_{st}= 0,0084$; $P=0,082$). La diversidad nucleotídica promedio fue baja (0,094%) y no mostró diferencia significativa.

García (2006) estudió la langosta azul (*Panulirus infletus*) a partir de secuencias provenientes de los fragmentos del ADNmt de la región de control con el fin de determinar la variabilidad genética (número de haploides, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica), la muestra fue colectada en el sur de Baja California (Sinaloa, Nayarit, Jalisco y Guerrero), la heterocigosidad de las frecuencias de

haploides se dio a conocer mediante la simulación de Monte Carlo, y la estructura poblacional mediante el análisis molecular de varianza (AMOVA), dando como resultados valores altos de diversidad genética y baja estructura genética poblacional entre las cinco localidades ($\chi^2= 154,48$; $P= 0,570$), la diferencia poblacional entre las localidades fue baja y no fue significativamente diferente de cero ($\Phi_{st}=-0,001$; $P=0,466$).

En todas las investigaciones en que se ha evaluado la diversidad genética y la estructura genética poblacional en *U. cordatus*, se ha determinado que poseen una alta diversidad genética y un bajo nivel de estructura genética poblacional, esto contrasta con el caso de la investigación encontrada sobre diversidad genética en *U. occidentalis* (Ratti y Muñoz 2010) ha indicado una diversidad baja, sin embargo Ordinola (2012), en su investigación de diversidad genética y estructura genética poblacional en *U. occidentalis* encontró un alto nivel de diversidad genética y un bajo nivel de estructura genética poblacional de la misma especie *U. occidentalis*. Lo más probable es que la diversidad genética sea alta y la estructura genética poblacional sea baja, debido a la migración de larvas de *U. occidentalis* que son naturalmente arrastradas por las fuertes corrientes del mar lo que conlleva a una distribución uniforme de *U. occidentalis* en el manglar de la región Tumbes.

Se observa que en especies donde las larvas permanecen largo tiempo como parte del plancton, como es el caso de *U. occidentalis*, los bivalvos y otros cangrejos, la diversidad genética es alta.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

Material biológico

- 45 muestras de ADN del cangrejo del manglar *Ucides occidentalis* de la región de Tumbes.

Equipos y materiales

Equipos y material de campo

- 1 GPS marca Garmin modelo gps76
- 1 cámara fotográfica Marca CANON
- 3 jicras de maya anchovetero

Material de laboratorio

- 10 tubos Falcón de 50 ml
- 50 jeringas de 5 ml.
- 50 agujas tuberculinas N° 18.
- 400 puntas con filtro de 10 µl
- 400 puntas con filtro de 100 µl
- 600 puntas con filtro de 1000 µl
- 300 tubos Eppendorf de 1,5 y 0,2 ml
- 1 micropipeta de 0,5-10 µl marca Axygen modelo AP-10
- 1 micropipeta de 10-100 µl marca Axygen modelo AP-100
- 1 micropipeta de 100-1000 µl 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 microondas 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
- 1Kit de 100 reacciones para amplificación y electroforesis de la región de control mitocondrial y el gen de la Citocromo Oxidasa I (COI).
- 1 marcador de tinta indeleble.
- 1 marcador de peso molecular de 100 pb a 1000pb
- 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 polímeras
- 100 µl de primer forward DL.USSA.F1:
- 100 µl de primer reverse DL.USSA.R1
- 200 µl de primer forward LCO1490.
- 200 µl de primer reverse HCO2198
- 60,0 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)
- 20 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.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Lugar y período de ejecución del experimento

El presente estudio se llevó a cabo entre los meses de julio de 2014 a junio del 2015 en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicada en la localidad de Puerto Pizarro en el distrito, provincia y región de Tumbes, La colección de muestras se realizó en 3 zonas del manglar entre julio y agosto de 2014, posteriormente se tuvo que volver a coleccionar muestras de *U. occidentalis* en diciembre del 2014, debido a que al no conseguirse amplificar con éxito el gen de la región de control mitocondrial, se solicitó la incorporación de un objetivo adicional en la tesis para evaluar el gen de la citocromo oxidasa I, por lo que tuvo que coleccionarse nuevos ejemplares de *U. occidentalis*.

3.2.2. Tipo y diseño de investigación

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

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

3.2.3. Población y muestra de estudio.

La población u objeto de estudio corresponde a la población de cangrejos del manglar (*Ucides occidentalis*) que habitan en el ecosistema de manglar de Tumbes, que basándose a la información obtenida de los datos reportados por Ordinola, Montero y Gonzales (2010), para el año 1996 se logró estimar en 120 millones y para el año 2007 en 77,06 millones.

El principal interés de dicha investigación fue determinar la diversidad genética y estructura genética poblacional, y para ello se evaluó teniendo como base los trabajos realizado por Ratti y Muñoz (2010) y Ordinola (2012), mediante el cual se evaluó la frecuencia de haplotipos, quienes encontraron una frecuencia de 10 % de haplotipos en *U. occidentalis* de Guayaquil- Ecuador, y Ordinola en Tumbes, Perú, se pudo inferir que la probabilidad de hallar haplotipos (p) sería de 0,10, aplicando la fórmula para el tamaño de muestra en base a proporciones y para poblaciones finitas:

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

Dónde:

n = tamaño de muestra

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

N = tamaño poblacional: 57 500 000 cangrejos

δ = Error de estimación: 0,10

p = Proporción de haplotipos = 0,10

$q = 1 - p = 0,90$

Al calcular se obtuvo: $n = 35$,

Este valor representa el tamaño de la muestra mínima para tener un error de estimación máximo $\delta = 0,10$.

En la investigación se eligieron 3 zonas tomándose un tamaño similar de muestras de 45 individuos de *U. occidentalis*, correspondientes a 15 individuos por zona.

Se tomaron las 3 principales zonas del manglar de Tumbes donde habita el cangrejo del manglar *U. occidentalis*, que son muestreadas periódicamente por el Laboratorio de investigación Costero Tumbes del Imarpe: norte (Zarumilla), centro (Puerto Pizarro) y sur (Corrales). De cada zona de muestreo se recolectó un número de ejemplares para dicho fin de estudio.

Para llevar a cabo este trabajo se planificó tomar 15 individuos por zona (3), obteniendo 5 muestras por cada sub zona o puntos de estudio (ver tabla 1 y la figura 1).

Tabla 1. Zona de muestreo de *U. occidentalis*

Zona	Canal de marea o isla	Estación	Latitud	Longitud
Norte (Zarumilla)	Zarumilla	1	03° 26' 36,5" S	80° 16' 05,2" O
	El Algarrobo	2	03° 26' 44,6" S	80° 15' 49,4" O
	Isla Matapalo	3	03° 26' 19,8" S	80° 16' 43,3" O
Centro (Puerto Pizarro)	Jelí	4	03° 29' 37,5" S	80° 22' 16,2" O
	Isla El Tanque	5	03° 30' 07,4" S	80° 23' 56,1" O
	La Ramada	6	03° 30' 53,0" S	80° 25' 16,4" O
Sur (Corrales)	La Chepa	7	03° 33' 50,1" S	80° 31' 31,2" O
	Corrales 1 (La Canela)	8	03° 33' 11,7" S	80° 31' 06,4" O
	Corrales 2	9	03° 32' 32,8" S	80° 30' 49,6" O

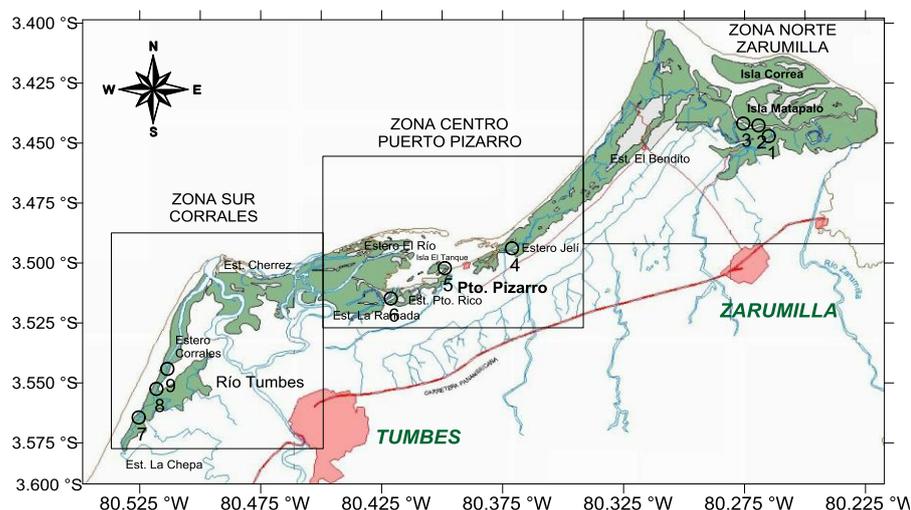


Figura 1. Mapa del manglar tumbesino señalando las 9 estaciones de muestreo.

4.2.4 Obtención de ejemplares de *U. occidentalis*

Los puntos de muestreo por cada zona se localizaron por un sistema de posicionamiento global (GPS). La extracción de los cangrejos estuvo a cargo de dos cangrejeros expertos: uno para cada zona de Corrales y el otro para la zona de Puerto Pizarro, obteniendo 5 ejemplares de *U. occidentalis*, por cada punto de muestreo, y para la zona de Zarumilla la extracción estuvo a cargo de los ejecutores de la

Tesis. Luego se trasladaron los cangrejos (*U. occidentalis*) en bolsas de paño anchovetero rotuladas por zona y puntos respectivamente, al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar de la Universidad Nacional de Tumbes, localizada en Puerto Pizarro.

4.2.5 Obtención de hemolinfa de *U. occidentalis*

La extracción de las muestras de hemolinfa de *U. occidentalis*, consistió en seguir la misma metodología utilizada por Ratti y Muños (2010) citada por Ordinola (2012), que consiste en extraer el hemolinfa de la quela de cada individuo por medio de una punción con jeringuilla de 5 ml, con aguja tuberculina N° 18, conteniendo 1 ml de solución de citrato de sodio al 10 %. Se retiró 1 ml de hemolinfa de cada individuo.

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

4.2.6 Extracción del ADN

Las 45 muestras obtenidas de hemolinfa fueron utilizadas para extraer el ADN, con el protocolo del bromuro cetiltrimetilamonio o también conocido por sus siglas CTAB.

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

el tubo eppendorf los hemocitos sedimentados a los que luego se agregó 500 µl de solución CTAB y se homogenizó.

Luego se agregó 2 µl de proteinasa K (895 U/ml; 19,6 mg/ml marca Fermentas) a cada uno de los microtubos eppendorf, se les colocó seguros metálicos en sus tapas para evitar que éstas se abran con el calor, luego se les incubó en baño maría marca Bionet modelo BM5, a 55 °C durante 2 horas. Pasado este tiempo se retiraron los tubos eppendorf y se le adicionó 1 µl de ARNasa a cada uno. Los tubos eppendorf fueron nuevamente incubados a 65 °C en el baño maría durante 15 min. Transcurrido dicho tiempo se agregó a cada tubo eppendorf: 300 µl de fenol saturado marca Invitrogen y 300 µl de cloroformo/alcohol isoamil marca Merck, y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min.

En cada uno de los tubos eppendorf centrifugados se formaron 3 fases; se recuperó la fase superior (el sobrenadante) y se colocó en un nuevo tubo eppendorf etiquetado de la misma manera que el tubo original. A continuación se agregó a cada uno de estos nuevos tubos con el sobrenadante, solución de cloroformo/alcohol isoamil en igual proporción que el sobrenadante recuperado, y se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 min.

De cada tubo eppendorf centrifugado, se recuperó cierto volumen del sobrenadante (no menos de 150 µl) que fue colocado en un nuevo tubo eppendorf etiquetado de la misma manera que el tubo del que se retiró el sobrenadante; en cada uno de estos nuevos tubos se adicionó alcohol al 95 % helado, en cantidad equivalente al doble del volumen del sobrenadante recuperado y se incubó a -20 °C por 20 minutos. Se homogenizó el contenido de cada tubo eppendorf y se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 min; luego se

observó que en el fondo de cada tubo eppendorf se formó un *pellet* de ADN. Se eliminó el líquido sobrenadante, dejando el *pellet* en el fondo del tubo eppendorf, luego se le agregó 1 ml de etanol al 75 % para realizar el lavado del ADN. Se centrifugó los tubos eppendorf a 13 000 rpm durante 5 min y se descartó el sobrenadante, dejando el *pellet* de ADN con la menor cantidad posible de líquido. Posteriormente se dejó secar el *pellet* de ADN destapando el tubo eppendorf cerca de un mechero con alcohol. Finalmente se resuspendió el *pellet* de ADN en 50 µl de solución TE 1X y se almacenó en el congelador vertical a -20 °C.

4.2.7 Amplificación del fragmento de la región de control y el gen de la Citocromo Oxidasa I.

A las 45 muestras de ADN, se les cuantificó la concentración de ADN en un Fotómetro en el Laboratorio de Inca Biotec, luego se diluyó al 30% de cada muestra obteniendo una muestra final de 50 a 100 mg/l de ADN, finalmente se obtuvo muestras en condiciones óptimas para continuar con el trabajo.

Luego se seleccionaron 39 muestras de ADN y se calculó el número de reacciones necesarias para realizar la amplificación, siendo éste el número de muestras de ADN extraído que se debió amplificar al que se le adicionó una reacción más para el control negativo y otra para el control positivo. El volumen de *mix* (mezcla de reactivos) para realizar la amplificación se multiplicó el número de reacciones antes calculado por los volúmenes de reactivos que se especifican en la tabla 2.

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

Reactivo	Volumen(μ l)
Agua ultra pura	15,50
Solución buffer 10X PCR RXn buffer (no incluye $MgCl_2$)marca Invitrogen	2,50
$MgCl_2$ (25 mM marca Invitrogen)	2,50
Mix de dNTP (desoxinucleótidos trifosfato) (10 mMmarca Fermentas)	0,50
BSA (albúmina de suero bovino)	1,00
<i>Primer</i> directo (15 pMol/ μ l)*	0,60
<i>Primer</i> inverso (15 pMol/ μ l)*	0,60
Taq polimerasa(5 U/ μ l marca Invitrogen)	0,25
Amplicon de ADN	1,00
Total	25,0

* En el caso de la región de control se utilizaron como *primers* directo e inverso: DL.USSA.F1 y DL.USSA.R1 respectivamente, mientras que para el caso del gen la citocromo oxidasa I se utilizaron como *primers* directo e inverso: LCO1490 y HCO2198 respectivamente.

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

Tabla 3. Programación del termociclador para la amplificación para el fragmento del gen de la región mitocondrial y la citocromo oxidasa I.

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

4.2.8 Electroforesis.

Los amplicones (producto de la amplificación del ADN en la PCR), se migraron en gel de agarosa al 2 %, 120 ml de TAE 1X, como tampón de depósito, 5 μ l de bromuro de etidio, para la migración de los amplicones se utilizó 2 μ l de tampón de depósito y 10 μ l de cada amplicón procedentes de la PCR. La

migración se realizó a 98 V durante 25 min; conjuntamente se hizo migrar un marcador de peso molecular de 100 a 1000 pb. Los geles fueron visualizados utilizando un transiluminador marca UVP modelo White/UV, y fotografiados con cámara digital.

De las 39 muestras de ADN que se procesaron en la PCR, 18 fueron amplificadas con el gen de la región de control las cuales no pudieron ser amplificadas exitosamente y 21 para el gen de la Citocromo Oxidasa I, de las cuales 18 fueron exitosamente amplificadas.

4.2.9 Secuenciación de ADN

Las 18 muestras de ADN amplificadas (producto de la PCR) por el gen de la Citocromo Oxidasa I, se enviaron para el secuenciamiento del ADN, las muestras se prepararon 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). En otro tubo eppendorf de 1,5 ml, se enviaron 120 µl de *primers* a una concentración de 10 pMol/µl de reverse y otro tubo para el forward se rotulo correctamente los *primers* y las 18 muestras y se enviaron a la empresa MacroGen en Maryland (EE.UU.), empresa que brindó el servicio de secuenciamiento del ADN.

Los resultados del secuenciamiento del ADN realizado por MacroGen fueron recibidos vía email; de las 18 muestras enviadas, 16 pudieron ser secuenciadas adecuadamente.

4.2.10. Procesamiento y análisis de datos.

Las 16 secuencias nucleotídicas del gen la citocromo oxidasa I, correspondientes a ejemplares de *U. occidentalis*, fueron alineadas entre sí mediante el algoritmo ClustalW implementado en el software Mega versión 5 (Tamura et al. 2011).

Posteriormente se alineó dichas secuencias contra una cadena nucleotídica de COI de *U. occidentalis* de 543 pb, reportada por Ordinola (2012), la que se descargó desde GenBank usando Blast, posteriormente se copió la cadena en el software de mega versión 5, y se utilizó como cadena molde, para luego alinear cada una de las cadenas nucleotídicas enviadas por la empresa macrogen, en el alineamiento se comenzó con las cadenas *forward* y después las *reverse*, las que se compararon entre sí y con las cadenas de otras muestras para descartar nucleótidos dudosos o no confiables o corregir los mal asignados. Al analizar los pictogramas de cada secuencia, las cadenas de las muestras 3 y 12 fueron descartadas al tener una cantidad muy alta de nucleótidos dudosos o no confiables en el extremo 5', así también la cadena de la muestra 13 fue descartada al tener una cantidad muy alta de nucleótidos no confiables en el extremo 5'. Finalmente las 13 secuencias restantes se recortaron en los extremos 3' y 5' para emparejar entre las mismas sus longitudes, quedando reducidas a secuencias de ADN a 494 pb.

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

Las 13 secuencias de ADN de 494 pb que fueron recortadas y alineadas. Se verificaron en la base de datos del GenBank

(<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizándose el software en línea Nucleotide Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Zhang et al. 2000), buscando verificar si dichas secuencias tenían similitud con fragmentos del gen COI de organismos que estaban registrados en la base de datos.

A continuación las 13 secuencias de ADN de 494 pb alineadas en Mega 5 se exportaron en formato Fasta y fueron analizadas usando DnaSP 5.0 obteniendo el número de haplotipos (N_h), la diversidad de haplotipos (h) y la diversidad nucleótida (π).

Estos mismos datos analizados se exportaron al software GenAlex 6 (Peakall and Smouse 2006) para obtener la matriz de la distancia genética de Nei (Nei and Li 1979; Nei and Tajima 1981; Nei 1987 citado por Thawnon et al. 2004).

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

IV. RESULTADOS

5.1. AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DE LA REGIÓN DE CONTROL MITOCONDRIAL.

En la tabla 4 se observa el número de muestras de ADN que fueron extraídas de hemolinfa de *U. occidentalis*, de las 18 muestras de ADN extraído no se pudo amplificar ninguna muestra, lo que se evidencia en los geles de la figura 2.

Tabla 4. Muestras de ADN de *U. occidentalis*, extraídas, amplificadas y no amplificadas por el gen de la región de control mitocondrial

Zona	Canal de marea o isla	Código	N ° de muestras de ADN		
			Extraídas	Amplificadas exitosamente	No amplificadas
Norte (Zarumilla)	Zarumilla	ZZM	2	0	0
	El Algarrobo	ZAM	2	0	0
	Isla Matapalo	ZMOM	2	0	0
Centro (Puerto Pizarro)	Jelí	PJM	2	0	0
	Isla El Tanque	PTM	2	0	0
	El Monteo	PMM	2	0	0
Sur (Corrales)	La Chepa	CCHM	2	0	0
	Corrales 1 (La Canela)	C1CM	2	0	0
	Corrales 2	C2CM	2	0	0
Total			18	0	0



Figura 2. En los geles se muestran los amplicones del fragmento de la Región de Control mitocondrial (0 de 18): Los códigos están compuestos por el primer carácter que indica la zona: P=Puerto Pizarro, C=Corrales, Z= Zarumilla; el 2do carácter indica la estación de muestreo y el carácter con la letra M= indica el número de muestra, finalmente se observa un C+ es el control positivo y C- el control negativo.

5.2. AMPLIFICACIÓN DEL FRAGMENTO DEL GEN COI

En la tabla 5 se observa el número de muestras de ADN que fueron extraídas de la hemolinfa de *U. occidentalis*, así como también las muestras que se amplificaron exitosamente y las que no lo fueron, sin embargo, la mayor parte de las muestras (18 de 21) pudieron ser amplificadas exitosamente.

Tabla 5. Muestras de ADN de *U. occidentalis*, extraídas, amplificadas y no amplificadas por el gen COI.

Zona	Canal de marea o isla	Código	N ° de muestras de ADN		
			Extraídas	Amplificadas exitosamente	No amplificadas
Norte (Zarumilla)	Zarumilla	ZZM	2	2	0
	El Algarrobo	ZAM	2	2	0
	Isla Matapalo	ZMM	2	2	0
Centro (Puerto Pizarro)	Jelí	PJM	2	2	0
	Isla El Tanque	PTM	2	2	0
	El Monteo	PMOM	2	2	0
Sur (Corrales)	La Chepa	CCHM	3	2	1
	Corrales 1 (La Canela)	CC1M	3	2	1
	Corrales 2	CC2M	3	2	1
Total			21	18	3

En la figura 3, se observan los geles de agarosa donde se realizó la migración de los amplicones (fragmentos de ADN amplificado de aproximadamente 677 pb a 698 pb) adquiridas de las muestras de ADN de cada una de las zonas de muestreo. En la figura, los códigos de las muestras corresponden a los códigos que se hallan en la tabla 5, mientras que el número que acompaña a los códigos indica el número de individuo que se recolectaron por cada zona. Se aprecia que en la mayoría de muestras migradas (18 de 21) se observa una banda fluorescente que indica la presencia de un amplicón, sin embargo, hay 3 muestras que no fueron amplificadas por lo mismo no pudieron ser migradas exitosamente (careciendo de banda fluorescente), es el caso de las muestras fueron CCHM3 (individuo 3 del estero La Chepa en la zona de Corrales),

CC1M3(individuo 3 de la estación 1 en Estero Corrales), CC2M3 (individuo 3 de la estación 2 en Estero Corrales).

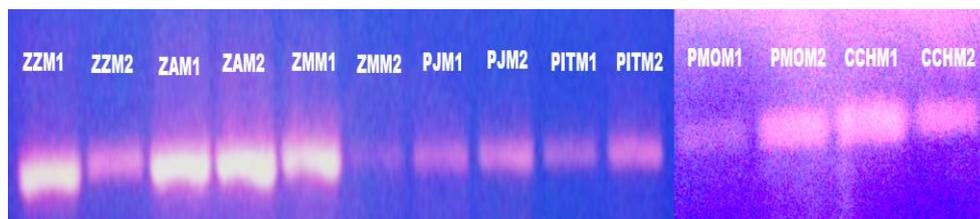


Figura 3. En los geles de agarosa se muestran los amplicones de aproximadamente 677 pb a 698 pb correspondientes al fragmento del gen COI amplificado de (18 de 21) cangrejos (*U. occidentalis*). Los códigos están compuestos por el primer caracter que indica la zona: P=Puerto Pizarro, C=Corrales, Z= Zarumilla; el 2do caracter indica la estación de muestreo y el caracter con la letra M= indica el número de muestra, finalmente se observa un C+ es el control positivo y C- el control negativo.

5.3. VERIFICACIÓN DE LA IDENTIDAD DEL FRAGMENTO DEL GEN COI.

En la tabla 6, se aprecian los principales parámetros que caracterizan a las 13 secuencias de ADN adquiridas de la hemolinfa de *U. occidentalis* alineadas y procesadas, éstas tuvieron una longitud de 494 pb y dentro de estas secuencias se encontró 463 posiciones invariables (monomórficas) siendo las restantes 31 posiciones variables (polimórficas). Y a la misma no se detectó ningún *gap* (brecha) en la alineación, lo que permite indicar una adecuada alineación. A la misma vez en esta tabla se observa la composición porcentual de nucleótidos en un bajo nivel de citosina y guanina y un nivel más elevado de adenina y timina.

Las 13 secuencias del fragmento del gen COI de *U. occidentalis* se observan en la tabla 13 del anexo 1.

En la tabla 6 también se observa un fragmento de la secuencia del gen de la Citocromo Oxidasa I (COI), que codifica para un polipéptido de 165 aminoácidos y no se encuentra ningún codón de detención (*stop codons*), lo que indica que la secuencia puede codificar un tipo de proteína.

Tabla 6. Características de las secuencias del fragmento del gen COI de *U. occidentalis*.

Parámetro	Valor
Longitud en pares de bases (pb)	494
Posiciones invariables (monomórficas)	463
Posiciones variables (polimórficas)	31
Número de <i>gaps</i> (brechas)	0
Composición porcentual de nucleótidos	
Porcentaje de adenina (A)	29,48
Porcentaje de citosina (C)	20,71
Porcentaje de guanina (G)	15,54
Porcentaje de timina (T)	34,27
Polipéptido traducido	
Longitud (número de aminoácidos)	165
Codones de detención (<i>stop codons</i>)	0

En la Tabla 7, se observa el resultados de la búsqueda de las 13 secuencias de 494 pb de ADN correspondientes al fragmento del gen COI de *U. occidentalis* en la base de datos del GenBank, aquí indicadas las cadenas nucleotídicas que tienen la mayor semejanza con las secuencias de ADN obtenidas en esta investigación, corresponden a un fragmento del gen COI de *U. Occidentalis* en un 99 % y por debajo de esta especie se encuentran secuencias de ADN de crustáceos braquiuros pertenecientes al género *Uca* que corresponde a la familia Ocypodidae que es la misma familia a la que pertenece *U. occidentalis*, que fueron amplificadas con el gen COI y del genoma mitocondrial completo, lo que indica que estas secuencias amplificadas corresponden en un 99 % a un fragmento del gen COI.

Tabla 7. Secuencias de ADN de la base de datos de GenBank que presentan el mayor índice de identidad (%) con las 13 secuencias del fragmento del gen COI de *U. occidentalis*

Especie	Zona del ADN	Identidad (%)
<i>Ucides occidentalis</i>	Fragmento del gen COI	99
<i>Neosarmatium meinerti</i>	Fragmento del gen COI	87
<i>Xenograpsus testudinatus</i>	Genoma mitocondrial completo	86
<i>Xanthias teres</i>	Fragmento del gen COI	86
<i>Uca arcuata</i>	Fragmento del gen COI	86
<i>Uca</i> sp.	Fragmento del gen COI	86
<i>Uca argillicola</i>	Fragmento del gen COI	86
<i>Uca insignis</i>	Fragmento del gen COI	86
<i>Uca herradurensis</i>	Fragmento del gen COI	85
<i>Uca lactealactea</i>	Fragmento del gen COI	85
<i>Uca vocator</i>	Fragmento del gen COI	85

5.4. DIVERSIDAD GENÉTICA POBLACIONAL

Los parámetros de la diversidad genética que se obtuvieron de las 13 secuencias del fragmento del gen COI de *U. occidentalis* se muestran en la tabla 8. Aquí se observa un número elevado de haplotipos: 13, sabiendo que el número de individuos analizados fue de 13, lo que permitió deducir una alta variabilidad genética en relación al número de haplotipos, también nos permite observar que el haplotipo más frecuente sólo se halló en un individuo de los 13 muestreados con una frecuencia de 7 %, que indica un nivel alto de polimorfismo en *U. occidentalis*. De la misma manera al evaluar el índice de la diversidad de haplotipos (H_d), esta alcanza el valor de 1 que indica que la diversidad genética es alta.

Respecto a la diversidad medida a nivel de nucleótidos, se observa en la tabla 8 el promedio de diferencias nucleótidos fue de

7,167nucleótidos en las secuencias de *U. occidentalis* de 494 pb. Mientras que la diversidad nucleótida (π) fue de 0,01451, estos valores también muestran un alto nivel de diversidad genética en el fragmento del gen COI de *U. occidentalis* estudiado.

Tabla 8. Principales parámetros de diversidad genética obtenidos en base a las 13 secuencias del fragmento del gen COI de *U. occidentalis*

Parámetro	Valor
Haplotipos	
Número de haplotipos (h)	13
Número de individuos con el haplotipo más frecuente	1
Frecuencia (%) del haplotipo más frecuente	7
Diversidad de haplotipos (Hd)	1
Nucleótidos	
Número promedio de diferencias en nucleótidos	7,167
Diversidad nucleótida (π)	0,01451

En la tabla 9, por su parte, se muestra la distribución de los haplotipos según las zonas evaluadas. Como se observa, ningún haplotipo estuvo presente simultáneamente en las 3 zonas de estudio, pues cada uno de los ejemplares muestreados mostró un haplotipo diferente al de los otros. Los sitios variables que diferencian a los haplotipos se muestran en la tabla 13 del anexo 2.

Tabla 9. Frecuencia de haplotipos del gen COI en *U. occidentalis* según zona de muestreo

	Zona norteZarumilla		Zona centro Puerto Pizarro		Zona sur Corrales		Total	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
	Hap1	1	20,00	0	0,00	0	0,00	1
Hap2	1	20,00	0	0,00	0	0,00	1	7,69
Hap3	1	20,00	0	0,00	0	0,00	1	7,69
Hap4	0	0,00	0	0,00	1	20,00	1	7,69
Hap5	0	0,00	0	0,00	1	20,00	1	7,69
Hap6	1	20,00	0	0,00	0	0,00	1	7,69
Hap7	0	0,00	0	0,00	1	20,00	1	7,69
Hap8	0	0,00	0	0,00	1	20,00	1	7,69
Hap9	0	0,00	1	33,33	0	0,00	1	7,69
Hap10	1	20,00	0	0,00	0	0,00	1	7,69
Hap11	0	0,00	0	0,00	1	20,00	1	7,69
Hap12	0	0,00	1	33,33	0	0,00	1	7,69
Hap13	0	0,00	1	33,33	0	0,00	1	7,69
Total	5	100	3	100	5	100	13	100

Adicionalmente analizando la tabla 10, donde se muestra la distancia genética de Nei que fue calculada para cada estación de muestreo, sin embargo, se descartó 5 poblaciones (Zarumilla y Corrales 2), incluida la zona de Puerto Pizarro (El Tanque, Jeli y La Ramada), por presentar un sólo individuo para cada población de estudio, lo cual impidió el cálculo de la distancia genética de Nei, en esta tabla se observa que ésta varió de 0,004 a 0,016 (descartando las distancias de 0 que representan la distancia genética para la misma estación de muestreo), estos valores son bastante bajos. La mayor distancia genética se encontró entre la estación de muestreo de Corrales 1 (La Canela) en la zona de Corrales con la estación de muestreo de Isla Matapalo en la zona de Zarumilla.

Tabla 10. Matriz de distancia genética de Nei según zona y estación de muestreo.

Zona Norte (Zarumilla)		Zona Sur (Corrales)		
El Algarrobo	Isla Matapalo	Corrales 1		Estaciones de muestreo
		(La Canela)	La Chepa	
0,000				El Algarrobo
0,009	0,000			Isla Matapalo
0,004	0,016	0,000		Corrales 1(La Canela)
0,004	0,014	0,005	0,000	La Chepa

5.5. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

Para calcular el nivel de estructuración genética poblacional de *U. occidentalis* medido a través de un fragmento del gen COI, se descartó 5 poblaciones (Zarumilla y Corrales 2), incluida la zona de Puerto Pizarro (El Tanque, Jeli y La Ramada), para poder calcular mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA), debido que para realizar este cálculo se necesita dos a más muestras, mientras que las poblaciones ya mencionadas sólo contaban con una muestra por población.

Como se observa en la tabla 11 la variabilidad genética se encuentra distribuida en un 96 % en las variaciones de los individuos dentro de las poblaciones, en un 4 % entre las poblaciones, consideradas para este caso como las estaciones de muestreo y estadísticamente no existe variabilidad significativa entre las 3 zonas de muestreo. Esto indica que la mayor variabilidad se halla distribuida uniformemente entre los individuos dentro de las poblaciones y la estructuración genética poblacional es muy baja.

Tabla 11. Análisis de varianza molecular de *U. occidentalis* utilizando como marcador el gen COI.

Fuente	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Variación estándar	Porcentaje de la variabilidad
Entre regiones (Zonas)	1	5,750	5,750	0,594	15
Entre poblaciones (estaciones de muestreo)	2	6,750	3,375	0,125	3
Dentro de las poblaciones	4	12,500	3,125	3,125	81
Total	7	25,000		3,844	100

En la tabla 12 se observa el test de Mantel basado en 999 permutaciones, que evalúa la correlación entre las distancias genéticas (medidas en base al fragmento del gen COI) y las distancias geográficas de los 13 ejemplares individuales de *U. occidentalis* evaluados, como se observa el coeficiente de correlación de Pearson que muestra un coeficiente casi igual a cero ($r = 0,007$) indicando que no existe correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética evaluada. Este valor es estadísticamente significativo puesto que la probabilidad de que se halla obtenido por fluctuación aleatoria es demasiado alta ($P(r_{xy - \text{aleatorio}} \geq r_{xy - \text{data}}) = 0,427$)

Tabla 12. Test de Mantel para evaluar la correlación entre la matriz de distancia geográfica (x) y la matriz de distancia genética (y).

Suma de cuadrados de x	Suma de cuadrados de y	Suma de productos de xy	Coefficiente de Pearson para x e y (r_{xy})	$P(r_{xy - \text{aleatorio}} \geq r_{xy - \text{data}})$
10251,508	708,833	19,124	0,007	0,427

En la figura 4 se muestra un diagrama de puntos de las matrices de distancia geográfica (eje x) y distancia genética (eje y), los puntos planteados son en total 144 que corresponden a la combinación por parejas de cada uno de los 13 ejemplares muestreados.

Sobre el diagrama de puntos se ha planteado la recta de regresión donde se observa el coeficiente de determinación (R^2) de 0,00005 donde muestra que no hay ningún tipo de asociación entre las matrices. En los puntos se observa que forman 3 nubes de

puntos, correspondientes a las distancias calculadas por parejas para las 3 zonas de muestreo (Zarumilla, Puerto Pizarro y Corrales).

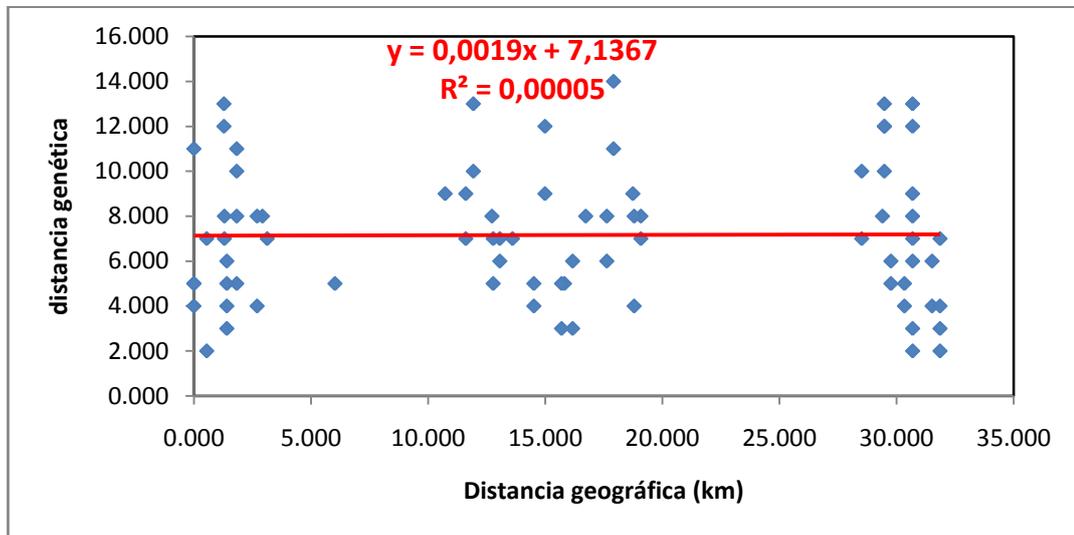


Figura 4. Diagrama de dispersión de las matrices de distancia geográfica y distancia genética. Se muestra la recta de regresión de ambas matrices y el coeficiente de determinación (R^2) el cual indica la no existencia de correlación entre ambas matrices.

V. DISCUSIÓN

En la presente investigación no fue posible amplificar un fragmento del gen de la región de control mitocondrial, cuando se utilizaron los *primers* de Pie et al. (2008); a pesar de que tales *primers* han logrado amplificar exitosamente dicho gen en otros invertebrados como los reportan Pie et al. (2008); Oliveira (2009) y Garcia (2006). No existe precedente alguno de que los *primers* de Pie et al. (2008) e incluso otros *primers* dirigidos hacia la región de control, no hayan conseguido su amplificación, sin embargo, este hecho no es infrecuente en el caso de amplificación de genes mitocondriales, así por ejemplo, Cabezas, Macpherson and Machordom (2008) reporta que no se consiguió la amplificación de un fragmento de COI en langosta del género *Munida*; de igual manera Darling et al. (2008) también reporta el caso de no amplificación de COI en cangrejo verde del género *Carcinus*. El hecho de que algunos *primers* no logren amplificar fragmentos de genes mitocondriales puede argumentarse que se debe a que ocurrido mutaciones en los sitios en que se hibridan uno o ambos *primers*, esto debería ser más frecuente en genes mitocondriales puesto que tienen una tasa de mutación 10 superiores a los de genes nucleares (Ewald 2006; Shih et al. 2011).

En la presente investigación se obtuvo una exitosa amplificación del fragmento del gen COI en muestras de hemolinfa de *U. occidentalis*, amplificándose 18 de 21 de las muestras de ADN extraídos de los ejemplares, la amplificación del gen COI usando los *primers* de Folmer et al. (1994) se ha logrado en una gran variedad de invertebrados, como el cangrejo del manglar *Ucides occidentalis* (Ordinola 2012), el cangrejo del manglar brasileño *U. cordatus* (Ewald 2006), el cangrejo verde *Carcinus maenas* (Roman and Palumbi 2004), el cangrejo de río *Potamonautes perlatus* (Daniels 2003), el cangrejo de río *Austropotamobius torrentium* (Schubart and Huber 2006) la langosta espinosa de California *Panulirus interruptus* (García and Pérez 2006).

Las secuencias amplificadas y alineadas de ADN, tuvieron una longitud de 494 pb con 463 posiciones invariables o monomórficas, 31 posiciones variables (polimórficas) y no tuvieron ningún *gap* (brecha); es necesario mencionar que en el caso del estudio realizado por Ordinola (2012), quien también estudió la diversidad genética y estructura genética poblacional del cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) utilizando un fragmento del gen COI amplificado con los *primers* de Folmer et al. (1994), obtuvo secuencias de ADN de aproximadamente 543 pb de longitud, las cuales mostraron 501 posiciones invariables (monomórficas), 42 posiciones variables (polimórficas) y no encontró *gaps* (brechas). Los datos reportados por Ordinola (2012) muestran algunas diferencias con las del presente estudio, esto se debe a que la longitud de la cadena de ADN analizada fue diferente con 543 pb que para el presente estudio, con 463 pb. La mayor longitud de la cadena analizada por Ordinola (2012) es responsable a que haya logrado identificar un mayor número de posiciones polimórficas. La no existencia de brechas o *gaps* en ambos estudios son un buen indicador de que las secuencias son congruentes en sus alineamientos.

Comparando los resultados obtenidos con el fragmento del gen COI del presente estudio con los encontrados por Ewald (2006), para el mismo gen en el cangrejo del manglar brasileño (*Ucides cordatus*), se observa que las secuencias del fragmento COI de *U. cordatus* fue de aproximadamente 600 pb de longitud, las cuales mostraron 489 posiciones invariables (monomórficas) y 101 posiciones variables (polimórficas), tampoco hubieron *gaps* (brechas); el mayor número de posiciones polimórficas se explica por la mayor longitud de la cadena de ADN analizada por Ewald (2006).

La composición porcentual de nucleótidos de las secuencias del gen COI de *U. occidentalis* evaluadas fueron adenina: 29,48 %, citosina: 20,71 %, guanina: 15,54 % y timina: 34,27 %; valores son muy similares a la composición porcentual del mismo fragmento del gen COI en *U. occidentalis* reportada por Ordinola (2012) que fue adenina: 30,3 %,

citosina: 20,7 %, guanina: 15,4 % y timina: 33,5 %, que muestra menos de 1 % de diferencia en la composición nucleótida. La misma composición del gen COI reporta datos similar en comparación con otros crustáceos como en el caso del cangrejo brasileño *U. cordatus* con una composición de adenina: 29,8 %, citosina: 20,75 %, guanina: 16,35 % y timina: 33,1 % (Ewald 2006). El cangrejo de río *Potamonautes perlatus* cuyo gen de COI contiene 35,88% de adenina, 13,33% de adenina, 21,52% de guanina y 29,21% de timina (Daniels 2003) y del anfípodo *Echinogammarus ischnus*, que tuvo 26,6% de adenina, 34,9% de timina, 20,7% de citosina y 17,8% de guanina (Cristescu et al. 2004), muestra que el gen COI es bastante constante en su composición nucleótida entre los crustáceos.

El fragmento del gen COI denota una identidad en las muestras de *U. occidentalis*, donde muestra una similitud de 99 % con COI de *U. occidentalis* (Ordinola 2012), el 84 % con *U. cordatus* (Ewald 2006), teniendo en cuenta la diferencia de *U. cordatus*, la cual es justificable debido que no son de la misma especie, y 85 % a 87 % con otros cangrejos entre ellos varios del género *Uca* que corresponden a la misma familia (Ocypodidae) que *U. occidentalis*, como son células de *Neosarmatium meinerti*, *Xenograpsus testudinatus*, *Uca* sp., *Uca argillicola*, *Uca insignis*, entre otros.

La diversidad genética de *U. occidentalis* fue alta, lo que se expresa a través de un elevado número de haplotipos (13 de 13) y del hecho que existe polimorfismo en este gen, debido a que el porcentaje para cada haplotipo es de 7,69 %, que muestra que es un número bastante menor al porcentaje mínimo 95 % para declarar monomorfismo que se ha fijado en González (2008). El polimorfismo es bastante frecuente en el gen COI como lo han determinado en las investigaciones como la realizada por Ordinola (2012) en *U. occidentalis* que al analizar la secuencia del gen COI indica que el haplotipo más frecuente es de 14,29 % y Ewald (2006) en *U. cordatus* quien señala en su estudio que el haplotipo más frecuente es de 15,7 %, por lo que en ambos estudios se alcanzó un porcentaje

muy por debajo del 95 %, por lo tanto para este gen se determinó polimorfismo.

La diversidad de haplotipos (H_d) para este estudio, *U. occidentalis* alcanzó una $H_d = 1$ que indica una alta diversidad, muy similar al estudio que realizó Ordinola (2012) donde encontró el 0,9721 en *U. occidentalis* evaluada en el gen COI determinando una alta diversidad de haplotipos, al igual que en el caso de la investigación realizada por Ewald (2006), en el gen COI de *U. cordatus* la diversidad de haplotipos fue de 0,97, en todos estos resultados se muestra una alta diversidad de haplotipos para el gen COI.

Otra forma de medir la diversidad genética es evaluando la diversidad nucleótida (π) que para el caso de este estudio alcanzó el valor de 0,01451 (1,45 %) para el gen COI de *U. occidentalis*; sin embargo, en otras investigaciones se han reportado datos similares en invertebrados tal como reporta ordinola (2012) quien encontró una diversidad de nucleótidos (π) de 0,00810 (0,8 %), al igual que Ewald (2006) señala una diversidad nucleótida (π) de 0,0063 a 0,0065 en *U. cordatus*.

En el presente estudio se muestran los parámetros de diversidad antes mencionados donde indican una alta diversidad genética en *U. occidentalis*, lo que permite una similitud con los datos reportados en otras investigaciones realizadas en invertebrados y sobre todo en cangrejos como es el caso de Ordinola (2012), en *U. occidentalis* y el estudio realizado por Ewald (2006) en *U. cordatus*.

Respecto al estudio sobre la estructura genética poblacional de *U. occidentalis*, se utilizó el análisis de varianza molecular (AMOVA), donde se encontró que ésta fue muy baja, pues del 100 % de variabilidad genética se encuentran los individuos dentro de las mismas poblaciones en un 81 % y sólo el 4 % se encontró por las diferencias entre poblaciones y el 15 % de los individuos entre regiones (Zarumilla, Puerto Pizarro y Corrales), permitiendo concluir que las poblaciones en las zonas

muestreadas tienen una baja estructura genética, resultados similares a los que reporta Ordinola (2012) quien encontró una baja estructura poblacional de *U. occidentalis* evaluada con el gen COI obteniendo un 96 % de la variabilidad genética se da entre los individuos dentro de las poblaciones y sólo 4 % de variabilidad por las diferencias entre poblaciones. De la misma forma Ewald (2006) reporta en *U. cordatus* evaluada con el gen COI indica que el 97,44 % de la variabilidad genética se encuentra entre los individuos dentro de las poblaciones con lo que concluye que existe baja estructuración genética poblacional.

El estudio de Ordinola (2012) en *U. occidentalis* sobre la estructura genética poblacional en Perú y los estudios realizados por Ewald (2006); Oliveira (2009); Cottens (2009); Britto et al. (2011) dirigida a la estructura genética poblacional de *U. cordatus* en Brasil, han reportado datos invariables a una baja estructura genética poblacional de éste cangrejo, tanto Ordinola (2012), muestra cangrejos alejados a más de 30 km en la costa peruana entre las zonas que más distan entre Corrales y Zarumilla, al igual que Ewald (2006) y Oliveira (2009), muestran poblaciones de cangrejos muy alejadas por más de 4500 km en la costa del Brasil, estos indican poca variabilidad genética entre sus poblaciones, ni la barrera geográfica de la desembocadura del río Amazonas impide la poca variabilidad genética entre las poblaciones que se encuentran en ambos lados, la baja estructura genética es justificable por los autores debido al flujo genético de larvas que son arrastradas por las corrientes de las fases intermareales.

El análisis de Mantel realizado para *U. occidentalis* ha mostrado que no existe relación entre la distancia genética con la distancia geográfica obteniendo un coeficiente de determinación de R^2 de 0,00005; lo que indica que no hay ninguna asociación entre las matrices, este estudio es similar a los datos reportados por Ordinola (2012) que encontró un R^2 de 0,0013 quien encuentra que poblaciones de *U. occidentalis* que se encuentran distantes a más de 30 km son genéticamente similares, de la

misma manera por lo cual se evidencia que la distancia geográfica no es un factor que influya en la variabilidad genética de *U. occidentalis*.

De los datos señalados se concluye que existe una baja estructura genética poblacional en *U. occidentalis*; datos similares a los reportados por Ordinola (2012) en *U. occidentalis* como los de Ewald (2006) en *U. cordatus* pertenecientes al mismo género, de tal manera que hay relación entre la distancia geográfica y la distancia genética en *U. occidentalis*.

VI. CONCLUSIONES

1. La diversidad genética de *U. occidentalis* según los principales indicadores de diversidad, evaluada a través de un fragmento del gen COI en los manglares de la región Tumbes el año 2014 es muy alta.
2. La estructura genética poblacional de *U. occidentalis* según el análisis de varianza molecular (AMOVA), evaluada a través de un fragmento del gen COI en los manglares de la región Tumbes el año 2014 fue baja.
3. En el test de Mantel, demuestra que no existe correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética observada en las zonas de estudio.
4. Los *primers* DL.USSA.F1 y DL.USSA.R1 no fueron eficaces para amplificar un fragmento de la región de control mitocondrial de *U. occidentalis*.

VII. RECOMENDACIONES

1. Diseñar nuevos *primers* que permitan amplificar un fragmento del gen de la región de control mitocondrial de *U. occidentalis*.
2. Utilizar otra técnica de diagnóstico molecular que permitan la amplificación del gen de la región de control mitocondrial de *U. occidentalis*.
3. Realizar estudios de diversidad genética sobre *U. occidentalis* en la región Tumbes, utilizando otros genes mitocondriales tales como el gen 12S rARN, como también marcadores de ADN nuclear: microsatélites, AFLP y RAPD.
4. Realizar estudios genéticos sobre otras especies relevantes en la región Tumbes.
5. Realizar estudios sobre la influencia del flujo genético en larvas cuando son arrastradas por las corrientes intermareales en la diversidad genética y estructura genética poblacional.

VIII. 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*. 32:917. <http://www.raco.cat/index.php/ABC/article/viewFile/132215/182083>
- Britto, F.B., D.S.F. Mendes, M. Ogawa, I.H.A. Cintra and F.M. Diniz. 2011. Single primer-based DNA amplification as a suitable and low-cost tool for assessing genetic diversity in mangrove crabs. *Genetics and Molecular Research* 10 (4): 4084-4092. <http://geneticsmr.com/year2011/vol10-4/pdf/gmr1501.pdf>
- Cabezas, P., E. McPherson 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>
- Cottens, K. F. 2009. Efeitos da temperatura, intensidade luminosa e da densidade de cultivo na larvicultura de *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) (Crustacea, Decapoda. Brachyura) em laboratório. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Paraná. <http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/bitstream/handle/1884/17978/Dissertacao%20Kelly.pdf?sequence=1>
- Cristescu, M. E. A., J. D. S. Witt, I. A. Grigorovich, P. D. N. Hebert and H. J. MacIsaac. 2004. Dispersal of the Ponto-Caspian amphipod *Echinogammarus ischnus*: invasion waves from the Pleistocene to the present. *Heredity*, 92: 197–203. <http://web2.uwindsor.ca/courses/biology/macisaac/pages/Heredity.pdf>
- Daniels, S. R. 2003. Examining the genetic structure among populations of the common cape river crab *Potamonautes perlatus* from river

systems in South Africa reveals hydrographic boundaries. *Journal of Crustacean Biology* 23(4): 936–950.<http://decapoda.nhm.org/pdfs/31270/31270.pdf>.

Darling, J. A., M. Bagley, J. Román, 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.

De La Rosa, L. 2012. *Estructura genética y conectividad migratoria de las agregaciones invernantes de Galidris mauri (Charadriiformes: Scolopasidae) en México*. Tesis de maestría en ciencias en Ecología Molecular y Biotecnología, Universidad Autónoma De Baja California. http://fcm.ens.uabc.mx/jatay/tesis/posgrado/ecologia_molecular/maestria/Tesis%20Leonardo%20M.%20De%20la%20Rosa%20Conroy.pdf

Ewald, M. 2006. *Isolation and characterization of nuclear and mitochondrial genetic markers for population studies of Ucides cordatus cordatus (Decápoda: Brachyura)*. Dissertation of Doctor of Natural Science, University of Bremen http://deposit.Ddb.De/cgi-bin/dokserv?Idn=994613679&dokvar=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>

Fischer, W., F.Krupp, W.Schneider, C.Sommer, K.E.Carpenter y V.H.Niem. 1995. Guía FAO para la Identificación de Especies para los Fines de la Pesca. Pacífico centro-oriental. Volumen I. Plantas e invertebrados. Roma: Italia. FAO. <http://www.fao.org/docrep/010/t0851s/t0851s00.htm>.

- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, AND R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*3(5): 294-299. http://www.mbari.org/staff/vrijen/PDFS/Folmer_94MMBB.PDF
- García, F. 2006. *Genética poblacional de langostas espinosas (Panulirus Spp). De importancia comercial del pacífico mexicano*. Tesis Doctor en Ciencias., Centro de Investigación Biológicas del Noroeste. http://cybertesis.cibnor.mx:8080/sdx/cibnor/2006/garcia_f.pdf
- García, F. J. and R. Pérez. 2006. Genetic differentiation of the California spiny lobster *Panulirus interruptus* (Randall, 1840) along the west coast of the Baja California Peninsula, Mexico. *Marine Biology*. 148: 621–629. <http://www.springerlink.com/content/t81377x576516302/fulltext.pdf>
- González, A. 2008. *Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de Especies Vegetales Amenazadas: Inesperado sp. López lilloi (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*. 3ra 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>.

- Lomas, E., J. Caranqui, L. Espinoza y R. Corría. 2009. *Plan de evaluación y manejo del cangrejo rojo (Ucides occidentalis) y concha negra (Anadara similis y Anadara tuberculosa) en los manglares de la costa ecuatoriana*. Riobamba, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/503/1/Articulo_concha_cangrejo.pdf
- Moreno, A. 2007. Tamaño efectivo de la población. En *Ecología Molecular*. Ed. Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre, 63-84. México D.F., México: Instituto Nacional de Ecología, Semarnat. http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/descarga.html?cv_pub=530&tipo_file=pdf&filename=530
- Moreno, J., F. Solano y W. Mendivez. 2001. *Distribución y abundancia de los recursos pesqueros en las zonas de manglar*. Guayaquil, Ecuador: Instituto Nacional de Pesca del Ecuador. <http://www.inp.gob.ec/irba/concha/reportes/Distribucion%20y%20Abundancia%20de%20los%20Recursos.pdf>
- Mori, J. 2010. *Estudio comparativo de la variabilidad genética y filogenética del zungaro tigrinus -Brachyplatystoma tigrinum (Britski, 1981) y especies relacionadas de la familia Pimelodidae en la Amazonía Peruana*. Tesis Biólogo. Universidad de la Amazonia Peruana. <http://www.iiap.org.pe/cdpublicaciones2011/documentos/pdf/piba/pu/43.pdf>
- Oliveira, J. F. 2009. *Filogeografía e demografía evolutiva de Ucides cordatus (Linnaeus 1763) (decapoda, brachyura) e Cardisoma guanhumi Latreille, 1825 (decapoda, brachyura) na costa do Brasil*. Tese de Doutorem Ciências área de concentração Zoologia, Universidade Federal do Paraná. http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/handle/1884/21413/tese_JFON.pdf?sequence=1
- Ordinola, A. 2012. *Diversidad y estructura genética poblacional del cangrejo del manglar (Ucides occidentalis) en la región Tumbes*. Tesis De

maestría en acuicultura y gestión ambiental, Universidad Nacional de Tumbes.

Ordinola, E., P. Montero y I. Gonzáles. 2010. *Prospección bio ecológica de cangrejo del manglar (Ucides occidentalis) en la Región Tumbes, 07 al 13 Julio 2009. Informe Técnico Interno del Instituto del Mar Perú.* Tumbes, Perú: Instituto del Mar del Perú.

Peakall, R. and P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*.6:288-295. <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>

Pie, M., J. F. Oliveira, W. A. Boeger, A. Ostrensky, and R. A. Baggio. 2008. The Organization of the Mitochondrial Control Region in 2 Brachyuran Crustaceans: *Ucidescordatus* (Ocypodidae) and *Cardisomaguanhumi* (Gecarcinidae). *Journal of Heredity* 99(4):432–437. <http://jhered.oxfordjournals.org/content/99/4/432.full.pdf+html>

Povh, J. A., N. M. Lopera, R. P. Ribeiro, E. Lupchinski, P. C. Gomes, y T. S. Lopes. 2008. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Cien. Inv. Agr.* 35 (1): 5-15. <http://www.scielo.cl/pdf/ciagr/v35n1/art01.pdf>.

Ratti, M. F. y M. Muñoz. 2010. *Optimización del sistema AFLP para determinación de la variabilidad genética de Ucides occidentalis en tres zonas de manglar del Golfo de Guayaquil.* Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral - Centro de Investigación Científica y Tecnológica. <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10280/1/Optimizaci%C3%B3n%20del%20Sistema%20AFLP%20para%20Determinaci%C3%B3n%20de%20la%20variabilidad.pdf>

- Roman, J. and S. R. Palumbi. 2004. A global invader at home: population structure of the green crab, *Carcinus maenas*, in Europe. *Molecular Ecology*. 13: 2891–2898. <http://palumbi.stanford.edu/manuscripts/Roman%20and%20Palumbi%202004.pdf>
- Schubart, C.D. and M.G.J. Huber. 2006. Genetic comparisons of german populations of the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (crustacea: astacidae). *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 380-381: 1019-1028. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.97.5094&rep=rep1&type=pdf>
- 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. <http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/pdf2011/14Feb/Shih%20et%20al.pdf>.
- Solano, F. 2006. *Aspectos pesqueros biológicos y socioeconómicos de la captura de cangrejo rojo (Ucides occidentalis) en los manglares del Ecuador*. Guayaquil, Ecuador: Instituto Nacional de Pesca. http://www.inp.gov.ec/files/67fb77d560_Aspectos%20pesqueros%20biologicos%20y%20socioeconomicos%20cap.pdf
- Solís, L. Y. y A. A. Torres. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares?. *Ciencia y el Hombre* 18(1): 12-13. <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm>
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28(10): 2731-9

<http://mbe.oxfordjournals.org/content/early/2011/05/04/molbev.msr121.abstract>

Thaewnon B., S. Klinbunga, K. Phanwichien, N. Sangduen, N. Lauhachinda, and P. Menasveta. 2004. Genetic diversity and molecular markers in introduced and Thai native apple snails (*Pomacea* and *Pila*). *J BiochemMol Biol.* 37(4):493-502. http://bmbreports.org/jbmb/jbmb_files/%5B37-4%5D0408031457_493-502.pdf

Ventura, R. 2006. *Canibalismo e assentamento de formas jovens de caranguejo-uçá, Ucides cordatus (L.) (Crustacea, Brachyura, ocypodidae), em condições de laboratório.* Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná. <http://dspace.c3sl.ufpr.br/dspace/bitstream/1884/5078/1/Disserta%20c3%a7%c3%a3o%20-20Robson%20Ventura%20de%20Souza.pdf>

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

ANEXOS

ANEXO 1

Secuencias de los 13 individuos de *U. occidentalis* utilizando el fragmento del gen COI.

>EL_TANQUE

```
CAA ATC TAT AAC GTA GTA GTT ACA GCC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTT
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGA GGA TTC GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCT TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TCT TTA TCT CTT CTT CTT ACG AGA AGT ATA GTA GAA
AGA GGT GTA GGA ACA GGA TGA ACA GTC TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCA GGA GCA TCT GTA GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTA TCA TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACA ACA GTA ATC AAT
ATA CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATA CCT TTA TTT GTA TGA GCA
ATC TTC ATT ACA GTC ATT CTT CTT CTT CTA TCT TTA CCA GTT CTG GCA GGA
GCT ATT ACT ATG CTT TTA ACT GAC CGT AAC CTA AA
```

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

```
ELSQPGLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFVMVPMIGGGFNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLTSSMVESGVGTGWTVPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLFVWVAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF
```

>ALGARROBO

```
CAA ATC TAT AAC GTA GTA GTT ACA GCC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTT
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGA GGA TTC GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCT TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TCT TTA TCT CTT CTT CTT ACG AGA AGT ATA GTA GAA
AGA GGT GTA GGA ACA GGA TGA ACA GTC TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCA GGA GCA TCT GTA GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTA TCT TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACA ACA GTA ATC AAT
ATA CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATA CCT TTA TTT GTA TGA GCA
ATC TTC ATT ACA GTC ATT CTT CTT CTT CTA TCT TTA CCA GTT TTA GCA GGA
GCT ATT ACT ATG CTT TTA ACT GAC CGT AAC CTA AA
```

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

```
ELSQPGLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFVMVPMIGGGFNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLTSSMVESGVGTGWTVPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLFVWVAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF
```

>ISLA_MATAPALO

```
CAA ATA TAT AAC GTA GTA GTT ACA ACC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTC
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGG GGA TTC GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCT TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TGT TTA TCT CTT CTT CTT ACG AGA AGT ATA GTT GAA
AGA GGT GTA GGA ACA GGA TGA ACA GTC TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCA GGA GCA TCT GTA GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTA TCA TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACA ACA GTA ATC AAT
ATA CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATA CCT TTA TTT GTA TGA GCA
ATC TTC ATT ACA GTC ATT CTT CTT CTT CTA TCT TTA CCA GTT TTG GCA GGA
GCC ATT ACT ATG CTT TTA ACT GAC CGT CAC CTA AA
```

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

```
ELSQPGLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFVMVPMIGGGFNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLTSSMVESGVGTGWTVPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLFVWVAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF
```

>LA_CANELA

CAA ATC TAT AAC GTA GTA GTC ACA GCC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTT
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGA GGA TTC GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCT TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TCT TTA TCT CTT CTT CTT ACG AGA AGT ATA GTA GAA
AGA GGT GTA GGA ACA GGA TGA ACA GTC TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCA GGA GCA TCT GTG GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTA TCT TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACA ACA GTA ATC AAT
ATA CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATA CCT TTA TTT GTA TGA GCA
ATC TTC ATT ACA GTC ATT CTT CTT CTT CTA TCT TTA CCA GTT TTA GCA GGA
GCT ATT ACT ATG CTT TTA ACT GAC CGT AAC CTA AA

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVLPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLSTSSMVESGVTGWTVPPLAAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLFVWAIFFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

>CHEPA

CAA ATC TAT AAC GTA GTA GTT ACA GCC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTC
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGG GGA TTC GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCT TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TCT TTA TCT CTT CTT CTT ACG AGA AGT ATA GTA GAA
AGA GGT GTA GGA ACA GGA TGA ACA GTC TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCA GGA GCA TCT GTA GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTA TCA TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACT ACA GTA ATC AAT
ATA CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATA CCT TTA TTT GTA TGA GCA
ATC TTC ATT ACT GTC ATT CTT CTT CAT CTA TCT TTA CCA GTT TTA GCA GGA
GCT ATT ACT ATG CTT TTA ACT GAC CGT AAC CTA AA

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVLPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLSTSSMVESGVTGWTVPPLAAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLFVWAIFFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF

>LA_CANELA_1

CAA ATC TAT AAC GTA GTA GTT ACA GCC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTT
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGA GGA TTC GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCT TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TCT TTA TCT CTT CTT CTT ACG AGA AGT ATA GTA GAA
AGA GGG GTA GGA ACA GGA TGA ACA GTC TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCA GGA GCA TCT GTA GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTA TCA TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACA ACA GTA ATC AAT
ATA CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATA CCT TTA TTT GTA TGA GCA
ATC TTT ATT ACA GTC ATT CTT CTT CTT CTA TCT TTA CCA GTT TTA GCA GGA
GCT ATT ACT ATA CTT TTA ACT GAC CGT AAC CTA AAC

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVLPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLSTSSMVESGVTGWTVPPLAAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLFVWAIFFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF,

>ZARUMILLA

CAA ATA TAT AAC GTA GTA GTT ACA GCC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTC
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGG GGA TTT GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCT TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TCT TTA TCT CTT GTT CTT ACG AGA AGT ATA GTT GAA
AGA GGT GTA GGA ACA GGA TGA ACA GTC TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCG GGA GCA TCT GTA GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTA TCA TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACT ACA GTA ATC AAT
ATA CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATA CCT TTA TTT GTA TGA GCA
ATC TTC ATT ACT GTC ATT CTT CTT CTT CTA TCT TTA CCA GTT TTA GCA GGA
GCT ATT ACT ATG CTT TTA ACT GAT CGT AAC CTA AA

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLTSSMVESGVTGWTVPPLAAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLFVWAI FITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF

>LA_RAMADA

CAA ATC TAT AAC GTA GTA GTT ACA GCC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTT
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGA GGA TTC GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCT TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TCT TTA TCT CTT CTT CTT ACG AAA AGT ATA GTA GAA
AGA GGT GTA GGA ACA GGA TGA ACA GTC TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCA GGA GCA TCT GTA GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTA TCA TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACA ACA GTA ATC AAT
ATA CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATA CCT TTA TTT GTA TGA GCA
ATC TTC ATT ACA GTC ATT CTT CTT CTT CTA TCT TTA CCA GTT TTA GCA GGA
GCT ATT ACT ATG CTT TTA ACT GAC CGT GAC CTA AA

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLTSSMVESGVTGWTVPPLAAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLFVWAI FITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF,

>JELI

CAA ATC TAT AAC GTA GTA GTT ACA GCC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTT
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGA GGA TTC GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCC TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TCT TTA TCT CTT CTT CTT ACA AGA AGT ATA GTA GAA
AGA GGT GTA GGA ACA GGA TGA ACA GTC TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCA GGA GCA TCT GTA GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTA TCT TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACA ACA GTA ATC AAT
ATA CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATA CCT TTA TTT GTA TGA GCA
ATC TTC ATT ACA GTC ATT CTT CTT CTT CTA TCT TTA CCA GTT TTA GCA GGA
GCT ATT ACT ATG CTT TTA ACT GAC CGT AAC CTA AA

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLTSSMVESGVTGWTVPPLAAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLFVWAI FITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF,

>ALGARROBO_1

CAA ATC TAT AAC GTA GTA GTT ACA GCC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTT
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGG GGA TTC GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCT TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TCT TTA TCT CTT CTT CTT ACG AGA AGT ATA GTA GAA
AGA GGT GTT GGA ACA GGA TGA ACA GTC TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCA GGA GCA TCT GTA GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTA TCA TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACA ACA GTA ATC AAT
ATA CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATACCT TTA TTT GTA TGA GCA ATC
TTT ATT ACA GTC ATT CTT CTT CTT CTA TCT TTA CCA GTT TTA GCA GCA GCT
CTT ACT ATG CTT TTA ACT GAC CGT CAC CTA AA

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLTSSMVEGSGVTGWTVPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLFVWAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF,

>CORRALES

CAA ATC TAT AAC GTA GTA GTT ACA GCC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTT
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGG GGA TTC GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCT TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TCT TTA TCT CTT CTT CTT ACG AGA AGT ATA GTA GAA
AGA GGT GTA GGA ACA GGA TGA ACA GTC TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCA GGA GCA TCT GTA GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTATCA TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACA ACA GTA ATC AAT ATA
CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATA CCT TTA TTT GTA TGA GCA ATC
TTC ATT ACA GTC ATT CTT CTT CTT CTA TCT TTA CCA GTT TTA GCA GGA GCT
ATT ACT ATG CTT TTA ACT GAC CGT AAC CTA AA

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLTSSMVEGSGVTGWTVPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLFVWAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF,

>ISLA_MATAPALO_1

CAA ATC TAT AAC GTA GTA GTT ACA GCC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTT
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGG GGA TTC GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCT TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TCT TTA TCT CTT CTT CTT ACG AGA AGT ATA GTA GAA
AGA GGT GTT GGA ACA GGA TGA ACA GTT TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCA GGA GCA TCT GTA GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTA TCA TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACA ACA GTA ATC AAT
ATA CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATA CCT TTA TTT GTA TGA GCA
ATC TTC ATT ACA GTC ATT CTT CTT CTT CTA TCT TTA CCA GTT TTA GCA GGA
GCT ATT ACT ATG CTT TTA ACT GAC CGA CAC CTA AA

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLTSSMVEGSGVTGWTVPPLAAAIAHAGASVDLGFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLFVWAIFITVILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNLNTSF,

>CHEPA_1

CAA ATA TAT AAC GTA GTA GTT ACA GCC CAC GCC TTC GTT ATA ATT TTC TTC
ATA GTT ATA CCA ATT ATA ATT GGG GGA TTC GGA AAT TGA CTA GTA CCT CTT
ATA TTA GGA GCT CCA GAT ATA GCT TTT CCA CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTT
TGA CTC CTT CCC CCA TCT TTA TCT CTT CTT CTT ACG AGA AGT ATA GTA GAA
AGA GGT GTA GGA ACA GGA TGA ACA GTC TAT CCT CCT TTA GCT GCC GCT ATC
GCT CAC GCA GGA GCA TCT GTA GAC TTA GGA ATT TTC TCC CTT CAT TTA GCC
GGA GTA TCA TCC ATT CTA GGA GCA GTA AAT TTT ATA ACA ACA GTA ATC AAT
ATA CGA TCT TAT GGT ATA ACA ATA GAC CAG ATA CCT TTA TTT GTA TGA GCA
ATC TTC ATT ACA GTC ATT CTT CTT CTT CTA TCT TTA CCA GTT TTA GCA GGA
GCC ATT ACT ATG CTT TTA ACT GAC CGT AAC CTA AA

Polipéptido traducido (180 aminoácidos):

ELSQPGSLIGNDQIYNVVVTAHAFVMIFFMVMPIMIGGFGNWLVPLMLGAPDMAFPRMNNMSFWLLPSSL
SLLLTSSMVESVGTGWTVPPLAAAAIAHAGASVDLGIFSLHLAGVSSILGAVNFMTTVINMRSYGMTMD
QMPLEFVWAIFITVILLLLSLPVLGAI TMLLTDRNLNTSF

ANEXO 2

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

Hap	Cant	Muestra de ejemplo	Sitios variables (nucleótidos de las secuencias de ADN)																														
			6	21	25	51	75	81	126	170	181	189	191	201	210	213	231	264	276	315	345	414	420	434	451	453	458	462	463	471	483	486	487
h01	1	LA_CANELA M2	C	C	G	T	A	C	T	C	C	G	G	A	T	A	C	A	G	T	A	C	A	T	T	A	G	T	A	G	C	T	A
h02	1	ALGARROBO M2	A	T	G	C	G	C	T	C	C	G	G	A	T	A	C	A	A	A	A	C	A	T	T	A	G	C	A	G	C	T	A
h03	1	ISLA_MATAPALO M1	A	T	G	C	G	T	T	C	G	G	G	T	T	A	C	G	A	A	T	C	T	T	T	A	G	T	A	G	T	T	A
h04	1	ALGARROBO M1	C	T	G	T	A	C	T	C	C	G	G	A	T	A	C	A	A	T	A	C	A	T	T	A	G	T	A	G	C	T	A
h05	1	JELI M1	C	T	G	T	G	C	T	C	C	G	G	A	T	T	T	A	A	A	A	C	A	T	T	A	G	T	A	G	C	A	C
h06	1	CORRALES 2 M2	C	T	G	C	G	C	T	C	C	G	G	A	T	A	C	A	A	A	T	C	T	A	T	A	G	T	A	G	C	T	A
h07	1	EL_TANQUE M1	C	T	G	T	A	C	T	C	C	G	G	A	T	A	C	A	A	A	A	C	A	T	C	G	G	T	A	G	C	T	A
h08	1	LA_RAMADA M1	C	T	G	T	G	C	T	C	C	G	G	A	T	T	C	A	A	A	A	T	A	T	T	A	C	T	C	G	C	T	C
h09	1	ZARUMILLA M1	C	T	G	T	A	C	C	C	C	A	G	A	T	A	C	A	A	T	A	C	A	T	T	A	G	T	A	G	C	T	A
h10	1	ISLA_MATAPALO M2	A	T	A	C	G	C	T	G	C	G	G	T	T	A	C	A	A	A	A	C	A	T	T	G	G	C	A	G	C	T	C
h11	1	CHEPA M1	C	T	G	T	G	C	T	C	C	G	G	A	T	A	C	A	A	A	A	C	A	T	T	A	G	T	A	G	C	T	A
h12	1	CHEPA M2	C	T	G	T	A	C	T	C	C	G	G	A	G	A	C	A	A	A	A	T	A	T	T	A	G	T	A	A	C	T	A
h13	1	LA_CANELA M1	C	T	G	T	A	C	T	C	C	G	A	A	T	A	C	A	A	A	A	C	A	T	T	A	G	T	A	G	C	T	G