

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E. A. P. DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

**Ayudando a descifrar el enigma taxonómico, el código  
de barras de ADN de *Megalobulimus* spp. (Mollusca,  
Gastropoda) del departamento de San Martín – Perú**

**TESIS**

para optar al título profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo

**AUTOR**

**Carlos Congrains Castillo**

**Lima-Perú**

**2010**

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

Ayudando a descifrar el enigma taxonómico, el código de barras de ADN de *Megalobulimus* spp. (Mollusca, Gastropoda) del Departamento de San Martín – Perú.

Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista  
Biotecnólogo

Bach. Carlos Congrains Castillo

---

Firma

Asesor:

Dra. Rina Lastenia Ramírez Mesías

---

Firma

LIMA-PERÚ  
2010

*We should preserve every scrap of biodiversity as priceless while we learn to use it and come to understand what it means to humanity.*

**E. O. Wilson**

A mis padres y hermana,  
por mostrarme el camino.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Rina Ramírez por guiarme académica y profesionalmente, por su apoyo y todas sus enseñanzas.

A mis amigos del Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la Facultad de Ciencias Biológicas y del departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural, ambas instituciones pertenecientes a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Especialmente a Ana, Jorge, Pedro, Daniel, Jenny, Norma, Pavel y Víctor, quien me ayudo a tomar unas fotografías.

A todos los miembros del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, a los profesores Pablo Ramírez y Ruth García quienes me permitieron utilizar sus equipos. A alumnos y ex-alumnos Julio, “Guti”, Marco, Michael, Ruth, Yanina y Susan.

A los miembros del laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Mag. Martha Valdivia, “Ale”, Pepe, Claudia, Rosmary quienes me permitieron usar sus equipos. De la misma forma, a los integrantes del laboratorio de Artes y Métodos de Pesca, Profesor Blgo. Roger Quiroz, Cesar, Luz, Fabiola y Diana, que me posibilitaron el uso de sus instalaciones para realizar la tediosa tarea de revelar los geles de agarosa.

Este trabajo no hubiera podido materializarse sin el financiamiento del Vicerrectorado de Investigación con el multidisciplinario 2007 intitulado “Caracterización genómica de caracoles terrestres nativos (*Megalobulimus* spp.), como un sello de garantía para especies promisorias, y caracterización química de su baba”. Así como también con el apoyo obtenido directamente para la tesis gracias al fondo de promoción de trabajos de tesis de pre grado 2008 con código 081001047.

A mi amada Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas y a la Escuela Académico Profesional de Genética y Biotecnología, con especial mención a nuestro director Fernando Retuerto.

A todos los profesores que de una u otra forma me han ayudado a llevar a cabo esta investigación. No puedo dejar de mencionar a la profesora Elena Arbaiza quien me hizo llegar las correcciones del proyecto de manera sumamente diligente.

A mi familia, mis padres, mi hermana por estar siempre conmigo. A mi querida Karla por ayudarme en la edición de las imágenes.

## Índice General

<b>1. Introducción</b>	8
1.1. Objetivos	15
1.1.1. Objetivo General	15
1.1.2. Objetivos específicos	15
<b>2. Materiales y Métodos</b>	17
2.1. Área de estudio y material colectado	18
2.2. Preparación del material biológico	23
2.3. Extracción de ADN total	24
2.4. Amplificación de los marcadores mitocondriales	24
2.4.1. Amplificación del 16S rRNA	25
2.4.2. Amplificación del COI	25
2.5. Visualización del ADN por electroforesis	26
2.6. Purificación y secuenciamiento del ADN	26
2.7. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias	26
2.7.1. Edición de Secuencias	26
2.7.2. <i>Outgroups</i>	27
2.7.3. Alineamiento	27
2.7.4. Caracterización de las dos regiones del genoma mitocondrial y calidad de los datos.	28
2.7.5. Índices Moleculares	28
2.7.6. Distancias Genéticas	29
2.7.7. Reconstrucción filogenética	29
2.7.7.1. Método de distancia	31
2.7.7.2. Método de Máxima Parsimonia	31
2.7.7.3. Método de Máxima Verosimilitud	31
2.7.7.4. Método de Inferencia Bayesiana	31
2.7.8. Análisis de <i>Network</i>	32
2.7.9. Barcode	32
<b>3. Resultados</b>	34
3.1. Extracciones de ADN total	35
3.2. Amplificación de los genes	35
3.4. Secuenciamiento	39
3.5. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias de ADN	40
3.5.1. Gen COI	40
3.5.1.1. Características de las secuencias	40
3.5.1.2. Caracterización de la región del COI del genoma mitocondrial y calidad de los datos	41
3.5.1.3. Distancia Genética	43
3.5.1.4. Índices Moleculares	45
3.5.1.5. Reconstrucción filogenética	46
3.5.1.6. Análisis de <i>Network</i>	50
3.5.1.7. Barcode	51
3.5.1.7.1. <i>M. huascari</i>	51
3.5.1.7.2. <i>M. popelairianus</i>	55
3.5.1.7.3. <i>M. capillaceus</i>	55

3.5.2. Gen 16S rRNA	59
3.5.2.1. Características de las secuencias	59
3.5.2.2. Caracterización de la región del 16S rRNA del genoma mitocondrial y calidad de los datos	60
3.5.2.3. Distancia Genética	62
3.5.2.4. Índices Moleculares	65
3.5.2.5. Reconstrucción filogenética	65
3.5.2.6. Análisis de Network	71
3.5.2.7. Barcode	72
3.5.3. Genes 16S rRNA y COI	72
3.5.3.1. Reconstrucción filogenética	72
<b>4. Discusión</b>	74
4.1. Estandarización de protocolos	75
4.2. Calidad de los datos	76
4.3. Distancias genéticas	77
4.4. Índices moleculares	78
4.5. Relaciones evolutivas	79
4.6. <i>Network</i>	82
4.7. Barcode	82
4.8. Implicancias en la conservación y sustentable de especies de <i>Megalobulimus</i> .	84
4.9. Comentario final	85
<b>5. Conclusiones</b>	86
<b>6. Recomendaciones</b>	89
<b>7. Referencias Bibliográficas</b>	91



## Índice de Figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Mapa mostrando el Departamento de San Martín y las localidades de colecta. Modificado de Google Maps.	21
<b>Figura 2.</b> Vista frontal y dorsal de 5 individuos evaluados. A y B: <i>M. huascari</i> de Juan Guerra (código 82). C y D: <i>M. aff. huascari</i> de Caspizapa (código 94). E, F, G y H: <i>M. aff. huascari</i> del Mercado de Tarapoto (códigos 90 y 91) . I y J: <i>M. popelairianus</i> de Saposoa (código 93).	22
<b>Figura 3.</b> Vista frontal y dorsal de tres individuos de <i>M. capillaceus</i> . A y B: Lamas (código 36). C y D: Rioja (código 22). E y F: Caspizapa (código 27).	23
<b>Figura 4.</b> PCR de COI de <i>M. capillaceus</i> , carriles 2 y 3 son blanco negativo y marcador de peso molecular respectivamente, en 1, 4, 5, 6 se observa una banda de aproximadamente 700pb.	37
<b>Figura 5.</b> PCR de COI, carriles 1 y 2 son blancos positivo (perteneciente a <i>M. huascari</i> ) y negativo respectivamente, en los carriles 3, 4 y 5 se aprecian dobles bandas ( <i>M. capillaceus</i> ).	37
<b>Figura 6.</b> PCR de 16S rRNA, carriles 1 y 2 son blanco negativo y marcador de peso molecular respectivamente, en los carriles 3 y 4 se aprecian resultados positivos de individuos de la especie <i>M. huascari</i> con un tamaño superior a 300 pares de bases.	38
<b>Figura 7.</b> PCR de 16S rRNA, carriles 1 y 2 son resultados positivos de especímenes de <i>M. capillaceus</i> , 3 y 4 resultado negativo pero con presencia de ADN de <i>M. popelairianus</i> y blanco negativo, respectivamente.	38
<b>Figura 8.</b> Transiciones y transversiones comparadas con la distancia genética con el modelo de sustitución nucleotídica k80 (K2p) del alineamiento del gen COI de las especies del género <i>Megalobulimus</i> sin los taxa del grupo externo. “s”: transiciones; “v”: transversiones.	42
<b>Figura 9.</b> Transiciones y transversiones comparadas con la distancia genética con el modelo de sustitución nucleotídica K80 (K2p) del gen COI de las especies del género <i>Megalobulimus</i> y grupos externos. “s”: transiciones; “v”: transversiones.	42
<b>Figura 10.</b> Transiciones y transversiones comparadas con la distancia genética de cada una de las posiciones nucleotídicas de los codones con el modelo de sustitución nucleotídica K80 (K2p) del gen COI de las especies del género <i>Megalobulimus</i> y grupos externos. Donde, “s”: transiciones; “v”: transversiones. 1st, 2nd, 3rd simbolizan primera, segunda, tercera posición de los codones y <i>all</i> , las tres posiciones juntas.	43
<b>Figura 11.</b> Distancias genéticas intragénero e intragrupo del COI haciendo varias combinaciones de las secuencias de <i>M. capillaceus</i> , <i>Megalobulimus</i> spp. y <i>M. popelairianus</i> , calculadas con el modelo K2p.	44
<b>Figura 12.</b> Dendograma de similitud del marcador COI del género <i>Megalobulimus</i> del Departamento de San Martín con el método UPGMA. En la parte inferior se muestra la escala de distancia genética. El haplotipo Maffhual fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como <i>M. aff. huascari</i> y <i>M. aff. popelairianus</i> . Azul: <i>M. huascari</i> , verde: <i>Megalobulimus</i> spp., marrón: <i>M. popelairianus</i> , rojo: <i>M. capillaceus</i> .	45
<b>Figura 13.</b> Filogenia por el método NJ de los haplotipos del COI, del género <i>Megalobulimus</i> del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de <i>bootstrap</i> y la escala de distancia genética. El haplotipo Maffhual fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como <i>M. aff. huascari</i> y <i>M. aff. popelairianus</i> . Azul: <i>M. huascari</i> , verde: <i>Megalobulimus</i> spp., marrón: <i>M. popelairianus</i> , rojo: <i>M. capillaceus</i> y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank.	48

- Figura 14.** Árbol filogenético obtenido por MP de los haplotipos del gen COI del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de *bootstrap*. El haplotipo Maffhual fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesión del GenBank. 48
- Figura 15.** Árbol filogenético obtenido por consenso estricto con ML del gen COI de los haplotipos del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de *bootstrap*. El haplotipo Maffhual fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesión del GenBank. 49
- Figura 16.** Árbol filogenético obtenido por consenso estricto con ML del gen COI de los haplotipos del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín, excluyendo al haplotipo Maffhua2. Se muestran los valores de *bootstrap*. El haplotipo Maffhual fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesión del GenBank. 49
- Figura 17.** Árbol filogenético obtenido por la regla de la mayoría del análisis de Inferencia Bayesiana del gen COI del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de probabilidad posterior. El haplotipo Maffhual fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesión del GenBank. 50
- Figura 18.** Network de los haplotipos del gen COI. Cada círculo representa un haplotipo, cada color indica la localidad (etiquetada en la izquierda de la figura) y el tamaño informa la frecuencia (la escala se encuentra a la derecha de la imagen). Los números de color rojo son las posiciones en donde ha ocurrido una mutación. Los rombos pequeños de color rojo representan la presencia de un haplotipo no muestreado o extinto. Nótese que el haplotipo Maffhual es compartido por *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. 51
- Figura 19.** Código de barras de ADN del haplotipo Mhua1 (*M. huascari*). Las adeninas, guaninas, citocinas y timinas son representadas por los colores verde, negro, azul y rojo, respectivamente. 52
- Figura 20.** Porcentajes de similitud de la secuencia del haplotipo Mhua1 del COI con los 100 primeros *matches* de la *All Barcode Records*. 53
- Figura 21.** Árbol filogenético realizado con NJ y el modelo de sustitución nucleotídica K2p del haplotipo Mhua1 del COI (*Unknown specimen*) junto con las 100 secuencias con mayor porcentaje de similitud de la *All Barcode Records*. 54
- Figura 22.** Código de barras de ADN del haplotipo Mcap (*M. capillaceus*). Las adeninas, guaninas, citocinas y timinas son representadas por los colores verde, negro, azul y rojo, respectivamente. 56
- Figura 23.** Porcentajes de similitud de la secuencia del haplotipo de *M. capillaceus* del COI con los 100 primeros *matches* de la *All Barcode Records*. 57
- Figura 24.** Árbol filogenético realizado con NJ y el modelo de sustitución nucleotídica K2p del haplotipo de *M. capillaceus* del COI (*Unknown specimen*) junto con las 100 secuencias con mayor porcentaje de similitud de la *All Barcode Records*. 58
- Figura 25.** Transiciones y transversiones comparadas con la distancia genética con 61

- el modelo de sustitución nucleotídica K80 (K2p) del alineamiento del gen 16S rRNA de las especies del género *Megalobulimus* sin los taxa del grupo externo. “s”: transiciones; “v”: las transversiones.
- Figura 26.** Transiciones y transversiones comparadas con la distancia genética con el modelo de sustitución nucleotídica K80 (K2p) del gen 16S rRNA de las especies del género *Megalobulimus* y las del grupo externo. “s”: transiciones; “v”: transversiones. 61
- Figura 27.** Distancias genéticas intragénero e intragrupo del 16S rRNA haciendo varias combinaciones de las secuencias de *M. capillaceus*, *Megalobulimus* spp. y *M. popelairianus*, calculadas con el modelo K2p. 64
- Figura 28.** Dendograma de similitud del marcador 16S rRNA del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín con el método UPGMA. En la parte inferior se muestra la escala de distancia genética. El haplotipo Maffhual fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus*. 64
- Figura 29.** Filogenia por el método NJ de los haplotipos del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín con el gen 16S rRNA tomando en cuenta los gaps. En la parte inferior izquierda de la imagen se muestra la escala de distancia genética. Se muestran los valores de *bootstrap* y la escala de distancia genética. El haplotipo Maffhual fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank. 67
- Figura 30.** Filogenia por el método NJ de los haplotipos del 16S rRNA del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín sin tomar en cuenta los gaps. Se muestran los valores de *bootstrap* y la escala de distancia genética. El haplotipo Maffhual fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank. 67
- Figura 31.** Árbol filogenético obtenido por MP de los haplotipos del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín con el gen 16S rRNA con la opción *gap=missing*. El haplotipo Maffhual fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank. 68
- Figura 32.** Árbol filogenético obtenido por MP de los haplotipos del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín con el gen 16S rRNA con la opción *gap=newstate*. Se muestran los valores de *bootstrap*. El haplotipo Maffhual fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank. 68
- Figura 33.** Árbol filogenético obtenido por consenso estricto con ML de los haplotipos del gen 16S rRNA del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de *bootstrap*. El haplotipo Maffhual fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank. 69
- Figura 34.** Árbol filogenético obtenido por consenso estricto con ML de los haplotipos del gen 16S rRNA del género *Megalobulimus* del Departamento de San 69

Martín, excluyendo al individuo Maffhua2. Se muestran los valores de *bootstrap*. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank.

**Figura 35.** Árbol filogenético obtenido por la regla de la mayoría del análisis de Inferencia Bayesiana de los haplotipos del gen 16S rRNA del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de probabilidad posterior. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank. 70

**Figura 36.** Árbol filogenético obtenido por la regla de la mayoría del análisis de Inferencia Bayesiana de los haplotipos del gen 16S rRNA del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín, excluyendo al haplotipo Maffhua2. Se muestran los valores de probabilidad posterior. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank. 70

**Figura 37.** Network de los haplotipos del gen 16S rRNA. Cada círculo representa un haplotipo, cada color indica la localidad (etiquetada a la izquierda de la figura) y el tamaño informa la frecuencia (la escala se encuentra a la derecha de la imagen). Los números de color rojo son las posiciones en donde ha ocurrido una mutación. Los círculos pequeños de color rojo representan la presencia de un haplotipo no muestreado o extinto. Nótese que el haplotipo Maffhua1 es compartido por *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. 71

**Figura 38.** Árbol filogenético obtenido por consenso estricto con ML de los 999 posiciones correspondientes a la matriz de datos combinando de los haplotipos de los genes 16S rRNA y COI del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo. 73

**Figura 39.** Árbol filogenético obtenido por la regla de la mayoría del análisis de Inferencia Bayesiana de los 999 posiciones nucleotídicas de la matriz de los datos con los haplotipos de los genes 16S rRNA y COI del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de probabilidad posterior. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo. 73

## Índice de Tablas

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Promedio de las mediciones extraídas de las tablas de Bequaert (1948) de las principales características conchológicas de las tres especies en estudio. Los cinco primeros caracteres fueron colocados en centímetros	11
<b>Tabla 2.</b> Individuos colectados por especie y localidad indicando las coordenadas geográficas y colectores	19
<b>Tabla 3.</b> Número y porcentaje de éxito de las extracciones y pruebas de PCR para la especie <i>M. capillaceus</i>	35
<b>Tabla 4.</b> Número y porcentaje de éxito de las extracciones y pruebas de PCR para las especies <i>M. huascari</i> y <i>M. aff. huascari</i>	36
<b>Tabla 5.</b> Número y porcentaje de éxito de las extracciones y pruebas de PCR para las especies <i>M. popelairianus</i> y <i>M. aff. popelairianus</i>	36
<b>Tabla 6.</b> Individuos ordenados por especie y código que fueron utilizados para este estudio. Se indican los genes secuenciados para cada uno	39
<b>Tabla 7.</b> Nominación de los haplotipos encontrados para el gen COI por individuo	40
<b>Tabla 8.</b> Cantidad, frecuencia de las bases nucleotídicas y abundancia relativa de las islas CpG para los haplotipos de <i>M. capillaceus</i> , <i>M. huascari</i> , <i>M. popelairianus</i> , <i>N. beyrichi</i> y <i>N. kraussi</i> con el marcador COI	41
<b>Tabla 9.</b> Distancias entre los pares de haplotipos del COI, siguiendo el modelo de sustitución nucleotídica K2p para taxa de <i>Megalobulimus</i>	44
<b>Tabla 10.</b> Distancias inter e intraespecíficas de <i>M. capillaceus</i> , <i>Megalobulimus</i> spp., <i>M. popelairianus</i> , <i>N. beyrichi</i> y <i>N. kraussi</i> con el gen COI con el modelo K2p	44
<b>Tabla 11.</b> Estadística descriptiva del COI de <i>M. huascari</i> , <i>M. aff. huascari</i> y <i>M. aff. Popelairianus</i>	46
<b>Tabla 12.</b> Diez primeros resultados del BLASTn para el haplotipo Mhua1 del COI	52
<b>Tabla 13.</b> Diez primeros resultados de la comparación con la base de datos <i>All Barcode Records</i> para el haplotipo Mhua1 del COI	53
<b>Tabla 14.</b> Diez primeros resultados del BLASTn del haplotipo de <i>M. capillaceus</i> del COI	55
<b>Tabla 15.</b> Diez primeros resultados de la comparación con la base de datos <i>All Barcode Records</i> para la secuencia del COI de <i>M. capillaceus</i>	56
<b>Tabla 16.</b> Nominación de los haplotipos encontrados para el gen 16S rRNA por individuo	59
<b>Tabla 17.</b> Cantidad, frecuencia de las bases nucleotídicas y abundancia relativa de las islas CpG para los haplotipos de <i>M. capillaceus</i> , <i>M. huascari</i> , <i>M. popelairianus</i> , <i>N. beyrichi</i> y <i>N. kraussi</i> con el marcador 16S rRNA	60
<b>Tabla 18.</b> Distancias inter e intraespecíficas para el gen 16S rRNA	62
<b>Tabla 19.</b> Distancias de la comparación a pares de los haplotipos del gen 16S rRNA	63
<b>Tabla 20.</b> Estadística descriptiva del 16S rRNA de <i>M. huascari</i> , <i>M. aff. huascari</i> y <i>M. aff. Popelairianus</i>	65

## Resumen

Dentro de la gama de especies de la selva peruana, se encuentran caracoles terrestres de la familia Megalobulimidae (Mollusca, Gastropoda), entre las que destacan *Megalobulimus popelairianus*, *Megalobulimus huascari* y *Megalobulimus capillaceus*, que tienen importancia económica por las propiedades nutricionales de su carne y cosméticas de su baba. Este trabajo tuvo por objetivo principal desarrollar perfiles de ADN de los Megalobulimidae de San Martín, que hagan posible su reconocimiento a nivel específico y estudiar su salud genético poblacional mediante la diversidad genética, todo ello para garantizar su uso sustentable y eventualmente certificar a estas especies en el biocomercio peruano. Se evaluaron 65 muestras biológicas que fueron colectadas en septiembre de 2007 y enero, febrero y marzo de 2008. Se realizó la extracción de ADN con el método del CTAB y cloroformo, alcohol-isoamílico a partir de tejido muscular de pie. Se amplificaron y secuenciaron regiones de los genes 16S rRNA y Citocromo C oxidasa subunidad I (COI) del genoma mitocondrial con *primers* internos y universales, respectivamente. Las secuencias de ADN fueron alineadas, caracterizadas, se determinó la calidad de los datos, distancias genéticas, diversidad genética, se realizó la reconstrucción filogenética con NJ, MP, ML e BI y se analizaron los perfiles de ADN. La tasa de éxito de amplificación del COI fue inferior a la del 16S rRNA. Sorprendentemente, las 31 secuencias de ADN de *M. capillaceus* no mostraron ninguna variante genética. Los ejemplares de difícil identificación entre *M. huascari* y *M. popelairianus* (rotulados como *Megalobulimus* spp.) mostraron bajos valores de divergencia genética (menores al 2%) con *M. huascari*, además que formaron grupos monofiléticos estadísticamente bien sustentados con el gen COI con todos los métodos utilizados. Las filogenias con el 16S rRNA fueron poco concluyentes y variaron según las metodologías. Los datos combinados de ambos genes arrojaron árboles filogenéticos no resueltos. La carencia de diversidad genética de *M. capillaceus*, que muy probablemente haya sido producida por la sobreexplotación, pone en riesgo su supervivencia como especie. Por otra parte, el grupo *Megalobulimus* spp. (exceptuando *M. aff. huascari* número 91) fueron incluidos en el grupo de *M. huascari*. Se concluye que contrariamente con lo que ocurre con el 16S rRNA, el perfil COI de *M. huascari* y *M. capillaceus* puede servir como un código de barras de ADN para su identificación específica.



## Abstract

Among the great variety of species from the Peruvian Amazon forest are the land snails of the family Megalobulimidae (Mollusca, Gastropoda), among them are *Megalobulimus popelairianus*, *Megalobulimus huascari* y *Megalobulimus capillaceus*, that have economic importance for both the nutritional properties of their meat and cosmetic properties of their slime. The main goal of this research was to develop DNA profiles of the Megalobulimidae land snails from San Martin, to allow their recognition at specific level, and to study their population genetic health through the genetic diversity, in order to guarantee their sustainable use and eventually to certify these species in Peruvian biotrade. The biological samples were collected in September of 2007 and January, February and March of 2008. The total DNA extraction was carried out by a CTAB protocol, with chloroform-isoamílic alcohol, from foot muscle tissue of 65 snails. Fragments of the genes 16S rRNA and Cytochrome C oxidase subunit I (COI) of the mitochondrial genome were amplified and sequenced, using internal and universal primers, respectively. DNA sequences were aligned, characterized, determined the data quality, genetic distances, genetic diversity; the phylogenetic reconstruction was performed with NJ, MP, ML and BI; DNA profiles were analyzed. COI amplification rate was lower than the 16S rRNA one. Surprisingly, the 31 DNA sequences of *M. capillaceus* did not show any genetic variant. Low values of genetic divergence (lower than 2%) between *M. huascari* and *Megalobulimus* spp. in both genes were found, besides, they were in a monophyletic group, with robust statistical support for the COI marker. 16S rRNA phylogenies were inconclusive and varied according to the methodologies. The combined data showed unresolved phylograms. *M. capillaceus* did not show genetic diversity, probably as a result of over hunting, which could threaten its survival as a species. Furthermore, specimens without species level identification with traditional taxonomy (except *M. aff. huascari* number 91) were classified as belonging to *M. huascari*. In conclusion, contrary to 16S rRNA, *M. huascari* and *M. capillaceus* COI profiles could be used as DNA barcodes to identify them at specific level.

# **1. Introducción**



La abundante biodiversidad de Perú alberga especies cuyo valor ecológico, económico, cultural y paisajístico, se contraponen con los escasos estudios científicos que en ellas se han realizado. Por tal motivo, se hace esencial llevar a cabo investigaciones básicas como determinar sus clasificaciones taxonómicas, características ecológicas, diversidades genéticas y demás abordajes para conformar bases sólidas que conlleven a las estrategias adecuadas para la utilización sustentable de estos recursos.

La zona tropical de los Andes presenta condiciones ideales para la proliferación de toda clase de organismos y es considerada como uno de los 25 *hotspots* de biodiversidad en el mundo (Myers *et al.*, 2000).

Dentro de la gama de especies que habitan esta región, se encuentran caracoles terrestres de la familia Megalobulimidae (Mollusca, Gastropoda), entre las que destacan *Megalobulimus popelairianus* (Nyst, 1845), *Megalobulimus huascari* (Tschudi, 1852) y *Megalobulimus capillaceus* (Pfeiffer, 1855), que no sólo tienen importancia ecológica sino también económica. Son fuente de alimento para las comunidades selváticas desde tiempos muy antiguos y poseen un gran potencial de exportación, en especial la última de las especies antes mencionadas, debido a sus particulares características morfológicas y nutricionales (Ramírez & Cáceres, 1991). En los últimos años la baba de caracol ha cobrado gran interés en el sector cosmético y estos caracoles han sido comercializados ampliamente por sus supuestos dones curativos a la piel.

Los habitantes de la selva han denominado a los caracoles de mayor tamaño como por ejemplo *Megalobulimus popelairianus* y *M. huascari* (conocidos como congompes) y a *M. capillaceus* (caracoles de mediano tamaño conocidos como pucashimi). Era lógico pensar que dada la relación de estos animales con el hombre, serían llamados de alguna manera, pero también se puede interpretar de ello, que los caracoles más grandes son difíciles de separar en grupos según sus características morfológicas, por ello se les fue otorgado un solo nombre de manera general.

En el Perú se han reportado nueve especies del género *Megalobulimus* ubicadas, principalmente, en la Vertiente Oriental (considerada entre 3500 y 500 msnm) y Amazonía (considerada entre 500 y 100 msnm) (Ramírez, *et al.*, 2003).

Se tienen reportes de *Megalobulimus popelairianus* en San Ramón, Valle Chanchamayo y Satipo (Departamento de Junín), al Oeste y Suroeste de Pucallpa (Departamento de Ucayali), cerca al río Huallaga (Departamento de San Martín) y en el Departamento de Loreto (Bequaert, 1948); *Megalobulimus huascari* en Chancamayo y río Toro (Departamento de Junín), Oxapampa (Departamento de Cerro de Pasco), Moyopampa, Polvoraico y Shapaja (Departamento de San Martín) (Ramírez & Cáceres, 1991); *Megalobulimus capillaceus* en Ambo (Departamento de Huánuco), Moyobamba (Departamento de San Martín) (Bequaert, 1948), Saposoa, Pucaca, Shapaja, Tarapoto y Morales (Departamento de San Martín) (Ramírez & Cáceres, 1991). Las colecciones científicas del Departamento de Carcinología y Malacología del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos muestran la existencia de estas especies en varias localidades del Departamento de San Martín.

*Megalobulimus huascari* ha sido desde su descubrimiento una especie bastante difícil de clasificar. Bequaert (1948) determinó que este taxón era una subespecie y lo denominó como *M. maximus huascari*. Recientemente ha sido nombrado nuevamente como *M. huascari*, debido a que, análisis moleculares con los genes 16S rRNA y COI lo posicionaron en un clado distinto al de *M. maximus* (Ramírez *et al.*, 2009).

Por otro lado, *Megalobulimus popelairianus* y *M. huascari* son dos especies cuyas diagnósis utilizando conchillas pueden ser bastante complicadas e incluso irresolutivas, porque presentan caracteres morfológicos superpuestos, tales como longitud, características de la apertura y número de vueltas de la concha. Por el contrario, la diferenciación de *M. capillaceus* con respecto a las dos anteriores es bastante simple por su menor tamaño y el labio de la conchilla de color rojizo (Tabla 1) (Bequaert, 1948).

Desde el origen de la taxonomía han surgido muchos problemas para clasificar a los seres vivos, el mayor de todos es la gran diversidad de especies, que en su mayoría no se conocen o existen diversos problemas para su identificación. Para resolverlos se ha buscado una forma fácil, rápida y económica para reconocer especies, y la solución consiste en hacer uso de una metodología que utiliza a la secuencia de ADN para diferenciar e identificar especies (Tautz *et al.*, 2003).

**Tabla 1.** Promedio de las mediciones extraídas de las tablas de Bequaert (1948) de las principales características conchológicas de las tres especies en estudio. Los cinco primeros caracteres fueron colocados en milímetros.

Especie	Longitud	Ancho en vista de frente	Ancho en vista de Perfil	Apertura		Número de vueltas
				Longitud	Ancho	
<i>M. huascari</i>	100.4	53	47.4	52.6	23.9	5.5
<i>M. popelairianus</i>	134.1	80.4	64.5	73.8	39.5	5.5
<i>M. capillaceus</i>	65.04	40	34.41	40.27	18.73	5,2

Uno de los primeros artículos desarrollados con el objetivo de reconocer individuos de una especie mediante una secuencia de ADN, fue publicado en el año 2000 y utilizó como marcador a un segmento de 300 pares de bases del gen citocromo B del ADN mitocondrial para resolver casos forenses (Parson *et al.*, 2000). Le siguieron muchos investigadores que utilizaron la misma metodología con diferentes marcadores moleculares en microorganismos (Rosello-Mora & Amann, 2001), artrópodos (Smith *et al.*, 2005), peces (Ward *et al.*, 2005), aves (Herbert *et al.*, 2004), anfibios (Vences *et al.*, 2005) y en el orden Pulmonata (Pfenninger *et al.*, 2006).

Para formalizar lo anterior, desde el año 2003 se puede hablar de *DNA Barcode* o código de barras genético. Este término se refiere a que una corta secuencia de ADN puede servir para identificar especies, de la misma forma que el código de barras de los supermercados sirve para identificar algún producto. La diferencia radica en la existencia de cuatro posibilidades de cambio del ADN en vez de los dígitos de los números arábigos, siendo que la ocurrencia de mutación en la tercera posición de cada codón es mucho más frecuente (si es que tratamos con secuencias codificantes) y que en algunos casos tienden a tener sólo una opción (para no volverse deletéreas), entonces matemáticamente estudiando tan sólo 72 nucleótidos existirían  $2^{24}$  (16 777 216) secuencias diferentes, con lo que cada especie tendría la posibilidad de ser identificada por una única secuencia (Herbert *et al.*, 2003a).

En los últimos años se ha discutido mucho sobre cuál es la secuencia marcadora idónea para que se lleve a acabo de manera universal el reconocimiento específico, dentro de los cuales cabe destacar los que se encuentran en el genoma mitocondrial, debido a su alta tasa de mutación y carencia de recombinación (Avisé *et al.*, 1987; Brown *et al.*, 1979). Así, se han evaluado dos posibles marcadores, la subunidad mayor del gen ribosomal (16S rRNA) y Citocromo C Oxidasa Subunidad I (COI), este último

es el que presenta un mayor número de cualidades, como la existencia de *primers* universales (Folmer *et al.*, 1994), los cuales ya han sido probados en el Laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, y una alta tasa de mutación en la 3ra posición de los codones, que le confiere posibilidad de cambio tres veces mayor a la del otro marcador. Además, este segmento genómico casi nunca presenta rearrreglos del tipo inserciones-delecciones (*indels*), por tanto, los alineamientos son mucho más sencillos de realizar por estar libres de *gaps*. Por todo ello, está propuesto como el marcador genético ideal para el código de barras de ADN (Herbert *et al.*, 2003a).

Con lo anterior, parecería que el gen COI es el adecuado para cumplir esta función, pero en algunos grupos de organismos este marcador puede tener dificultades técnicas para su amplificación debido a mutaciones en la región de los *primers* o puede no poseer suficiente poder de resolución como en anfibios, donde el 16S rRNA tuvo una mejor performance (Vences *et al.*, 2005).

La divergencia genética es clave para la identificación de especies, porque determina el grado de variación del marcador y por tanto su posibilidad de ser único para una especie. Estudios en aves y otros organismos encontraron que al menos 2% de divergencia entre especies determina la posibilidad de reconocer una especie (Herbert *et al.*, 2003b; Herbert *et al.*, 2004). Al hacer una comparación de la secuencia COI se demuestra que el phylum Mollusca presenta en promedio aproximadamente 11% de variación de la secuencia nucleotídica comparando 1155 pares de especies, pero también existen especies, en muy baja proporción, cuyas secuencias se diferencian en menos del 1% (Herbert *et al.*, 2003b).

La divergencia intraespecífica de los genes mitocondriales, en la mayoría de los casos, es menor al 1% en el gen de la citocromo c oxidasa (Avice, 2000) y no es mayor al 2% en el gen COI (Hebert *et al.*, 2003a), pero existen algunos grupos con alta divergencia generalmente causada por aislamiento geográfico, y en estos casos el COI puede haber variado lo suficiente no sólo para poder discriminar especies cercanamente relacionadas sino también grupos poblacionales dentro de una especie (Cox & Hebert, 2001; Wares & Cunningham, 2001).

El genoma mitocondrial de caracoles terrestres pertenecientes al orden Pulmonata, tiene como característica intrínseca una alta tasa de variación, lo cual podría aumentar la resolución en el reconocimiento mediante el código de barras de ADN utilizando un marcador mitocondrial, y hasta podría ser útil, si el tiempo de aislamiento geográfico es el suficiente, para reconocer poblaciones de una misma especie (Chiba *et al.*, 1999; Thomaz *et al.*, 1996; Pinceel *et al.*, 2005).

Existe un grupo grande de científicos en todo el mundo, muy interesado en resolver el problema taxonómico usando secuencias de ADN, tal es así que en el año 2004 se creó el Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL), que ha desarrollado un sistema de adquisición, almacenamiento, análisis y publicación de datos relacionados al código de barras de ADN, estableciendo la base de datos del *DNA barcode* (Ratnasingham & Herbert, 2007).

Por otra parte, las secuencias de varios marcadores de ADN mitocondrial se han convertido en la panacea de muchos investigadores, debido a sus cualidades, tales como alta tasa de mutación, herencia materna y carencia de recombinación, las cuales le otorgan la capacidad de resolver relaciones filogenéticas, descifrar la historia genético poblacional de las especies, así como la estructuración geográfica y genética de las poblaciones (Avice, 2000; Hugall *et al.*, 2002; Koblmüller *et al.*, 2006).

Los análisis de reconstrucción filogenética han sido realizados exitosamente con las secuencias del gen COI en moluscos. Así se puede citar a Holland y Hadfield, que en el año 2002, establecieron la filogenia de individuos pertenecientes a la familia Achatinellidae con propósitos de conservación. Rundell y sus colaboradores (2004) realizaron un estudio de varias especies de la familia Succineidae, especialmente localizadas en Hawaii y Asia, resolviendo sus relaciones evolutivas. En el 2006, Ketmaier y colaboradores realizaron un análisis filogenético exitoso del género *Solatopupa* (familia Chondrinidae), el cual no había podido ser resuelto mediante análisis morfológico ni del cariotipo. Siendo Succineidae y Chondrinidae familias pertenecientes al clado de los “no achatinoide” igual que Megalobulimidae, en la filogenia de los caracoles terrestres utilizando como marcadores a los genes ribosomales, subunidades 5.8S, 28S y la región espaciadora interna 2 (ITS2) (Wade *et*

al, 2001), por tanto son los dos estudios con especies evolutivamente más cercanas a las que son motivo de esta tesis.

Utilizando sólo caracteres morfológicos convencionales muchas veces es difícil reconocer individuos a nivel de especie, porque se puede hacer frente a especies crípticas, caracteres con plasticidad fenotípica o con variación sobrepuesta. Para superar estos inconvenientes, la filogenética molecular utilizando especialmente dos genes -16S rRNA y COI- han logrado agrupar y clasificar hasta nivel de especie a diferentes tipos de gastrópodos (Elejalde *et al.*, 2008; Donald *et al.*, 2005).

Dentro del plan estratégico del Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB) realizado en la ciudad de Río de Janeiro, Brasil, se enmarcan varios objetivos, siendo uno de los más importantes promover la conservación de la diversidad genética de la fauna silvestre y con potencial valor comercial, en donde también se encuentra involucrado el conocimiento ancestral de las comunidades nativas, que está dentro del área de protección de los componentes de la biodiversidad (CDB, 1992). El Perú, como país asistente, se comprometió a velar por la diversidad biológica, tal como lo indica el artículo 68 de la Constitución Política del Perú de 1993. Los científicos como parte del Estado tenemos la misión de materializar estas ideas para garantizar el crecimiento de nuestro país.

El incremento de la población humana y sus actividades ponen en riesgo la sobrevivencia de muchas especies. La conservación biológica de la mano con la genética de poblaciones, filogenética y filogeografía permiten conocer la historia evolutiva de las poblaciones, que van más allá de perfiles ecológicos y demográficos que sólo reflejan lo que sucede en un momento determinado (O'Brian, 1994).

La diversidad genética es uno de los factores más importantes en la salud de las poblaciones, ya que baja variabilidad reduce considerablemente su capacidad de adaptarse a los cambios. La primera investigación que publicó una baja diversidad genética fue realizada en 1974 por Bonnel y Selander, en alozimas del elefante marino *Mirounga angustirostris*, le siguieron trabajos que encontraron sólo dos haplotipos mitocondriales en 40 individuos de esa especie. Ello fue una consecuencia de un cuello de botella genético por la desmedida cacería sobre estos animales (Hoelzel *et al.*, 1993).

A nivel mundial existen muchas especies que se están extinguiendo, o peor aún, que ya están extintas, sin siquiera conocer de su existencia, ¿cómo poder protegerlas o utilizar los recursos de la grandiosa diversidad biológica, adecuadamente? La respuesta es obvia, si no se conocen no se pueden establecer programas de conservación, ni mucho menos diseñar planes de utilización sustentable de ellos.

Comprendiendo el problema es que se plantea una solución, que consiste en utilizar una secuencia de ADN como un código de barras genético para reconocer a una especie en particular, de forma fácil, rápida y económica. Más aún, los segmentos de ADN proveen información invaluable para resolver relaciones evolutivas y evaluar la diversidad genética, el grado de la variabilidad de la especie, lo cual otorga una visión del estado de la salud genético poblacional de estas taxa nunca antes estudiados a nivel molecular. Los resultados de esta tesis constituirán importantes elementos para la eventual certificación de estas especies en el creciente biocomercio peruano.

## **1.1 Objetivos**

### ***1.1.1 Objetivo General***

Desarrollar perfiles de ADN de los Megalobulimidae de San Martín que hagan posible su reconocimiento a nivel específico y estudiar su salud genético poblacional mediante la diversidad genética, todo ello para eventualmente certificar a estas especies en el biocomercio peruano.

### ***1.1.2 Objetivos específicos***

- Estandarizar la técnica de PCR para amplificar los genes COI y 16S rRNA de individuos de *Megalobulimus huascari*, *Megalobulimus popelairianus* y *Megalobulimus capillaceus* del Departamento de San Martín - Perú.
- Obtener secuencias de COI y 16S rRNA de individuos de la familia Megalobulimidae de la región en estudio.

- Determinar la diversidad y divergencia genética del COI y del 16S rRNA entre y dentro de *Megalobulimus huascari* y *Megalobulimus capillaceus*.
- Establecer las relaciones filogenéticas de las tres especies en estudio, conducentes a la obtención de perfiles de ADN, que funcionen como un código de barras, que permita su fehaciente diagnóstico.



## **2. Materiales y Métodos**

## 2.1. Área de estudio y material colectado

El área de colecta abarcó gran parte del Departamento de San Martín (Perú). Se puede citar a tres regiones ecogeográficas, bosque húmedo premontano transicional a bosque húmedo tropical (Saposa, Piscayacu y Pasarraya), bosque húmedo premontano (Lamas, Moyobamba y Rioja) y bosque seco tropical (Tarapoto, Juan Guerra y Caspizapa) (ONEERN, 1976; García-Villacorta, 2009).

Los bosques tropicales abarcan solamente poco menos del 10% del área terrestre, pero son el cofre del tesoro de gran parte de la biodiversidad mundial. América del Sur posee aproximadamente el 21% de los bosques secos tropicales y casi el 58% de los bosques tropicales húmedos del mundo. Lamentablemente los territorios que cubren estos ecosistemas están desapareciendo gradualmente (Mayaux *et al.*, 2005).

Los ecosistemas más golpeados por actividades humanas dentro de los bosques tropicales son los del tipo seco (Janzen, 1988). Los bosques secos de Tarapoto no escapan a esta lamentable situación, ya que se encuentran amenazados por la expansión agrícola y la deforestación (García-Villacorta, 2009).

Las muestras de *Megalobulimus capillaceus* fueron colectadas en enero y febrero de 2008 en las localidades de Tarapoto (Provincia de San Martín), Juan Guerra (Provincia de San Martín), Caspizapa (Provincia de Picota), Lamas (Provincia de Lamas), Moyobamba (Provincia de Moyobamba), Saposa (Provincia de Huallaga), Rioja (Provincia de Rioja) y Piscoyacu (Provincia de Huallaga) ubicadas en el Departamento de San Martín – Perú. Cabe resaltar que la mayoría de los individuos de esta especie fueron encontrados en huertos, es decir asociados a poblaciones humanas. Además, uno de los especímenes fue comprado en el mercado de abastos de Tarapoto.

Las muestras de *Megalobulimus huascari* fueron colectadas en septiembre de 2007, enero, febrero y marzo de 2008 en las localidades de Juan Guerra y Caspizapa. También fueron comprados en el mercado de abastos de Tarapoto (Departamento de San Martín – Perú).

Las muestras de *Megalobulimus popelairianus* fueron colectadas en febrero de 2008 en las localidades de Rioja, Saposoa (probablemente provenientes de Pasarraya – Alto Saposoa) y uno comprado en el mercado de Juanjui (provincia de Huallaga, Departamento de San Martín – Perú).

Los individuos colectados fueron fijados en alcohol al 96% y ahora forman parte de las colecciones científicas del Departamento de Malacología y Carcinología del Museo de Historia Natural de la UNMSM (MUSM), a cargo de la Dra. Rina Ramírez.

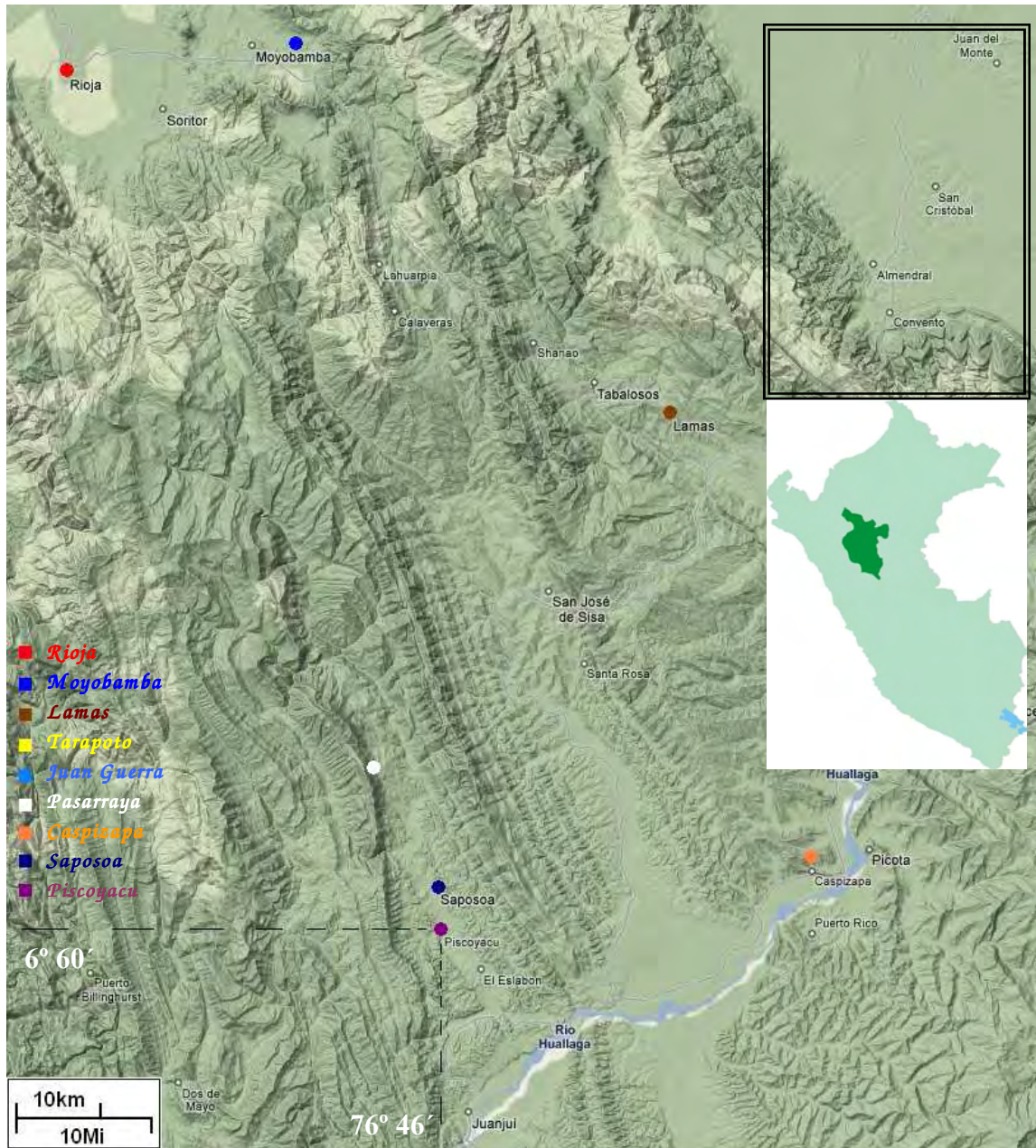
**Tabla 2.** Individuos colectados por especie y localidad indicando las coordenadas geográficas y colectores

Especie	Procedencia	Código	Coordenadas Geográficas	Colectores	Fecha
<i>M. capillaceus</i>	Moyobamba	16	S: 6° 02' 11,2'' O: 76° 38' 26,2''	Rina Ramírez y Carmen Calderón	01/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Juan Guerra	18	S: 6° 35' 20,6'' O: 76° 18' 41,2''	Rina y Francisco Ramírez	20/01/08
<i>M. capillaceus</i>	Juan Guerra	38	S: 6° 35' 2,4'' O: 76° 19' 11,8''	Rina Ramírez y Carmen Calderón	03/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Juan Guerra	21	S: 6° 35' 2,4'' O: 76° 19' 11,8''	Rina Ramírez y Carmen Calderón	03/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Juan Guerra	63	S: 6° 35' 3,7'' O: 76° 18' 41,2''	Rina Ramírez, Carmen Calderón y Rondal	28/01/08
<i>M. capillaceus</i>	Juan Guerra	65	S: 6° 35' 20,6'' O: 76° 18' 41,2''	Rina Ramírez y Carmen Calderón	28/01/08
<i>M. capillaceus</i>	Lamas	36	S: 6° 25' 19'' O: 76° 30' 44,5''	Carmen Calderón	07/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Mercado de Tarapoto	17	-	Rina y Francisco Ramírez	29/01/08
<i>M. capillaceus</i>	Tarapoto	19	S: 6° 28' 18'' O: 76° 22' 14,6''	Carmen Calderón	06/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Tarapoto	20	S: 6° 28' 18'' O: 76° 22' 14,6''	Rina Ramírez y Carmen Calderón	04/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Tarapoto	37	S: 6° 28' 18'' O: 76° 22' 14,6''	Carmen Calderón	06/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Tarapoto	39	S: 6° 28' 18'' O: 76° 22' 14,6''	Carmen Calderón	06/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Tarapoto	40	S: 6° 28' 18'' O: 76° 22' 14,6''	Carmen Calderón	06/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Rioja	22	S: 6° 04' 18,1'' O: 77° 09' 48,5''	Rina Ramírez y Carmen Calderón	02/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Caspizapa	27	S: 6° 57' 18,4'' O: 76° 25' 5,6''	Rina Ramírez y Carmen Calderón	05/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Caspizapa	28	S: 6° 57' 18,4'' O: 76° 25' 5,6''	Rina Ramírez y Carmen Calderón	05/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Caspizapa	29	S: 6° 57' 18,4'' O: 76° 25' 5,6''	Rina Ramírez y Carmen Calderón	05/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Piscoyacu	50	S: 6° 58' 50'' O: 76° 46' 12''	Rina Ramírez y Carmen Calderón	05/02/08
<i>M. capillaceus</i>	Saposoa	61	S: 6° 56' 21,8'' O: 76° 46' 18,8''	Rina Ramírez	06/02/08
<i>M. huascari</i>	Juan Guerra	4	No se tomaron las	Scila Reátegui	06/09/07

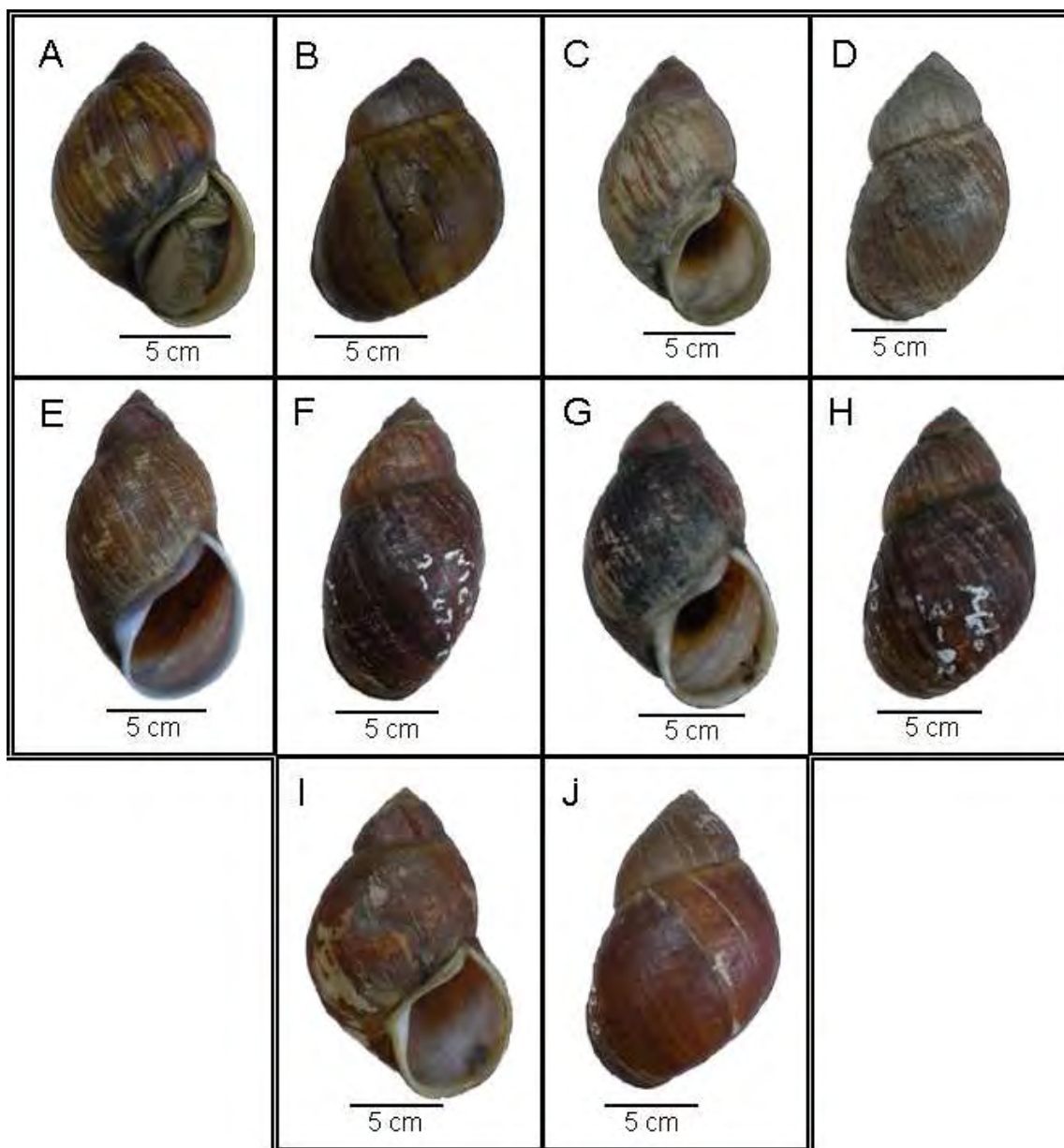
			coordenadas		
<i>M. huascari</i>	Juan Guerra	24	S: 6° 35' 20.6'' O: 76° 18' 41.2''	Rina Ramírez, Carmen Calderón y Rondal	28/01/08
<i>M. huascari</i>	Juan Guerra	25	S: 6° 35' 18.8'' O: 76° 18' 59''	Rina Ramírez, Carmen Calderón y Rondal	30/01/08
<i>M. huascari</i>	Juan Guerra	79	S: 6° 35' 7.7'' O: 76° 19' 18.4''	Victor Borda y Carmen Calderón	04/03/08
<i>M. huascari</i>	Juan Guerra	82	S: 6° 35' 7.7'' O: 76° 19' 18.4''	Victor Borda y Carmen Calderón	02/03/08
<i>M. huascari</i>	Juan Guerra	83	S: 6° 35' 7.7'' O: 76° 19' 18.4''	Victor Borda y Carmen Calderón	04/03/08
<i>M. aff. huascari</i>	Mercado de Tarapoto	90	-	Rina Ramírez y Carmen Calderón	03/02/08
<i>M. aff. huascari</i>	Mercado de Tarapoto	91	-	Rina Ramírez y Carmen Calderón	03/02/08
<i>M. aff. huascari</i>	Caspizapa	94	S: 6° 57' 24.8'' O: 76° 25' 4.0''	Alicia Flores	05/02/08
<i>M. popelairianus</i>	Rioja	67	S: 6° 4' 9'' O: 77° 10' 83''	Rina Ramírez y Carmen Calderón	01/02/08
<i>M. popelairianus</i>	Saposo-Chambira	95	S: 6° 56' O: 76° 47'	Rina Ramírez	06/02/08
<i>M. popelairianus</i>	Saposo-Pasarraya	93	S: 6° 46' O: 76° 49'	Rina Ramírez y Juan Renjifo	06/02/08
<i>M. aff. popelairianus</i>	Conseguido en Saposo, procedente del Mercado de Juanjui	78	-	Rina Ramírez	06/02/08

Los especímenes de *M. huascari* y *M. popelairianus* fueron difíciles de identificar a nivel específico con la taxonomía tradicional porque presentaron caracteres conchológicos sobrelapados, y en algunos casos sólo pudieron ser clasificados como “affinis” (figura 2). En adelante, cuando en el texto se coloque *Megalobulimus* spp. se referirá al conjunto de individuos cuya diagnosis a nivel de especie estuvo en duda utilizando caracteres morfológicos.

Los caracoles de la especie *M. capillaceus* no presentaron variación notoria en las características de sus conchas, excepto por un grupo de individuos colectados en Caspizapa (figura 3E, F), probablemente esta conchilla distinta no haya sido producto de cambios evolutivos, sino más bien de adaptaciones medioambientales o causadas por algún tipo de enfermedad.

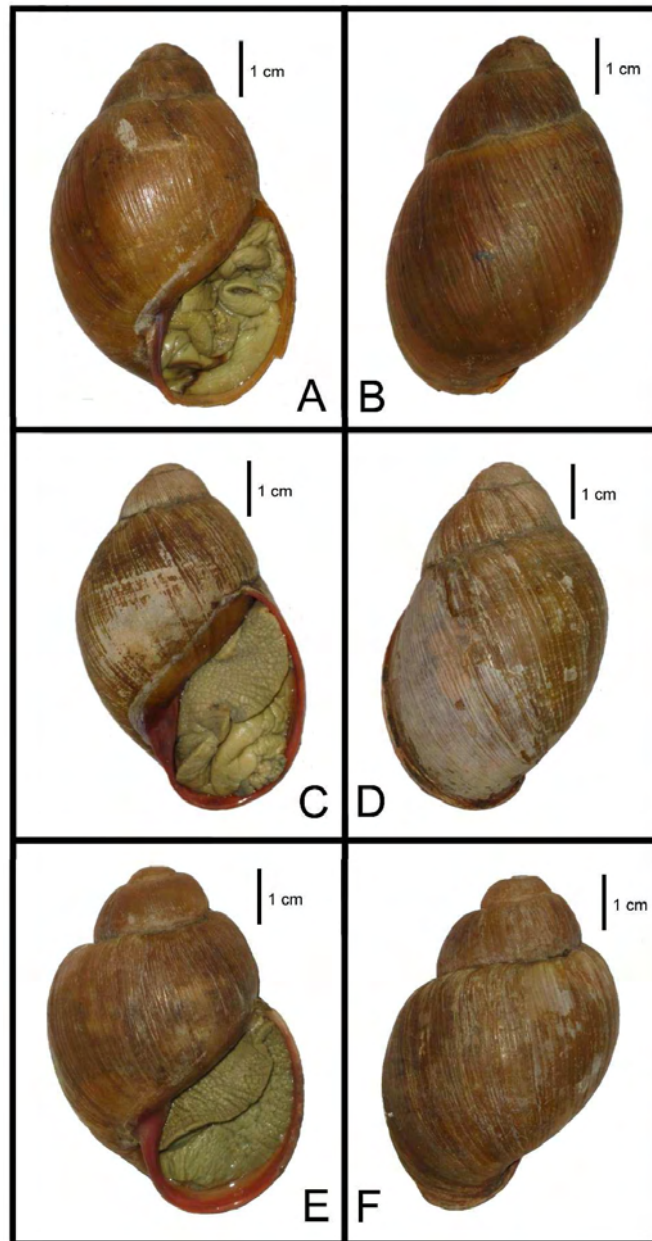


**Figura 1.** Mapa mostrando las localidades de colecta en el Departamento de San Martín. Modificado de Google Maps.



**Figura 2.** Vista frontal y dorsal de 5 individuos evaluados. A y B: *M. huascari* de Juan Guerra (código 82). C y D: *M. aff. huascari* de Caspizapa (código 94). E, F, G y H: *M. aff. huascari* del mercado de Tarapoto (códigos 90 y 91). I y J: *M. popelairianus* de Saposoa (código 93).





**Figura 3.** Vista frontal y dorsal de tres individuos de *M. capillaceus*. A y B: Lamas (código 36). C y D: Rioja (código 22). E y F: Caspizapa (código 27).

## **2.2. Preparación del material biológico**

Se extrajo entre 1 y 2 mm<sup>3</sup> de tejido muscular de pie, que fue cortado en trozos muy pequeños, para facilitar su posterior digestión. Se colocaron en tubos de 1,5 ml con agua bidestilada, para ser pasados por el proceso de extracción de ADN en un plazo no mayor a 3 días. Para conservarlos en plazos mayores de tiempo se dispusieron en tubos de 2 ml con alcohol al 96% hasta el momento de la extracción, en que fueron colocados en agua en tubos de 1,5 ml.

### **2.3. Extracción de ADN total**

Para la obtención de ADN total se utilizó la técnica del CTAB (Graham *et al.*, 1994) modificada por Ramírez (2004). Al tejido homogenizado se le agregó 300 µl de una solución de 100 mM de Tris-HCl a pH 8,0, 2% CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% PVP, 0,2% de β-mercaptoetanol y 0,05 mg de Proteinasa K, e inmediatamente se colocó en baño maría a 60°C hasta que se observó una solución homogénea (dos horas aproximadamente, el tiempo dependió del estado de la muestra, si ésta era de una colecta reciente el tiempo era menor). Seguidamente se incorporaron 310 µl de cloroformo - alcohol isoamílico (96:4) para la remoción de proteínas, seguido de una centrifugación a 13000 rpm por 15', rescatando la fase acuosa. Dicho procedimiento fue efectuado dos veces. A continuación se precipita el ADN con 600 µl de etanol absoluto frío y 25 µl de acetato de amonio 3 M (ambos aproximadamente a 5°C). Posteriormente fue centrifugado a 13000 rpm por 15'. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado en 1ml de alcohol al 96%, para luego ser centrifugado por segunda vez. Finalmente, el *pellet* fue secado a temperatura ambiente por 24 horas ó una hora en estufa a 37°C. Transcurrido el tiempo, se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada y se etiquetó adecuadamente. Las extracciones fueron mantenidas en refrigeración a -20°C.

### **2.4. Amplificación de los marcadores mitocondriales**

La amplificación fue llevada a cabo mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988), con *primers* internos del gen mitocondrial 16S rRNA, 16SF-104 (GACTGTGCTAAGGTAGCATAAT) y 16SR-472 (TCGTAGTCCAACATCGAGGTCA), diseñados exclusivamente para moluscos y que amplifican aproximadamente 330 pb (Ramírez, 2004). Las muestras con resultados positivos, luego fueron amplificadas con los iniciadores universales LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO 2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3') publicados por Folmer y colaboradores (1994), que amplifican 700 pb de la región del genoma mitocondrial correspondiente a un fragmento del gen Citocromo Oxidasa C subunidad I (COI).

La desventaja de usar el CTAB en el protocolo de extracción es que tiene el poder de degradar el material genético, por lo que algunas extracciones pueden resultar



con muy poca cantidad de ADN. Por ello, primero se amplificaba en un volumen final de 12,5  $\mu$ l y de resultar positivo, el volumen total era aumentado a 30  $\mu$ l para tener suficiente producto de amplificación para realizar su secuenciamiento.

#### 2.4.1. Amplificación del 16S rRNA

Cada tubo de reacción contenía 1X de buffer de la *Taq* ADN polimerasa, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, 0,2  $\mu$ M de cada *primer*, 0,5 unidades de *Taq* ADN polimerasa y de 1 a 3  $\mu$ l de ADN total para un volumen final de 12,5  $\mu$ l. Para 30  $\mu$ l de volumen final, se aumentaba a una unidad de *Taq* ADN polimerasa y de 3 a 6  $\mu$ l de ADN total. El control negativo fue obtenido incorporando agua bidestilada en vez del volumen correspondiente de ADN.

La amplificación se efectuó con una denaturación inicial de 96°C por 60", seguido de 35 ciclos: Denaturación a 94°C por 30", hibridación de los *primers* a 48°C por 30" y extensión a 72°C durante 60", finalizando con una extensión final 72°C por 60".

#### 2.4.2. Amplificación del COI

Los tubos de reacción fueron trabajados como anteriormente se menciona, con la diferencia que la concentración de cada primer fue de 0,3  $\mu$ M.

La amplificación del COI se llevó a cabo con una denaturación inicial de 96°C por 2', a continuación 35 ciclos: Denaturación a 94°C por 30", hibridación de los iniciadores a 45°C (algunas reacciones fueron a 48°C y otras a 50°C) por 30" y extensión a 72°C durante 60", terminando con una paso de extensión final a 72°C por 7'. La temperatura de *annealing* fue aumentada en las muestras que presentaron más de una banda.

Ambos protocolos ya habían sido probados exitosamente en varias especies de caracoles terrestres del Perú en nuestro laboratorio (Sistemática Molecular y Filogeografía).

## **2.5. Visualización del ADN por electroforesis**

Se realizó una corrida electroforética submarina en gel de agarosa al 0,8 % diluido en tampón de corrida (TBE) y utilizando 4,5 µl de la muestra amplificada mezclada con 1,5 µl de buffer de corrida (azul de bromofenol y xilen xianol) por 45 minutos a 100 voltios. Luego se procedió a la tinción con Bromuro de Etidio, y finalmente fueron observados y fotografiados con la ayuda de un transiluminador.

Los gels fueron cargados con muestras amplificadas, los controles negativos, un marcador de peso molecular GeneRuler 100bp ADN Ladder (Fermentas) y eventualmente con controles positivos, es decir, muestras que habían resultado positivas.

## **2.6. Purificación y secuenciamiento del ADN**

Al menos 20 µl de los productos de PCR positivos, por marcados y por muestra, fueron enviados a la compañía MACROGEN USA ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) para su secuenciamiento automático, previa purificación por perlas magnéticas.

## **2.7. Análisis in silico de las secuencias**

### **2.7.1. Edición de Secuencias**

Los electroferogramas, producto del secuenciamiento, fueron analizados con el programa Chromas (McCarthy, 1996). Las secuencias consenso, utilizando secuencias en formato FASTA, fueron obtenidas con ayuda del programa CAP3WIN (Huang & Madan, 1999), a partir del secuenciamiento de las dos hebras de la cadena de ADN.

Para garantizar que los resultados sean verídicos y no productos de amplificación de contaminantes con ADN de otros organismos, se realizó una comparación de cada una de las secuencias contra la base de datos del GenBank con la herramienta BLASTn (Altschul *et al.*, 1997) disponible en la *web* <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

### **2.7.2. Outgroup**

Para realizar las filogenias se eligió al género *Natalina* como extragrupo, porque pertenece a la familia Rhytididae. Ésta, en un análisis filogenético de los caracoles terrestres, se encuentra en un cluster con varias familias, una de ellas Megalobulimidae, pero que a su vez, los separa del resto de los taxa (Wade *et al.*, 2001; Wade *et al.*, 2006).

Las secuencias de los genes COI y 16S rRNA fueron extraídas del Genbank, luego de hacer una búsqueda exhaustiva teniendo en cuenta que el tamaño de las mismas no debía ser menor que el obtenido en este estudio y que ambos marcadores correspondieran al mismo individuo. Así, se utilizaron secuencias de *Natalina kraussi* y *Natalina beyrichi* (un espécimen por especie) del trabajo de Moussalli *et al.* (2009), pero lamentablemente tenían un menor tamaño en la región 5' del COI, por lo que se realizaron algunos análisis sin los dos taxa del extragrupo.

### 2.7.3. Alineamiento

Se trabajaron con 17 *sets* de datos, ocho para el COI y ocho para el 16S rRNA y uno con los dos marcadores (incluyendo los taxa extragrupos).

Para el gen COI se elaboró un alineamiento múltiple con los extragrupos, para la caracterización de los segmentos genómicos. El segundo sin los grupos externos, para los análisis de distancias genéticas. El tercero sólo con *M. popelairianus*, *M. huascari* y *Megalobulimus* spp. sin el individuo número 91, para realizar el *network*. El cuarto y el quinto con los individuos de *M. huascari*, y otro incluyendo a los de *Megalobulimus* spp. (sin tomar en cuenta al espécimen con código 91) para determinar los índices moleculares. El sexto y el séptimo conteniendo todos los haplotipos y el otro sin *M. aff. huascari* con código 91, ambos para el análisis filogenético. El octavo con todos los haplotipos, para la reconstrucción filogenética. El último, con los haplotipos sin los taxa externos, para el análisis de distancias UPGMA.

Para el gen 16S rRNA se preparó un alineamiento múltiple con todas las secuencias, para la caracterización molecular. El segundo sin los grupos externos, para determinar las distancias genéticas. El tercero con las secuencias de *M. popelairianus*,

*M. huascari* y *Megalobulimus* spp. sin incluir al individuo número 91, para elaborar el *network* de haplotipos. El cuarto y el quinto con los individuos *M. huascari* y agregando a los *Megalobulimus* spp. (excluyendo a *M. aff. huascari* con código 91), los cuales se usaron para calcular los índices moleculares. El sexto y el séptimo conteniendo todos los haplotipos y el otro sin *M. aff. huascari* con código 91, ambos para el análisis filogenético. El octavo con los haplotipos sin los del género *Natalina*, para realizar el UPGMA.

Las secuencias fueron alineadas con el programa ClustalX 2 (Larkin *et al.*, 2007), con excepción de los datos combinados que fueron el resultado de juntar en un archivo de texto los dos alineamientos con presencia de los extragrupos uno a continuación del otro como si se tratara de un solo marcador, en este caso se tuvieron en cuenta los individuos con los dos genes secuenciados. Los alineamientos múltiples de las secuencias fueron analizados con el programa Bioedit (Hall, 1999).

#### 2.7.4. Caracterización de las dos regiones del genoma mitocondrial y calidad de los datos.

Para la caracterización molecular se determinó la cantidad de cada una de las bases, la frecuencia, la abundancia relativa de las islas CpG. Para evaluar la calidad de las secuencias se graficó la distribución de las transiciones y transversiones contra la distancia genética con el modelo de sustitución nucleotídica *Kimura 2 parameters* (K2p), todo ello con ayuda del programa DAMBE (Xia & Xie, 2001).

#### 2.7.5. Índices Moleculares

La diversidad genética en las especies *M. huascari*, *M. capillaceus* y del grupo *M. huascari* y *Megalobulimus* spp. (sin la secuencia número 91) fue estimada en base a varios índices. Los valores de diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), valor del parámetro theta ( $\theta$ ) determinado en base al número de sitios segregantes (S), el promedio de diferencias de la comparación a pares de los haplotipos (K), fueron obtenidos con los programas DnaSP (Rozas *et al.*, 2003) y Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005).

### 2.7.6. Distancias Genéticas

Se realizó la comparación a pares de los haplotipos y de los individuos agrupados por especie para cada marcador genético. Como se mencionó anteriormente, los individuos cuyas identificaciones específicas se tenía en duda, fueron separados en el grupo llamado *Megalobulimus* spp. (Mspp.)

Las distancias genéticas fueron determinadas usando el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) eligiendo la opción de comparación a pares, es decir entre grupos y si el número muestral lo permitía, también se determinó las distancias dentro de los grupos (sólo para las secuencias agrupadas por especie). Siempre se escogió el modelo de sustitución nucleotídica K2p.

También se construyó un dendograma de similitud de las distancias genéticas de los haplotipos por cada gen con el método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

### 2.7.7. Reconstrucción filogenética

Los análisis filogenéticos se realizaron en base a cuatro metodologías diferentes. La construcción filogenética usando el método de distancia Neighbor Joining (NJ) en el programa MEGA 4, los métodos de Máxima Parsimonia (MP) y Máxima Verosimilitud (ML) fueron realizados usando el programa PAUP\* (Swofford, 1998) y para la Inferencia Bayesiana (BI) se usó el programa Mr. Bayes 3.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

Los modelos de sustitución nucleotídica fueron escogidos en base a la comparación de los logaritmos de las tasas de verosimilitud (*Hierarchical Likelihood Ratio Tests*) por el programa Model Test 3.7 (Posada & Crandall, 1998), en el caso de utilizar el PAUP, y el Mr. Model Test (Nylander, 2004) cuando se usó el programa Mr. Bayes.

Se utilizó el criterio de verosimilitud en el caso del ML, con el cual se realiza una comparación estadística bastante robusta entre los modelos de sustitución

nucleotídica escogidos de a pares, teniendo en cuenta un árbol filogenético inicial (Sullivan & Joyce, 2005). Por otro lado, la inferencia bayesiana tiene la desventaja de sobreestimar los valores de probabilidad posterior (Simmons *et al.*, 2004) y para evitar ello se debe utilizar modelos lo más complejos posibles (Huelsenbeck & Rannala, 2004), tal es así que se escogió el modelo obtenido por el criterio de verosimilitud, ya que tiende a seleccionar modelos más complicados que el criterio de Akaike.

Sin embargo, el Mr. Bayes tiene la particularidad de poder utilizar el modelo elegido para cada gen por separado para hacer el análisis bayesiano en un *set* de datos concatenado (trabaja con cada partición independientemente). Por ello es que el modelo de sustitución elegido para hacer el análisis de ambos genes fue el que resultó de cada marcador por separado.

Debido a la presencia de *gaps* en el alineamiento del gen 16S rRNA se realizaron dos reconstrucciones filogenéticas. En el caso de tomarlos en cuenta, su utilización fue como si se tratara de otro carácter (quinto estado) utilizando las opción *gapmode=newstate* en el PAUP, realizando el análisis de parsimonia, y para el NJ se escogió la opción *Pairwise deletion* en el programa MEGA. En el caso de no usarlos, se les dio el valor de datos imposibles de determinar activando la opciones *Complete deletion* en MEGA y *gapmode=missing* en el PAUP, para las metodologías NJ y MP, respectivamente.

La BI y ML tienen la desventaja de reconocer a los *gaps* como *missing data*, es decir datos inútiles, por lo que sólo se obtuvo un árbol filogenético para cada *set* de datos analizados con estas metodologías.

Se realizaron dos inferencias filogenéticas con BI y ML, una con todos los haplotipos y otra sin el Maffhua2.

Con la finalidad de determinar si los dos marcadores tenían la misma señal filogenética, antes de realizar la reconstrucción filogenética con los datos combinados, se realizó la prueba de homogeneidad (*Homogeneity Test*) desarrollada por Farris *et al.* (1994) en el programa PAUP, con el algoritmo de búsqueda *branch-and-bound* y un remuestreo de 1000 con el criterio de parsimonia.

#### 2.7.7.1. Método de distancia

Se reconstruyeron los árboles filogenéticos para los dos genes con grupos externos con el método *Neighbor-Joining* (NJ) en el MEGA con el modelo de sustitución nucleotídica *Kimura 2 parameters* y un patrón homogéneo entre los linajes e indicando el valor de parámetro alfa de la distribución gamma obtenido por el programa Model Test. Para determinar estadísticamente la consistencia de los nodos se realizó una prueba no paramétrica de *Bootstrap* con 1000 réplicas.

#### 2.7.7.2. Método de Máxima Parsimonia

Los alineamientos con los dos marcadores moleculares, incluyendo los extragrupos, fueron utilizados para este análisis que fue implementado en PAUP, en el que se especificó un algoritmo de búsqueda heurística con el árbol inicial obtenido por *stepwise addition* y también se usó el algoritmo de *Tree-Bisection-Reconnection* (TBR) para el *Branch-swapping*. Se usó con mil repeticiones de *Bootstrap* para determinar el sustento de los nodos.

#### 2.7.7.3. Método de Máxima Verosimilitud

El análisis de Máxima Verosimilitud en PAUP se realizó con un algoritmo de búsqueda heurística obteniéndose el árbol filogenético inicial por *stepwise addition* para luego realizar la adición de las secuencias por AS-IS con un número de repeticiones de 5. El algoritmo de *Tree-Bisection-Reconnection* (TBR) fue usado para el *Branch-swapping*. Para determinar el sustento de cada nodo se utilizó un *Bootstrap* de 1000 réplicas.

#### 2.7.7.4. Método de Inferencia Bayesiana

Para el análisis bayesiano se usaron 2 000 000 de generaciones de cuatro Cadenas de Markov-Monte Carlo (MCMC) con un muestreo cada 100 generaciones, con dos repeticiones independientes. Para el cálculo de las probabilidades posteriores de los árboles, se usó un *burn-in* (número de árboles no considerados para el análisis) de 5000, equivalente al 25% de los árboles muestreados.

### 2.7.8. Análisis de Network

Se efectuó un *network* por cada gen con los alineamientos conteniendo solamente a *M. huascari* y *M. popelairianus*, ambos realizados con el método de *Median Joining* en el programa Network 4.5.1 (Bandelt *et al.*, 1999) que no toma en cuenta los *gaps*.

### 2.7.9. Barcode

Los perfiles de ADN deben ser únicos para cada especie y cumplir algunos requisitos previos, tales como: los haplotipos de la especie con la región genómica a evaluar deben resultar en una monofilia y tener una distancia genética intraespecífica menor al 2% (Hebert *et al.*, 2004).

De cumplir los requerimientos anteriores, los perfiles COI obtenidos a partir de las secuencias nucleotídicas serán confrontados contra las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con ayuda de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y del Barcode of Life Data Systems (BOLD) (<http://www.barcodinglife.org/>).

Una vez que han cumplido los requisitos previos, para que los perfiles COI puedan entrar en el BOLD y sean validados como *barcode*, se debe introducir por lo menos tres secuencias de ADN por especie. Además, es indispensable contar con los datos de la especie, las coordenadas de la localidad de procedencia, lugar de conservación, institución que realiza la investigación, fragmentos de COI mayores a 500 pb y verificar que los *primers* utilizados estén aprobados por esta base de datos (Ratnasingham & Hebert, 2007).

Una vez introducidas en la base de datos, éstas son analizadas para lograr su identificación mediante las herramientas básicas *Full Database* y *Species Database*. A continuación se presenta un resumen de cada base de datos con los datos actualizados a la fecha de 17 de diciembre de 2009.



Al elegir la opción *Full Database*, realiza una comparación contra la base de datos denominada *All Barcode Records* que presenta 714 208 secuencias de COI de por lo menos 500 pb no validadas e incluye datos moleculares de individuos sin identificación a nivel de especie.

La opción *Species Database*, ejecuta una pesquisa en la base de datos llamada *Species Level Barcode*, la cual posee 729 255 secuencias del COI de por lo menos 500 pb para 67 914 especies y 25 554 especies cuya identificación específica aún se mantiene como interrogante.

También se construyó un árbol filogenético con el método de NJ y el modelo de sustitución nucleotídica de K2p de la secuencia problema con las 100 secuencias de COI encontradas en la base de datos que posean mayor grado de similitud a ésta.

### **3. Resultados**

### 3.1. Extracciones de ADN total

En total se logró extraer ADN geonómico exitosamente (considerando como extracción exitosa las que amplificaron por lo menos el 16S rRNA) a 63 individuos, con un porcentaje de éxito de 91,3% (tablas 3, 4 y 5).

### 3.2. Amplificación de los genes

El 73,44% de las extracciones positivas, dieron resultados satisfactorios para el gen COI. De éstos se obtuvo doble o triple banda a una temperatura de *annealing* de 45°C en 21 muestras, todas ellas pertenecientes a *M. capillaceus*. Ninguna dio resultado satisfactorio a 48°C de *annealing*, pero sí a 50°C. Es por ello que son consideradas dentro de las amplificaciones exitosas para el COI, a pesar de que en una primera oportunidad presentaron bandas inespecíficas (tablas 3, 4 y 5).

**Tabla 3.** Número y porcentaje de éxito de las extracciones y pruebas de PCR para la especie *M. capillaceus*

Localidad	Extracciones	Amplificaciones			
		16S rRNA	COI		
		48°C <sup>1</sup>	45°C <sup>1</sup>	50°C <sup>1</sup>	Doble Banda
Tarapoto	7	7	2	3	60%
Tarapoto Mercado	1	1	1	0	0%
Juan Guerra	8	8	2	4	66,67%
Caspizapa	5	5	2	3	60%
Lamas	6	6	3	0	0%
Moyobamba	10	10	3	4	51,14%
Saposo	1	1	1	0	0%
Rioja	4	4	2	1	33,33%
Piscoyacu	9	8	0	6	100%
<b>Porcentaje</b>		98% <sup>2</sup>	74% <sup>3</sup>		56,76% <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Temperaturas de *annealing* en cada prueba de PCR.

<sup>2</sup> <sup>3</sup> Porcentaje de éxito para los marcadores 16S rRNA y COI.

<sup>4</sup> Porcentaje de amplificados del gen COI a 45°C con ocurrencia de doble banda.

**Tabla 4.** Número y porcentaje de éxito de las extracciones y pruebas de PCR para las especies *M. huascari* y *M. aff. huascari*

Localidad	Extracciones	Amplificaciones			
		16S rRNA	COI		
		48°C <sup>1</sup>	45°C <sup>1</sup>	50°C <sup>1</sup>	Doble Banda
Juan Guerra	7	6	5	0	0%
Tarapoto Mercado	2	2	2	0	0%
Caspizapa	2	2	1	0	0%
<b>Porcentaje</b>		90,91% <sup>2</sup>	80% <sup>3</sup>		0% <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Temperaturas de *annealing* en cada prueba de PCR.

<sup>2, 3</sup> Porcentaje de éxito para los marcadores 16S rRNA y COI.

<sup>4</sup> Porcentaje de amplificados del gen COI a 45°C con ocurrencia de doble banda.

**Tabla 5.** Número y porcentaje de éxito de las extracciones y pruebas de PCR para las especies *M. popelairianus* y *M. aff. popelairianus*

Localidad	Extracciones	Amplificaciones			
		16S rRNA	COI		
		48°C <sup>1</sup>	45°C <sup>1</sup>	50°C <sup>1</sup>	Doble Banda
Rioja	2	1	1	0	0%
Saposa	5	2	0	0	0%
Mercado de Juanjui	1	1	1	0	0%
<b>Porcentaje</b>		50% <sup>2</sup>	50% <sup>3</sup>		0% <sup>4</sup>

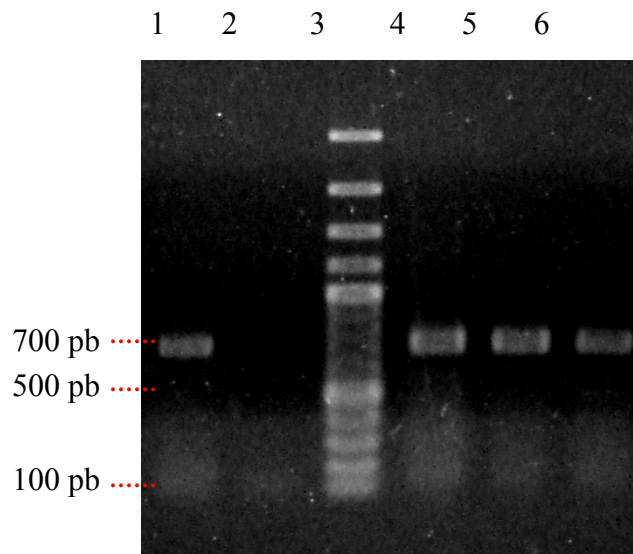
<sup>1</sup> Temperaturas de *annealing* en cada prueba de PCR.

<sup>2, 3</sup> Porcentaje de éxito para los marcadores 16S rRNA y COI.

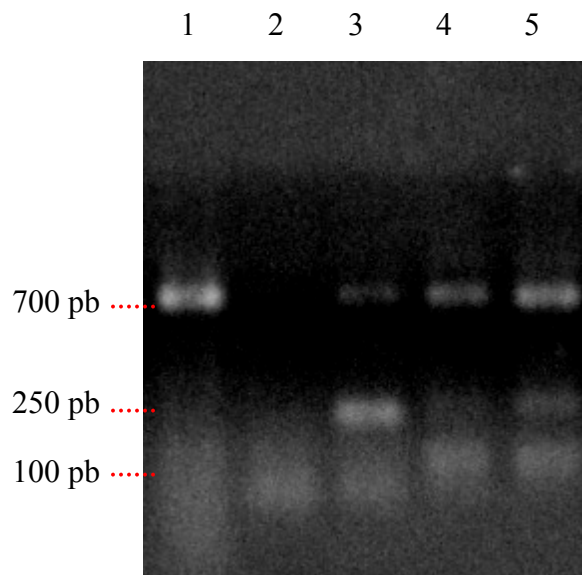
<sup>4</sup> Porcentaje de amplificados del gen COI a 45°C con ocurrencia de doble banda.

La visualización de las amplificaciones del gen COI y su comparación con un marcador de peso molecular, dieron como resultado bandas de aproximadamente 700 pb (figura 4). En algunas amplificaciones de este marcador en individuos de *M. capillaceus* se tuvo la ocurrencia de más de una banda (figura 5; tabla 3).

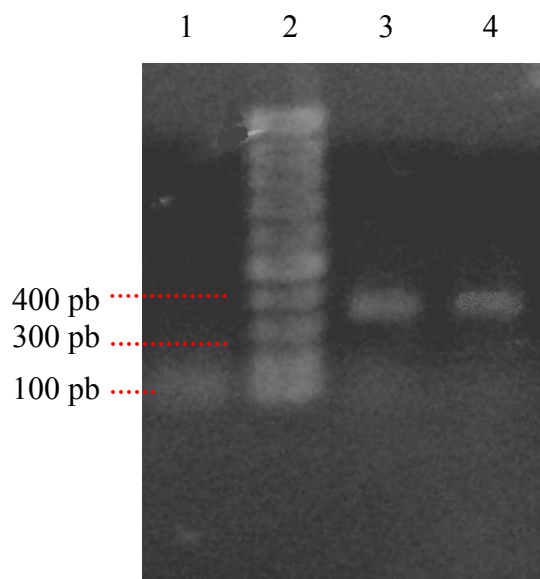
Para los productos de PCR del gen 16S rRNA, se obtuvo una banda de una longitud mayor a 300 pb y no se presentaron muestras con bandas inespecíficas en ninguna de las especies en evaluación (figuras 6 y 7).



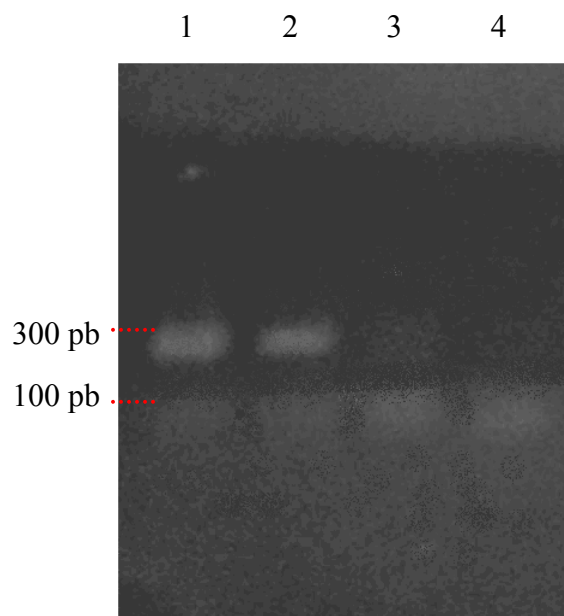
**Figura 4.** PCR de COI de *M. capillaceus*, carriles 2 y 3 son blanco negativo y marcador de peso molecular respectivamente, en 1, 4, 5, 6 se observa una banda de aproximadamente 700pb.



**Figura 5.** PCR de COI, carriles 1 y 2 son blancos positivo (perteneciente a *M. huascari*) y negativo respectivamente, en los carriles 3, 4 y 5 se aprecian dobles bandas (*M. capillaceus*).



**Figura 6.** PCR de 16S rRNA, carriles 1 y 2 son blanco negativo y marcador de peso molecular respectivamente, en los carriles 3 y 4 se aprecian resultados positivos de individuos de la especie *M. huascari* con un tamaño superior a 300 pares de bases.



**Figura 7.** PCR de 16S rRNA, carriles 1 y 2 son resultados positivos de especímenes de *M. capillaceus*, 3 y 4 resultado negativo pero con presencia de ADN de *M. popelairianus* y blanco negativo, respectivamente.

### 3.4. Secuenciamiento

Para *M. capillaceus*, *M. huascari* y *M. popelairianus* se obtuvieron 54 secuencias de 32 individuos tomando en cuenta ambos marcadores, pero sólo para 22 de ellos se obtuvieron las secuencias de los dos genes (Tabla 6).

**Tabla 6.** Individuos ordenados por especie y código que fueron utilizados para este estudio. Se indican los genes secuenciados para cada uno

Especie	Código	16S rRNA	COI
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	16	X	X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	18	X	
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	38	X	X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	21	X	X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	63	X	X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	65	X	X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	36	X	X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	17	X	X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	19	X	X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	20	X	
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	37		X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	39		X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	40		X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	22	X	X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	27		X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	28		X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	29	X	X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	50	X	X
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	61	X	X
<i>Megalobulimus huascari</i>	4	X	
<i>Megalobulimus huascari</i>	24	X	X
<i>Megalobulimus huascari</i>	25	X	X
<i>Megalobulimus huascari</i>	79	X	X
<i>Megalobulimus huascari</i>	82	X	X
<i>Megalobulimus huascari</i>	83	X	X
<i>Megalobulimus</i> aff. <i>huascari</i>	90	X	X
<i>Megalobulimus</i> aff. <i>huascari</i>	91	X	X
<i>Megalobulimus</i> aff. <i>huascari</i>	94	X	X
<i>Megalobulimus popelairianus</i>	67	X	X
<i>Megalobulimus popelairianus</i>	95	X	
<i>Megalobulimus popelairianus</i>	93	X	
<i>Megalobulimus</i> aff. <i>popelairianus</i>	78	X	X
<i>Natalina beyrichi</i> *	-	FJ262179	FJ262245
<i>Natalina kraussi</i> *	-	FJ262234	FJ262300

\*En las casillas donde se indican los marcadores se han colocado los números de accesoión de las secuencias depositadas en el Genbank por Moussalli *et al.* (2009).

### 3.5. Análisis in silico de las secuencias de ADN

#### 3.5.1. Gen COI

##### 3.5.1.1. Caracterización de las secuencias

Para el marcador COI, el tamaño del alineamiento de las secuencias obtenidas experimentalmente fue de 706 pb sin presencia de *gaps* (*Indels* o inserciones-delecciones). La variación está distribuida homogéneamente a lo largo de las secuencias excepto en las regiones 5' y 3' terminales que fueron muy conservadas. Como era de esperarse para un marcador codificante, las mutaciones se dieron en su gran mayoría en la tercera posición de los codones. Por el contrario, el alineamiento con los grupos externos fue de 667 pb, porque las secuencias obtenidas del GenBank fueron más cortas en el extremo 5' y tampoco presentó *gaps*.

**Tabla 7.** Nominación de los haplotipos encontrados para el gen COI por individuo

Especie	Procedencia	Código	Haplotipos
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Moyobamba	16	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Juan Guerra	38	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Juan Guerra	21	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Juan Guerra	63	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Juan Guerra	65	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Lamas	36	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Mercado de Tarapoto	17	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Tarapoto	19	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Tarapoto	37	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Tarapoto	39	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Tarapoto	40	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Rioja	22	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Caspizapa	27	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Caspizapa	28	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Caspizapa	29	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Piscoyacu	50	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Saposa	61	Mcap
<i>Megalobulimus huascari</i>	Juan Guerra	24	Mhua1
<i>Megalobulimus huascari</i>	Juan Guerra	25	Mhua2
<i>Megalobulimus huascari</i>	Juan Guerra	79	Mhua3
<i>Megalobulimus huascari</i>	Juan Guerra	82	Mhua4
<i>Megalobulimus huascari</i>	Juan Guerra	83	Mhua4
<i>Megalobulimus</i> aff. <i>huascari</i>	Mercado de Tarapoto	90	Maffhua1
<i>Megalobulimus</i> aff. <i>huascari</i>	Mercado de Tarapoto	91	Maffhua2
<i>Megalobulimus</i> aff. <i>huascari</i>	Caspizapa	94	Maffhua3
<i>Megalobulimus popelairianus</i>	Rioja	67	Mpop1
<i>Megalobulimus</i> aff. <i>popelairianus</i>	Mercado de Juanjui	78	Maffhua1
<i>Natalina beyrichi</i>	-	-	Nbey
<i>Natalina kraussi</i>	-	-	Nkra



Los datos colapsaron en nueve secuencias distintas (haplotipos) con sólo una secuencia para todos los individuos de *M. capillaceus*, a pesar de tener mayor número de individuos secuenciados (tabla 7).

En el alineamiento con los taxa del grupo externo se encontraron 453 sitios conservados y 214 variables, de los cuales 155 son parsimoniosamente informativos y el resto son mutaciones puntuales en un haplotipo (*singletons*). Aproximadamente el 80% de las posiciones variables tuvieron lugar en la tercera posición del codón

### 3.5.1.2. Caracterización de la región del COI del genoma mitocondrial y calidad de los datos

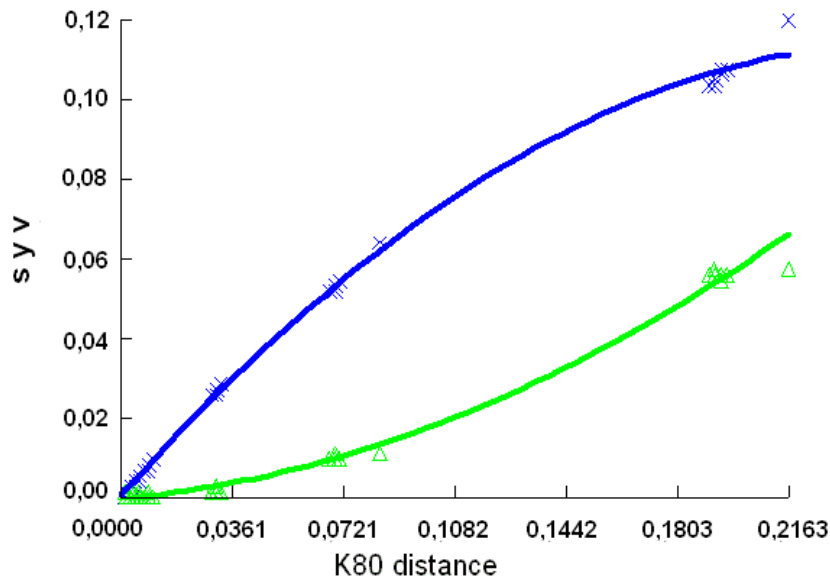
La familia Megalobulimidae presentó en promedio 62,8% de adeninas y timinas, mientras que los taxa del extragrupo tuvieron 68,64% para el gen COI. Por otra parte la abundancia de las islas CpG es aproximadamente 10% mayor en el haplotipo Maffhua2 (tabla 8).

**Tabla 8.** Cantidad, frecuencia de las bases nucleotídicas y abundancia relativa de las islas CpG para los haplotipos de *M. capillaceus*, *M. huascari*, *M. popelairianus*, *N. beyrichi* y *N. kraussi* con el marcador COI

Haplotipo	Valor Absoluto				Frecuencia				AR
	A	C	G	T	A	C	G	T	CpG
Mcap	171	113	147	275	0,2422	0,1601	0,2082	0,3895	0,5431
Mhua1	171	113	140	282	0,2422	0,1601	0,1983	0,3994	0,5294
Mhua3	171	114	140	281	0,2422	0,1615	0,1983	0,3980	0,5690
Maffhua3	171	112	141	282	0,2422	0,1586	0,1997	0,3994	0,5294
Mhua4	170	112	141	283	0,2408	0,1586	0,1997	0,4008	0,5294
Maffhua1	169	113	142	282	0,2394	0,1601	0,2011	0,3994	0,5212
Mhua2	169	116	142	279	0,2394	0,1643	0,2011	0,3952	0,5515
Mpop1	171	115	139	281	0,2422	0,1629	0,1969	0,3980	0,5253
Maffhua2	160	135	148	263	0,2266	0,1912	0,2096	0,3725	0,6347
Nbey*	184	85	122	276	0,2759	0,1274	0,1829	0,4138	0,5604
Nkra*	164	85	125	293	0,2459	0,1274	0,1874	0,4393	0,5445

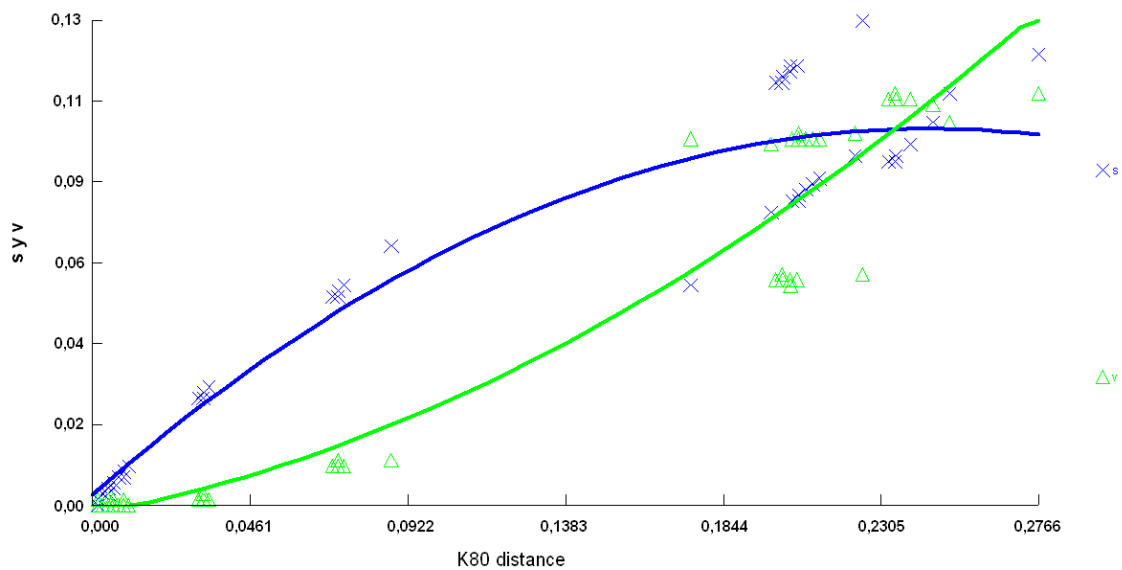
\*Las secuencias tuvieron sólo 667 pb.

La distribución de las transiciones y transversiones con respecto a las distancias genéticas dio como resultado la ausencia de saturación en las secuencias alineadas sin los taxa del grupo externo (figura 8).

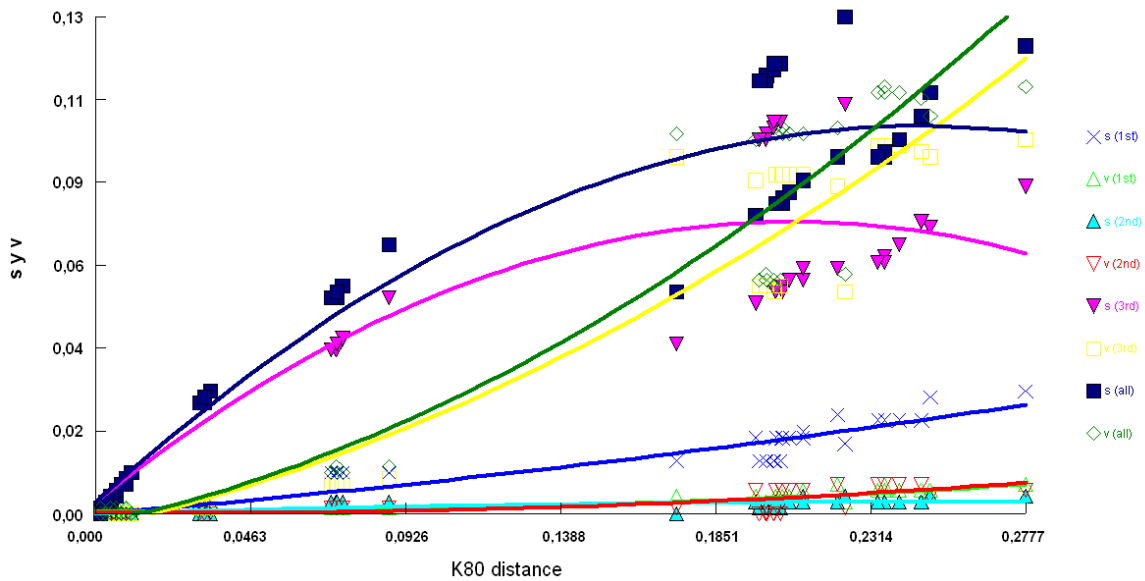


**Figura 8.** Transiciones y transversiones comparadas con la distancia genética con el modelo de sustitución nucleotídica K80 (K2p) del alineamiento del gen COI de las especies del género *Megalobulimus* sin los taxa del grupo externo. “s”: transiciones; “v”: transversiones.

Por otro lado, cuando se incluyeron las dos secuencias de los taxa del grupo externo, se presentó el *plateau* (meseta) que en la gráfica de las transiciones y transversiones indica un nivel de saturación moderado en las transiciones. Asimismo, al realizar este análisis por cada posición de los codones se determina que las transiciones de la tercera posición son las que presentan mayor saturación (figuras 9 y 10).



**Figura 9.** Transiciones y transversiones comparadas con la distancia genética con el modelo de sustitución nucleotídica K80 (K2p) del gen COI de las especies del género *Megalobulimus* y grupos externos. “s”: transiciones; “v”: transversiones.



**Figura 10.** Transiciones y transversiones comparadas con la distancia genética de cada una de las posiciones nucleotídicas de los codones con el modelo de sustitución nucleotídica K80 (K2p) del gen COI de las especies del género *Megalobulimus* y grupos externos. Donde, “s”: transiciones; “v”: transversiones. 1st, 2nd, 3rd simbolizan primera, segunda, tercera posición de los codones y *all*, las tres posiciones juntas.

Las tendencias de las gráficas anteriores no se alteran si son realizadas con el *set* de datos sin la secuencia del haplotipo Maffhua2 (resultados no mostrados).

### 3.5.1.3. Distancia Genética

Se observó que el haplotipo Maffhua2, tiene una alta divergencia con los *M. huascari* y el *M. popelairianus*. Además, el resto-cuya identificación se tenía en duda-presenta una muy baja distancia con respecto a la especie *M. huascari* (tablas 9 y 10).

Se formó un grupo con todas las secuencias de *M. popelairianus*, *M. huascari* y las de los individuos sin identificación específica, con excepción de Maffhua2. Resultó que la distancia genética dentro de este grupo con el modelo de sustitución nucleotídica de K2p fue muy baja e igual a 0,0104 (figura 11).

**Tabla 9.** Distancias entre los pares de haplotipos del COI, siguiendo el modelo de sustitución nucleotídica K2p para taxa de *Megalobulimus*

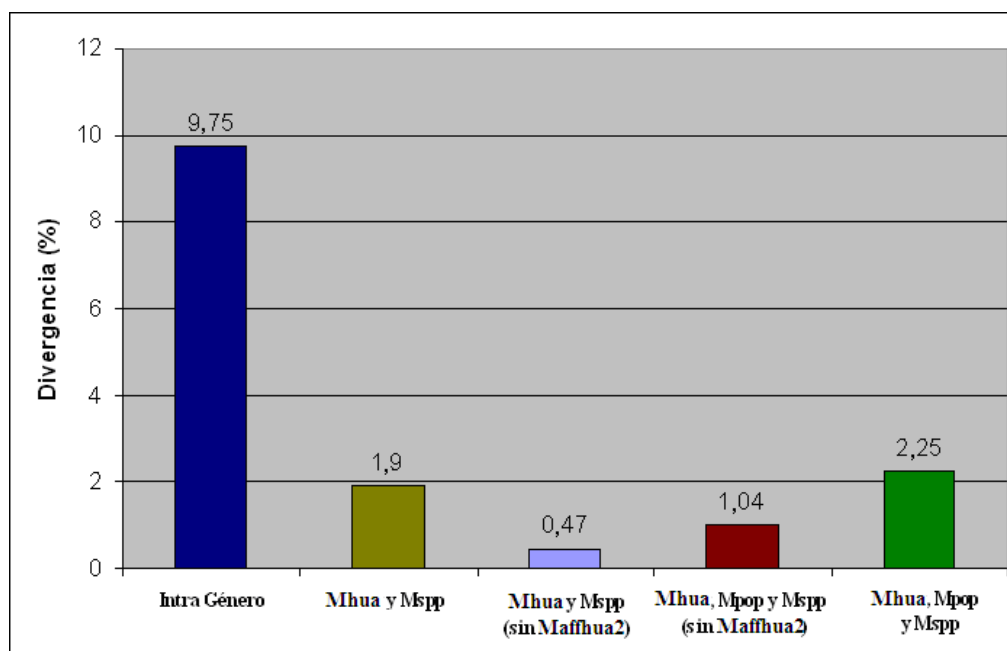
Haplotipos	Mhua 4	Maffhua 3	Maffhua 1	Mhua 1	Mhua 3	Mhua 2	Mpop 1	Maffhua 2	Mcap
Mhua4									
Maffhua3	0,0014								
Maffhua1	0,0028	0,0043							
Mhua1	0,0028	0,0043	0,0057						
Mhua3	0,0043	0,0057	0,0071	0,0014					
Mhua2	0,0071	0,0086	0,0100	0,0071	0,0086				
Mpop1	0,0291	0,0306	0,0321	0,0291	0,0306	0,0306			
Maffhua2	0,0675	0,0691	0,0708	0,0675	0,0691	0,0691	0,0838		
Mcap	0,1905	0,1923	0,1944	0,1905	0,1925	0,1964	0,1946	0,2163	

\* Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus*.

**Tabla 10.** Distancias inter e intraespecíficas de *M. capillaceus*, *Megalobulimus* spp., *M. popelairianus*, *N. beyrich* y *N. kraussi* con el gen COI con el modelo K2p

Taxa	Mcap	Mhua	Msp	Mpop	Nbey	Nora
Mcap	0,0000					
Mhua	0,2013	0,0048				
Msp	0,2085	0,0218	0,0379			
Mpop	0,2040	0,0315	0,0470	-		
Nbey	0,2104	0,2064	0,2184	0,1984	-	
Nkra	0,2228	0,2441	0,2343	0,2456	0,1748	-

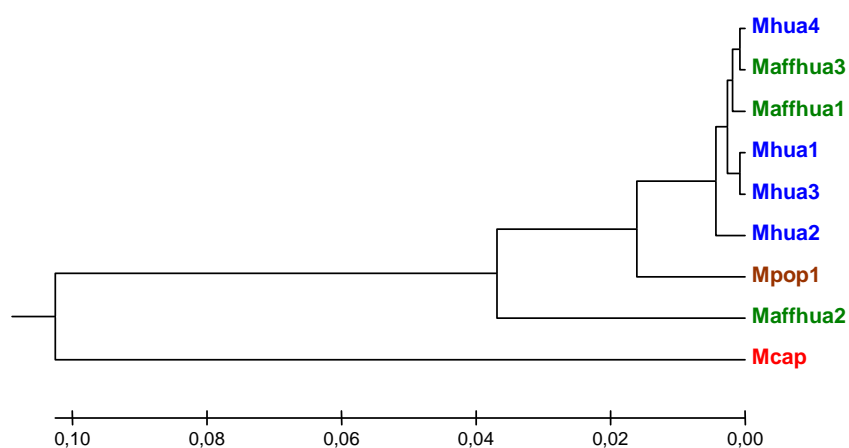
\* Para etiquetar cada grupo se usó la primera letra del género y las tres primeras letras de la especie.



**Figura 11.** Distancias genéticas intragénero e intragrupo del COI haciendo varias combinaciones de las secuencias de *M. capillaceus*, *Megalobulimus* spp. y *M. popelairianus*, calculadas con el modelo K2p.

Por otro lado, si al comparar las distancias dentro y entre los grupos excluyendo a *M. aff. huascari* con código 91, la distancia con el modelo de sustitución K2p entre Mhua y Mspp disminuye hasta 0,0055 y la encontrada dentro de Mspp queda con un valor de 0,0030, que es bastante inferior en comparación al anterior (0,0379).

El UPGMA muestra gráficamente los valores de las tablas, la poca distancia entre los *M. huascari*, *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus* (sin incluir a Maffhua2). *M. capillaceus* tiene una considerable divergencia con el resto (figura 12).



**Figura 12.** Dendrograma de similitud del marcador COI del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín con el método UPGMA. En la parte inferior se muestra la escala de distancia genética. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus spp.*, marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus*.

#### 3.5.1.4. Índices Moleculares

En la especie *M. capillaceus* sólo se encontró un haplotipo, a pesar de la alta tasa de cambio que presenta el marcador utilizado y de tener muestras colectadas de ocho localidades distribuidas en aproximadamente 3400 km<sup>2</sup> del Departamento de San Martín. La inexistencia de variación implica que la diversidad genética estimada por cualquier estadístico será siempre cero.

Contrariamente, *M. huascari*, para el análisis con el gen COI, presentó cuatro haplotipos, con siete sitios segregantes, de las cuales cinco fueron *singletons*

(mutaciones en un solo individuo). Además, se aprecian altos valores de diversidad haplotípica y bajos para la nucleotídica en ambos *sets* de datos (tabla 11).

**Tabla 11.** Estadística descriptiva del COI de *M. huascari*, *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*

<i>Set de datos</i>	<b>H</b>	<b>Hd</b>	<b>Π</b>	<b>K</b>	<b>S</b>	<b>Θs</b>
<i>M. huascari</i>	4	0,9	0,0045	3,2	7	3,36
<i>M. huascari</i> , <i>M. aff. huascari</i> y <i>M. aff. Popelairianus</i> *	6	0,929	0,0047	3,321	10	3,857

\* No se incluyó al haplotipo Maffhua2 por tener una alta divergencia con respecto a los otros de ese grupo. **H**: número de haplotipos, **Hd**: diversidad haplotípica, **π**: diversidad nucleotídica, **k**: es el promedio de la comparación a pares de los haplotipos, **S**: número de sitios segregantes y **Θs**: el estadístico theta calculado a partir de S.

### 3.5.1.5. Reconstrucción filogenética

Antes de realizar los análisis filogenéticos propiamente dichos, es necesario escoger el modelo de evolución apropiado. Para el ML el modelo de sustitución nucleotídica escogido por la comparación de los logaritmos de las tasas de verosimilitud por el Model Test fue TVM+G, el parámetro alfa de la distribución gamma (*gamma shape*) fue 0,1777 y la proporción de sitios invariantes (*pinvar*) fue cero para el *set* de datos con todos los haplotipos. Para el *set* sin el haplotipo Maffhua2 el modelo de sustitución elegido bajo los mismos parámetros anteriores fue TVM+I, con un *pinvar* de 0,5334.

Cuando se trabajó la BI el modelo de sustitución nucleotídica escogido por el criterio de verosimilitud, realizado en el programa Mr. Model Test fue GTR+G, el valor del *gamma shape* fue 0,1666 y el del *pinvar* fue cero. El cual fue exactamente igual al seleccionado con los mismos parámetros para el *set* de datos sin *M. aff. huascari* número 91, por lo que no se realizó esta filogenia.

El NJ mostró la existencia de tres clados soportados de manera estadísticamente robusta. *M. huascari* y *Megalobulimus* spp. formaron un solo grupo que se separó de *M. popelairianus* con un nodo cuyo *bootstrap* fue de 100% y *M. capillaceus* quedó en posición basal a los dos anteriores con un *bootstrap* de 90%. Cabe destacar que, el haplotipo Maffhua2 se presenta con una rama bastante larga indicando una alta divergencia con los otros individuos de ese clado (figura 13).

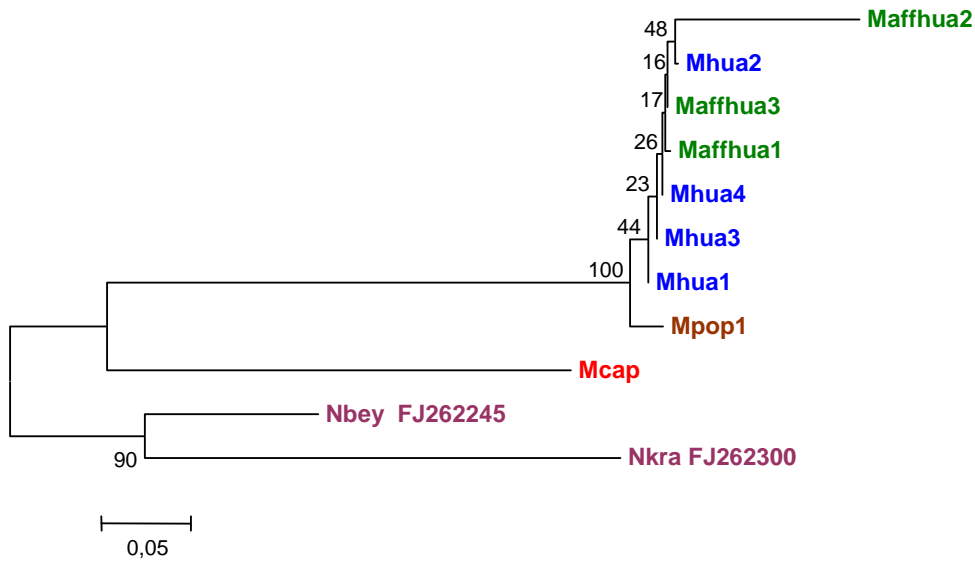
En el análisis de MP se obtuvieron resultados semejantes a los de la metodología anterior, es decir, la formación de tres grupos. Sin embargo, en este caso el valor de *bootstrap* del nodo de los congompes fue de 98% (figura 14).

En los dos árboles filogenéticos obtenidos con ML, los valores de soporte de los nodos de estos tres filogrupos variaron levemente. *M. popelairianus* se colocó como clado hermano del grupo conformado por *M. huascari* y *Megalobulimus* spp. con *bootstraps* iguales a 94% cuando se incluyó en el análisis a Maffhua2 y 99% cuando no se tomó en cuenta este haplotipo. Así como también, *M. capillaceus* se mantuvo en posición basal con 99% de *bootstrap* en ambas filogenias (figuras 15, 16).

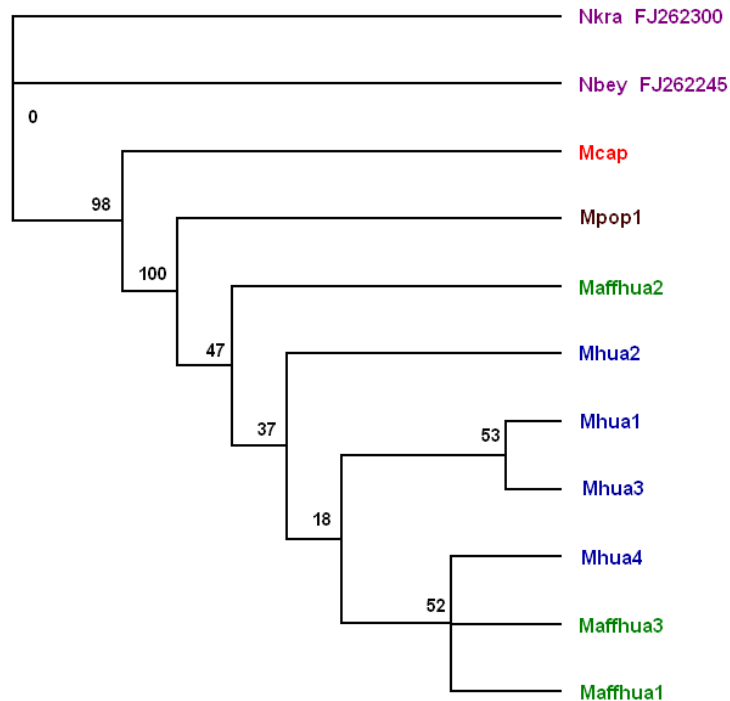
La reconstrucción filogenética obtenida por medio de la regla de la mayoría con la BI muestra una topología similar. Las probabilidades posteriores de formar los tres grupos son iguales 1,00 (figura 17).

El análisis filogenético del COI con todas las metodologías, mostró tres filogrupos bien soportados. *M. capillaceus* se mostró en posición basal a los taxa hermanos *M. popelairianus* y *M. huascari*. Además, éste sería un grupo monofilético, si los otros individuos inciertamente clasificados fueran considerados de esta especie (figuras 13-17).

Asimismo, se observa una baja resolución de las relaciones evolutivas dentro del clado de *M. huascari* y *Megalobulimus* spp. Con valores de *bootstrap* que no sobrepasan el 63% (figuras 13-16) y el árbol filogenético elegido por la regla de la mayoría en la BI muestra a los grupos mencionados en un clado colapsado (figura 17). Esto indica que existe una muy baja variación dentro de este filogrupo.

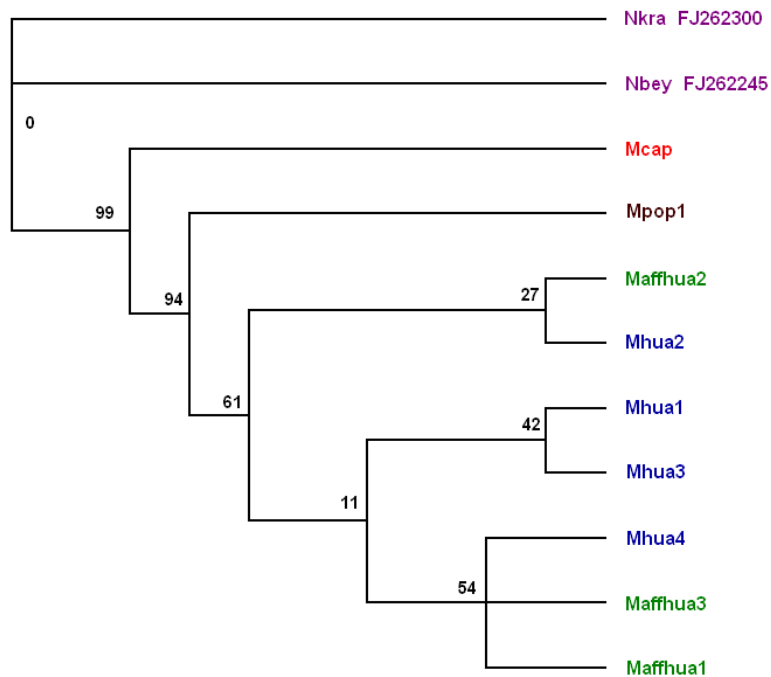


**Figura 13.** Filogenia por el método NJ de los haplotipos del COI, del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de *bootstrap* y la escala de distancia genética. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank.

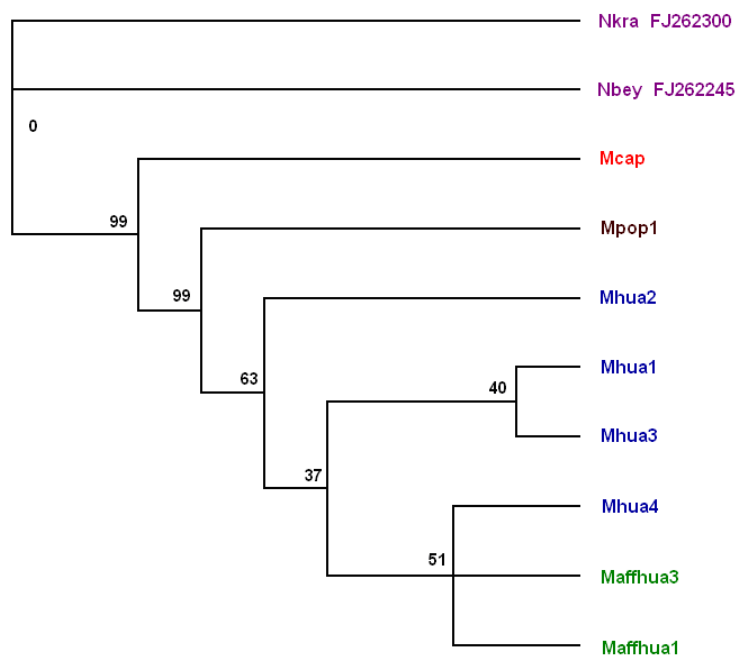


**Figura 14.** Árbol filogenético obtenido por MP de los haplotipos del gen COI del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de *bootstrap*. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank.

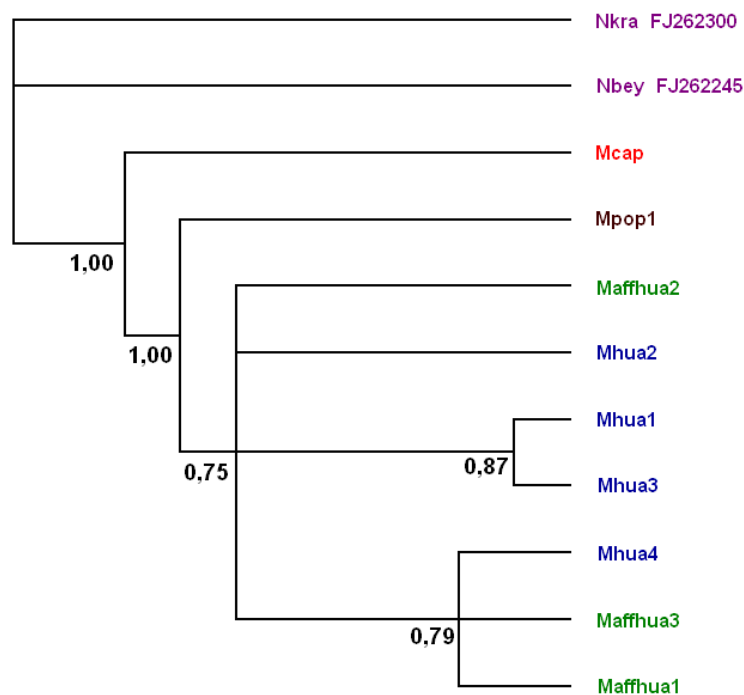




**Figura 15.** Árbol filogenético obtenido por consenso estricto con ML del gen COI de los haplotipos del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de *bootstrap*. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank.



**Figura 16.** Árbol filogenético obtenido por consenso estricto con ML del gen COI de los haplotipos del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín, excluyendo al haplotipo Maffhua2. Se muestran los valores de *bootstrap*. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank.

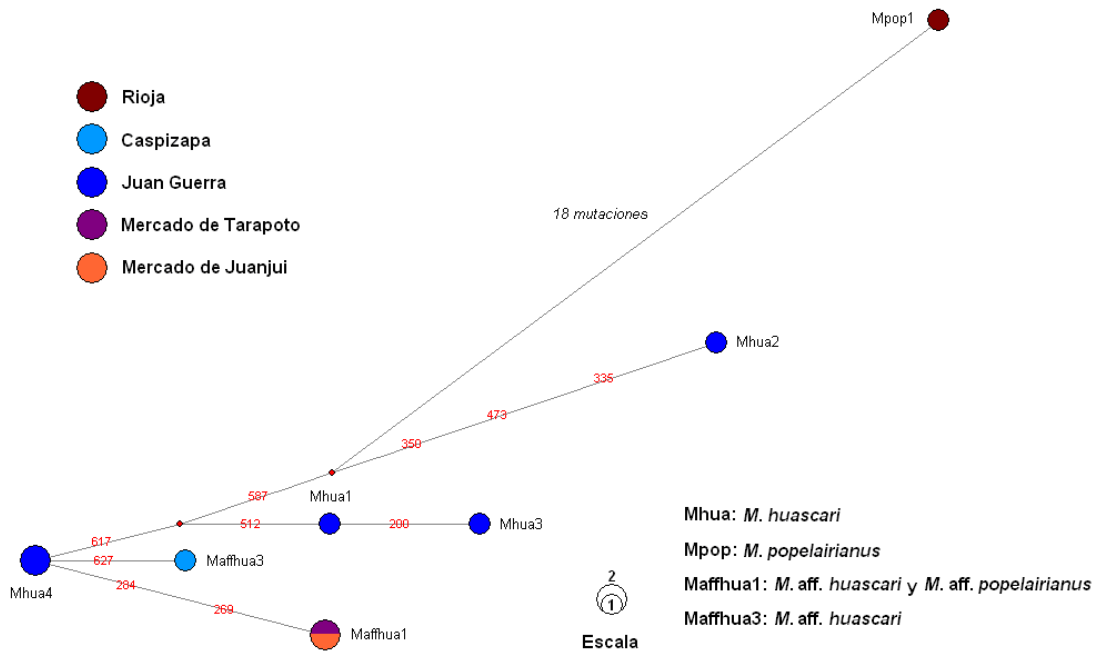


**Figura 17.** Árbol filogenético obtenido por la regla de la mayoría del análisis de Inferencia Bayesiana del gen COI del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de probabilidad posterior. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesión del GenBank.

### 3.5.1.6. Análisis de Network

Se hicieron estos análisis sin el haplotipo Maffhua1 porque era demasiado divergente genéticamente, se separaba de los otros por aproximadamente 40 mutaciones. En consecuencia, se generaba un *network* con inconsistencias y difícil de interpretar (resultados no mostrados).

El *network* del COI separó a los haplotipos en dos grupos diferenciados por 18 mutaciones uno conteniendo a *M. popelairianus* y otro que agrupó a *M. huascari* y los individuos en duda de la especie a la que pertenecen (Figura 18). Además, los haplotipos Maffhua3 y Maffhua1 quedaron separados por sólo uno y dos pasos mutacionales, respectivamente al Mhua4.



**Figura 18.** Network de los haplotipos del gen COI. Cada círculo representa un haplotipo, cada color indica la localidad (etiquetada en la izquierda de la figura) y el tamaño informa la frecuencia (la escala se encuentra a la derecha de la imagen). Los números de color rojo son las posiciones en donde ha ocurrido una mutación. Los rombos pequeños de color rojo representan la presencia de un haplotipo no muestreado o extinto. Nótese que el haplotipo Maffhua1 es compartido por *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*.

### 3.5.1.7. Barcode

#### 3.5.1.7.1. *M. huascari*

En este caso, las secuencias de esta especie se presentaron como monofilias en los árboles filogenéticos para este gen (agrupan a los individuos de *M. huascari*, *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*) y existe una divergencia intraespecífica de 1,98%.

Para este análisis se utilizó la secuencia de los haplotipos Maffhua2 y Mhua1, porque este último divergió de las otras secuencias de este grupo en un promedio de sólo dos mutaciones (con excepción del haplotipo Maffhua2) y por tanto, los resultados con las demás secuencias serían iguales o muy semejantes, contrariamente a la perteneciente al espécimen número 91, que poseía alta distancia con todos los demás.

Los resultados de la comparación de esta secuencia con la bases de datos del GenBank con la herramienta BLASTn, mostró que las 100 más parecidas a la colocada

fueron pertenecientes al marcador COI de pulmonados. De las diez con menor *valor de E*, seis pertenecieron al género *Natalia* utilizado como taxón externo en los análisis filogenéticos (tabla 12).

Dada la alta divergencia de Maffhua2 los resultados del BLASTn mostraron porcentajes de identidad no mayores a 79% y a diferencia que en el caso anterior, entre las 10 secuencias más similares presentaba cuatro secuencias de la familia Succineidae (datos no mostrados).

**Tabla 12.** Diez primeros resultados del BLASTn para el haplotipo Mhua1 del COI

Nº de accesión	Especie	Familia	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
FJ262278.1	<i>Natalina wesseliana</i>	Rhytididae	534	534	91%	1e-165	83%
EF015435.1	<i>Cystopelta</i> sp.	Cystopeltidae	579	579	89%	9e-162	83%
FJ262271.1	<i>Natalina quekettiana</i>	Rhytididae	575	575	90%	1e-160	83%
FJ262269.1	<i>Natalina quekettiana</i>	Rhytididae	575	575	92%	1e-160	82%
FJ262268.1	<i>Natalina quekettiana</i>	Rhytididae	575	575	92%	1e-160	82%
EF015437.1	<i>Ovalchlamys fulgens</i>	Helicarionidae	575	575	97%	1e-160	82%
EF015416.1	<i>Brevisentis jacksoniensis</i>	Helicarionidae	545	545	89%	9e-152	82%
EF015436.1	<i>Bekkochlamys</i> sp.	Helicarionidae	527	527	98%	3e-146	82%
FJ262297.1	<i>Natalina kraussi</i>	Rhytididae	516	516	92%	7e-143	81%
FJ262272.1	<i>Natalina quekettiana</i>	Rhytididae	510	510	90%	3e-141	81%

Al introducir las secuencias en la base de datos del *Barcode of Life*, éstas son mostradas de una manera bastante amigable en forma de código de barras (figura 19).



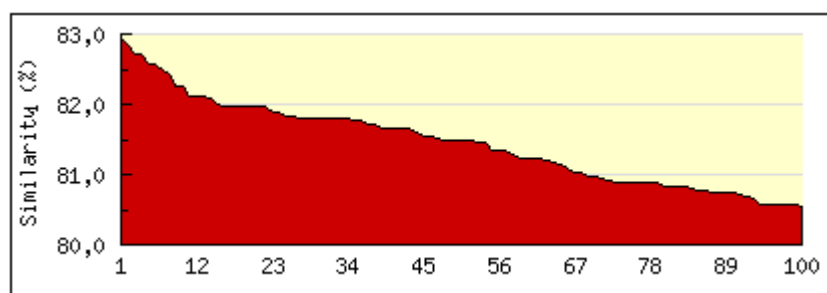
**Figura 19.** Código de barras de ADN del haplotipo Mhua1 (*M. huascari*). Las adeninas, guaninas, citocinas y timinas son representadas por los colores verde, negro, azul y rojo, respectivamente.

Los resultados encontrados para la búsqueda en el *Full Database*, muestran una tabla con las diez secuencias con mayor similitud (tabla 14), en donde se destaca que el 90% pertenecen a varias especies de la familia Rhytididae y el porcentaje de similitud es un poco menor a 83%, muy parecido a lo encontrado por el BLASTn.

**Tabla 13.** Diez primeros resultados de la comparación con la base de datos *All Barcode Records* para el haplotipo Mhua1 del COI

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	Similitud (%)
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Cystopeltidae	Cystopelta	<i>sp.Aust.Mus.C444602</i>	82,93
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Beyrichi</i>	82,85
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Beyrichi</i>	82,72
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Beyrichi</i>	82,72
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Cafra</i>	82,57
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Wesseliana</i>	82,57
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Quekettiana</i>	82,47
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Beyrichi</i>	82,42
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Beyrichi</i>	82,26
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Cafra</i>	82,26

También se obtiene una gráfica donde se visualiza el porcentaje de similitud de los 100 primeros *matches*, y se puede distinguir que existen muy pocas secuencias con los grados de similitud más altos (figura 20).

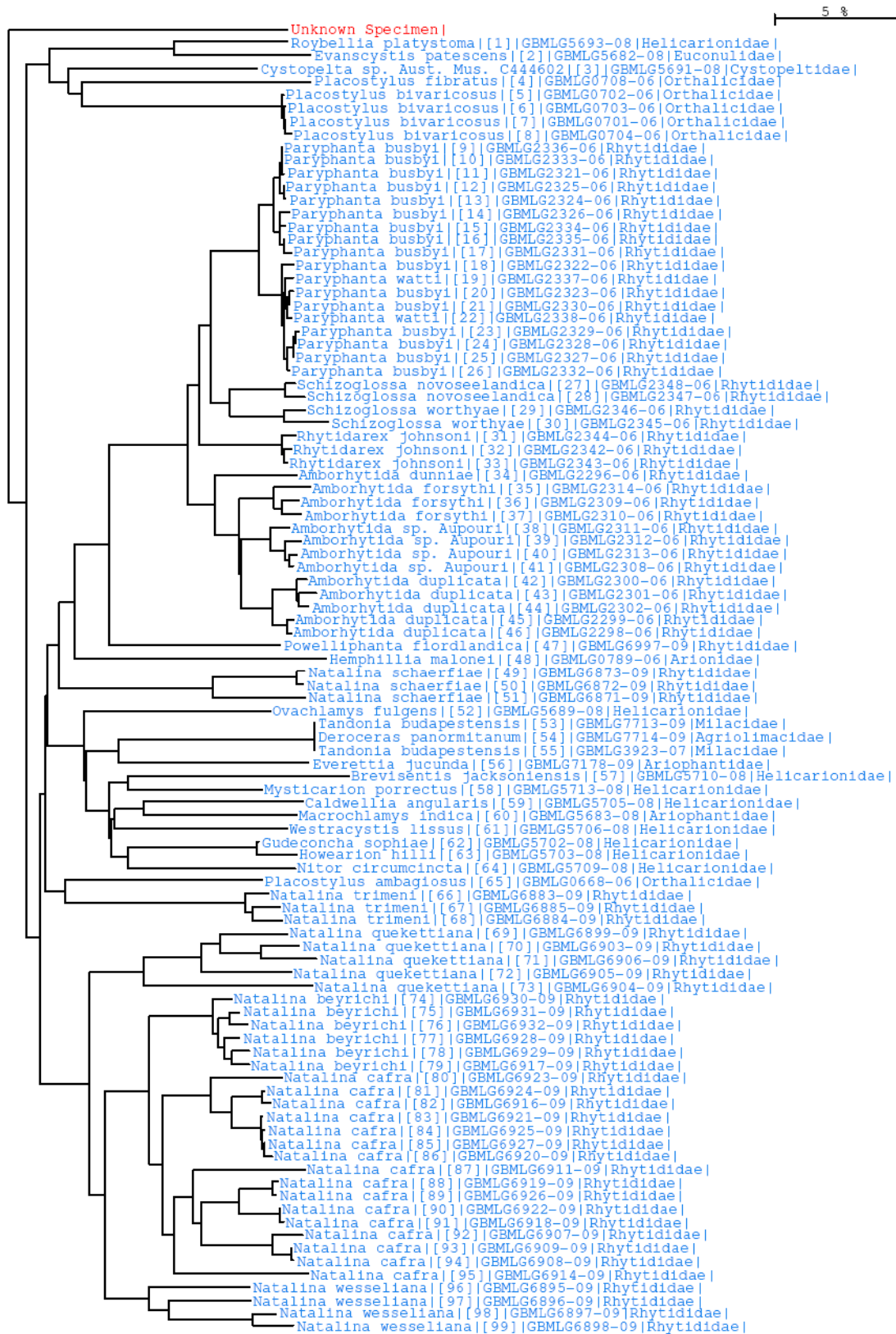


**Figura 20.** Porcentajes de similitud de la secuencia del haplotipo Mhua1 del COI con los 100 primeros *matches* de la *All Barcode Records*.

El filograma NJ del haplotipo Mhua1 del COI y las 100 secuencias con mayor semejanza de la *All Barcode Records*, no la muestra agrupada con ninguna otra, y por el contrario muy distante genéticamente de las demás (figura 21).

Curiosamente para el haplotipo Maffhua2 no se presentaron *matches* en ninguna de las tres bases de datos del BOLD.

La comparación contra *Species Database* arrojó que no existía ninguna secuencia que hiciera *match* con la del haplotipo de *M. huascari*.



**Figura 21.** Árbol filogenético realizado con NJ y el modelo de sustitución nucleotídica K2p del haplotipo Mhual del COI (*Unknown specimen*) junto con las 100 secuencias con mayor porcentaje de similitud de la *All Barcode Records*.

### 3.5.1.7.2. *M. popelairianus*

En este estudio sólo se logró secuenciar la región del COI para un individuo de *M. popelairianus*, por tanto no se puede probar si cumple con los requisitos establecidos. La evaluación para determinar la posible utilización de este marcador como código de barras de ADN en este taxón quedará aún en suspenso.

### 3.5.1.7.3. *M. capillaceus*

El perfil COI de esta especie es bastante peculiar por su carencia de diversidad genética, de lo cual se puede colegir que la divergencia dentro de este taxón es 0% y lógicamente es monofilético. Además, se han obtenido más de tres secuencias de COI con más de 500 pb de longitud por lo tanto es aceptado en el BOLD como *DNA barcode*.

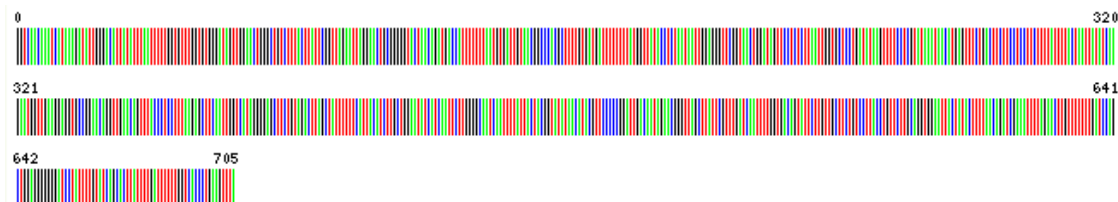
La primera comparación es con la base de datos del GenBank, la cual demostró que no se ha reportado una secuencia del COI muy parecida a la obtenida para esta especie. El mayor valor de identidad encontrado fue igual a 81% (tabla 14).

**Tabla 14.** Diez primeros resultados del BLASTn del haplotipo de *M. capillaceus* del COI

Nº de accesión	Especie	Familia	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EF015416.1	<i>Brevisentis jacksoniensis</i>	Helicarionidae	534	534	91%	2e-148	81%
DQ298491.1	<i>Paryphanta busbyi</i>	Rhytididae	534	534	93%	5e-144	81%
DQ298496.1	<i>Paryphanta busbyi</i>	Rhytididae	514	514	93%	3e-142	81%
DQ298495.1	<i>Paryphanta busbyi</i>	Rhytididae	514	514	93%	3e-142	81%
DQ298497.1	<i>Paryphanta busbyi</i>	Rhytididae	508	508	93%	1e-140	81%
EF433576.1	<i>Biomphalaria tenagophila</i>	Planorbidae	497	497	99%	3e-137	79%
DQ298490.1	<i>Paryphanta busbyi</i>	Rhytididae	497	497	93%	3e-137	80%
EF057377.1	<i>Satsuma katipolensis</i>	Camaenidae	496	496	96%	9e-137	80%
DQ298506.1	<i>Paryphanta watti</i>	Rhytididae	492	492	89%	1e-135	81%
AY148568.1	<i>Partula radiolata</i>	Partulidae	488	488	93%	2e-134	80%

De las diez secuencias con mayor similitud a la evaluada, nueve resultaron del infraorden Stylommatophora (caracoles terrestres) y una al suborden Basommatophora (caracoles de agua dulce). Además, seis pertenecieron a la familia Rhytididae, usada como taxón externo en las filogenias realizadas en este trabajo (tabla 12). Las 100 primeras secuencias pertenecieron a caracoles del orden Pulmonada.

La secuencia de *M. capillaceus* es presentada por el BOLD en forma de código de barras, donde cada color indica una de las bases nitrogenadas de la secuencia, además se encuentra posicionada del extremo 5' al 3' (figura 22).



**Figura 22.** Código de barras de ADN del haplotipo Mcap (*M. capillaceus*). Las adeninas, guaninas, citocinas y timinas son representadas por los colores verde, negro, azul y rojo, respectivamente.

Al realizar la comparación de la secuencia problema (perteneciente a *M. capillaceus*) con la base de datos denominada *All Barcode Records*, se obtuvo una tabla con la clasificación de los individuos con los que hizo *match* y sus respectivos porcentajes de similitud (que en la tabla se presentan de mayor a menor). Los primeros *matches* en la tabla de resultados dada por el BOLD, pertenecieron a las secuencias de COI de los especímenes del género *Megalobulimus* que fueron introducidos previamente y que son motivo de esta tesis, las cuales no fueron tomadas en cuenta (tabla 15).

**Tabla 15.** Diez primeros resultados de la comparación con la base de datos *All Barcode Records* para la secuencia del COI de *M. capillaceus*

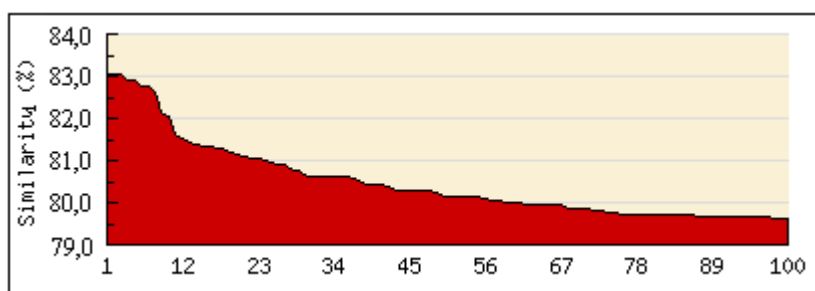
Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie	Similitud (%)
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Beyrichi</i>	82,12
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Helicarionidae	Bekkochlamys	<i>sp.ITH-2007</i>	82,07
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Beyrichi</i>	81,64
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Beyrichi</i>	81,52
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Beyrichi</i>	81,45
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Beyrichi</i>	81,36
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>Cafra</i>	81,34
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Ariophantidae	Macrochlamys	<i>Indica</i>	81,33
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Helicarionidae	Brevisentis	<i>Jacksoniensis</i>	81,29
Mollusca	Gastrópoda	Pulmonata	Rhytididae	Natalina	<i>wesseliana</i>	82,27

\*No se incluyen los resultados de *match* con las secuencias de COI de los otros especímenes del mismo género previamente introducidas.

Los individuos cuyas secuencias del gen COI fueron más parecidas a las de la secuencia problema pertenecieron al orden Pulmonata y la familia que prevaleció como la de mayor similitud en este gen fue Rhytididae, tal como en el caso anterior.



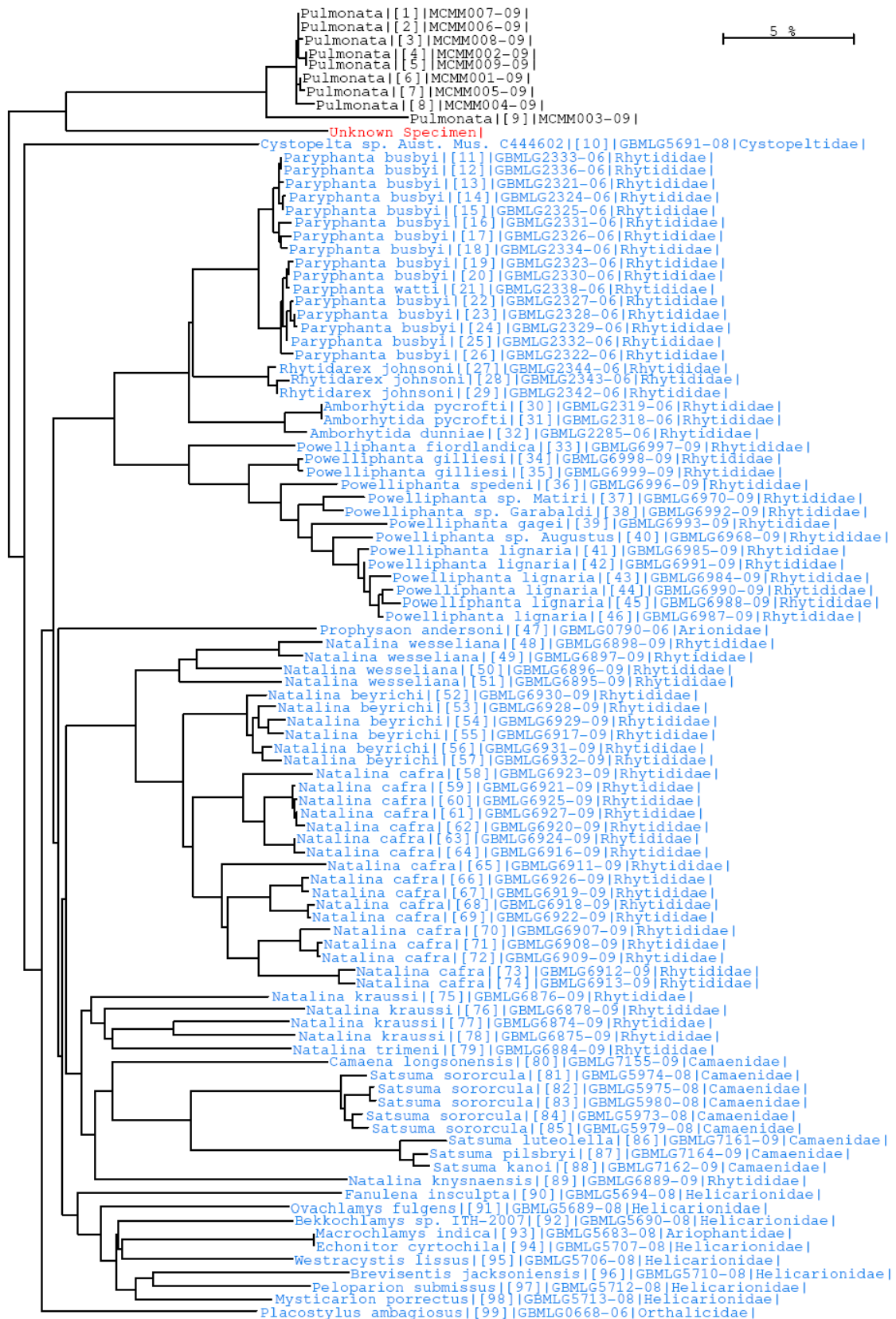
Además de la tabla se presenta una gráfica donde se muestra en el eje de las ordenadas el porcentaje de similitud y las 100 primeras secuencias con las que hizo *match* la secuencia de COI de *M. capillaceus*. La gráfica de porcentajes de similitud con los 100 primeros *matches*, muestra que hay muy pocas secuencias depositadas en el BOLD con los porcentajes de similitud más altos (entre 79% y 83%) (figura 23).



**Figura 23.** Porcentajes de similitud de la secuencia del haplotipo de *M. capillaceus* del COI con los 100 primeros *matches* de la *All Barcode Records*.

El árbol filogenético con el NJ obtenido con los 100 primeros *matches* del haplotipo de COI de *M. capillaceus* con la base de datos *All Barcode Records*, muestra a esta especie bastante divergente de las otras depositadas anteriormente y tiene como clado hermano a las secuencias del mismo género introducidas con anterioridad (figura 24).

La comparación contra *Species Database*, resultó igual a la de *M. huascari*, es decir, no se pudo encontrar ninguna secuencia de COI que hiciera *match* con la de *M. capillaceus*.



**Figura 24.** Árbol filogenético realizado con NJ y el modelo de sustitución nucleotídica K2p del haplotipo de *M. capillaceus* del COI (*Unknown specimen*) junto con las 100 secuencias con mayor porcentaje de similitud de la *All Barcode Records*.

### 3.5.2. Gen 16S rRNA

#### 3.5.2.1. Características de las secuencias

El tamaño del alineamiento para el gen 16S rRNA fue de 332 pb con presencia de seis *gaps* en los Megalobulimidae, que estuvieron ubicados entre los sitios 126 y 237 y sus tamaños variaron entre 1 y 3 posiciones de nucleótidos. Cabe resaltar que cuatro de éstos separaron a *M. capillaceus* de las demás especies y dos de un solo sitio de longitud, en las posiciones 174 y 219, se presentaron sólo en el individuo Maffhua2.

Se encontraron 11 haplotipos para la familia en estudio y al igual que con el otro segmento genómico, *M. capillaceus* presentó sólo uno, a pesar de tener mayor número de individuos secuenciados (tabla 16).

**Tabla 16.** Nominación de los haplotipos encontrados para el gen 16S rRNA por individuo

Especie	Localidad	Código	Haplotipo
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Moyobamba	16	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Juan Guerra	18	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Juan Guerra	38	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Juan Guerra	21	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Juan Guerra	63	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Juan Guerra	65	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Lamas	36	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Mercado de Tarapoto	17	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Tarapoto	19	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Tarapoto	20	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Rioja	22	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Caspizapa	29	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Piscoyacu	50	Mcap
<i>Megalobulimus capillaceus</i>	Saposoa	61	Mcap
<i>Megalobulimus huascari</i>	Juan Guerra	4	Mhua1
<i>Megalobulimus huascari</i>	Juan Guerra	24	Mhua1
<i>Megalobulimus huascari</i>	Juan Guerra	25	Mhua2
<i>Megalobulimus huascari</i>	Juan Guerra	79	Mhua3
<i>Megalobulimus huascari</i>	Juan Guerra	82	Mhua4
<i>Megalobulimus huascari</i>	Juan Guerra	83	Mhua4
<i>Megalobulimus</i> aff. <i>huascari</i>	Mercado de Tarapoto	90	Maffhua1
<i>Megalobulimus</i> aff. <i>huascari</i>	Mercado de Tarapoto	91	Maffhua2
<i>Megalobulimus</i> aff. <i>huascari</i>	Caspizapa	94	Maffhua3
<i>Megalobulimus popelairianus</i>	Rioja	67	Mpop1
<i>Megalobulimus popelairianus</i>	Saposoa-Chambira	95	Mpop2
<i>Megalobulimus popelairianus</i>	Saposoa-Pasarraya	93	Mpop3
<i>Megalobulimus</i> aff. <i>popelairianus</i>	Mercado de Juanjui	78	Maffhua1
<i>Natalina beyrichi</i>	-	-	Nbey
<i>Natalina kraussi</i>	-	-	Nora

El alineamiento con los extragrupos presentó 192 sitios conservados y 140 variables, de los cuales 95 eran parsimoniosamente informativos y el resto eran *singletons*. Como era de esperarse, hubo una mayor ocurrencia de *gaps* en los Rhytididae, por ser un grupo lejanamente relacionado, se puede mencionar uno especialmente largo de 13 pb que comienza en la posición 176 del alineamiento en la especie *Natalina beyrichi*.

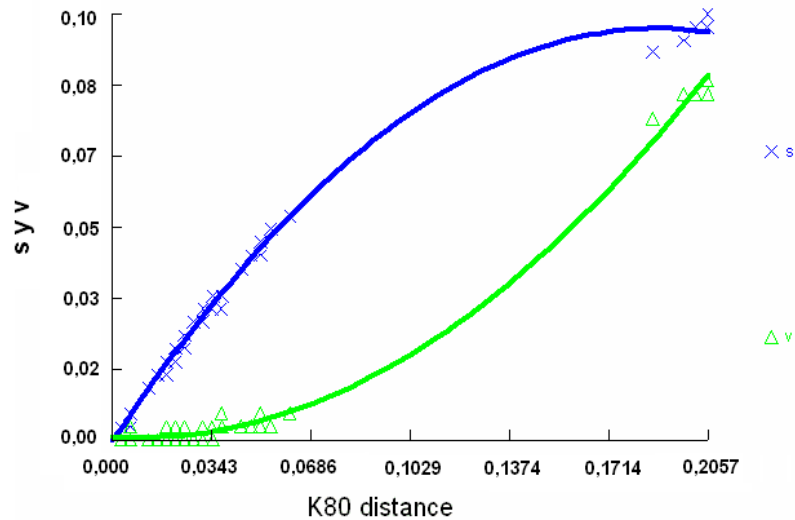
### 3.5.2.2. Caracterización de las dos regiones del genoma mitocondrial y calidad de los datos

Los individuos del género *Megalobulimus* presentaron en promedio 68,22% de adeninas y timinas, y los taxa externos tuvieron un promedio de los porcentajes de abundancia de esas bases nucleotídicas ligeramente superior (72,38%) (tabla 17).

La distribución de las transiciones y transversiones con respecto a las distancias genéticas de los alineamientos sin los extragrupos evidenció un bajo grado de saturación en las transiciones (figura 25).

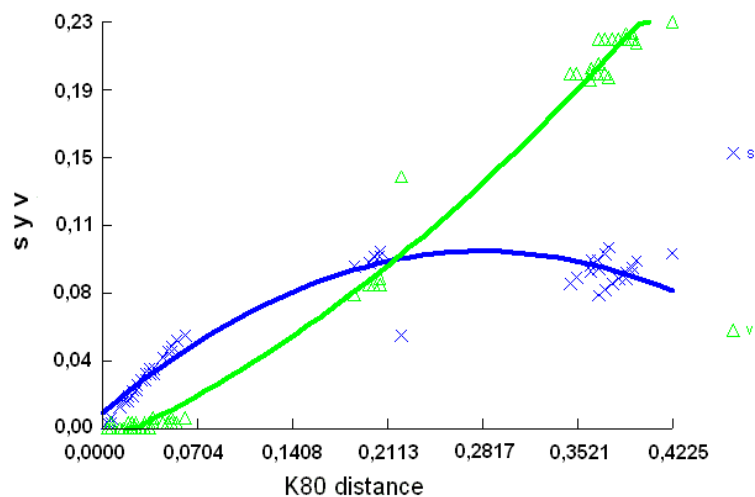
**Tabla 17.** Cantidad, frecuencia de las bases nucleotídicas y abundancia relativa de las islas CpG para los haplotipos de *M. capillaceus*, *M. huascari*, *M. popelairianus*, *N. beyrichi* y *N. kraussi* con el marcador 16S rRNA

Haplotipo	Valor Absoluto				Frecuencia				AR CpG
	A	C	G	T	A	C	G	T	
Mhua1	110	44	63	113	0,3333	0,1333	0,1909	0,3424	0,6960
Maffhua1	114	43	59	114	0,3455	0,1303	0,1788	0,3455	0,7659
Mhua4	114	42	59	115	0,3455	0,1273	0,1788	0,3485	0,7811
Maffhua3	115	43	58	114	0,3485	0,1303	0,1758	0,3455	0,7811
Mhua2	113	45	60	112	0,3424	0,1364	0,1818	0,3394	0,7227
Mhua3	110	43	62	115	0,3333	0,1303	0,1879	0,3485	0,7227
Mpop1	112	42	61	115	0,3394	0,1273	0,1848	0,3485	0,6259
Mpop2	111	44	62	113	0,3364	0,1333	0,1879	0,3424	0,5910
Mpop3	111	43	61	115	0,3364	0,1303	0,1848	0,3485	0,6139
Maffhua2	105	43	67	113	0,3201	0,1311	0,2043	0,3445	0,7683
Mcap	109	38	70	110	0,3333	0,1162	0,2141	0,3364	0,6831
Nbey	113	35	52	110	0,3645	0,1129	0,1677	0,3548	0,5264
Nkra	123	32	56	113	0,3796	0,0988	0,1728	0,3488	0,6860



**Figura 25.** Transiciones y transversiones comparadas con la distancia genética con el modelo de sustitución nucleotídica K80 (K2p) del alineamiento del gen 16S rRNA de las especies del género *Megalobulimus* sin los taxa del grupo externo. “s”: transiciones; “v”: las transversiones.

Cuando se tomaron en cuenta las dos secuencias del género *Natalina*, el plateau que se aprecia en la gráfica de distribución de las transiciones y transversiones indicó un alto nivel de saturación de las transiciones (figura 26).



**Figura 26.** Transiciones y transversiones comparadas con la distancia genética con el modelo de sustitución nucleotídica K80 (K2p) del gen 16S rRNA de las especies del género *Megalobulimus* y las del grupo externo. “s”: transiciones; “v”: transversiones.

Las tendencias de las dos gráficas no son afectadas si se estiman con el set de datos sin la presencia de la secuencia del haplotipo Maffhua2 (resultados no mostrados).

### 3.5.2.3. Distancia Genética

Al igual que con la región anteriormente analizada, el individuo con código 91, tiene una alta divergencia con los de *M. huascari* y *M. popelairianus*, pero con valores menores que con el COI. También, los haplotipos Maffhua1 y Maffhua3, presentaron muy baja distancia con respecto a los de la especie *M. huascari*. Se nota también una inesperada alta distancia genética (ligeramente mayor a 0,2) entre los haplotipos de *M. popelairianus* y lógicamente dentro del grupo Mpop (0,025) (tablas 18 y 19).

**Tabla 18.** Distancias inter e intraespecíficas para el gen 16S rRNA

Taxa	Mcap	Mhua	Msp	Mpop	Nbey	Nkra
Mcap	0,0000					
Mhua	0,1835	0,0158				
Msp	0,1813	0,0299	0,0249			
Mpop	0,1801	0,0219	0,0357	0,0241		
Nbey	0,3582	0,3363	0,3406	0,3322	-	
Nkra	0,3911	0,3585	0,3654	0,3558	0,2176	-

\* Para etiquetar cada grupo se usó la primera letra del género y las tres primeras letras de la especie.

Se conformó en una sola agrupación a los individuos de los grupos Mpop, Mhua y Msp con excepción del *M. aff. huascari* con código 91. Resultó que la divergencia dentro de éste con el modelo de sustitución nucleotídica K2p fue de 2,15% (figura 27).

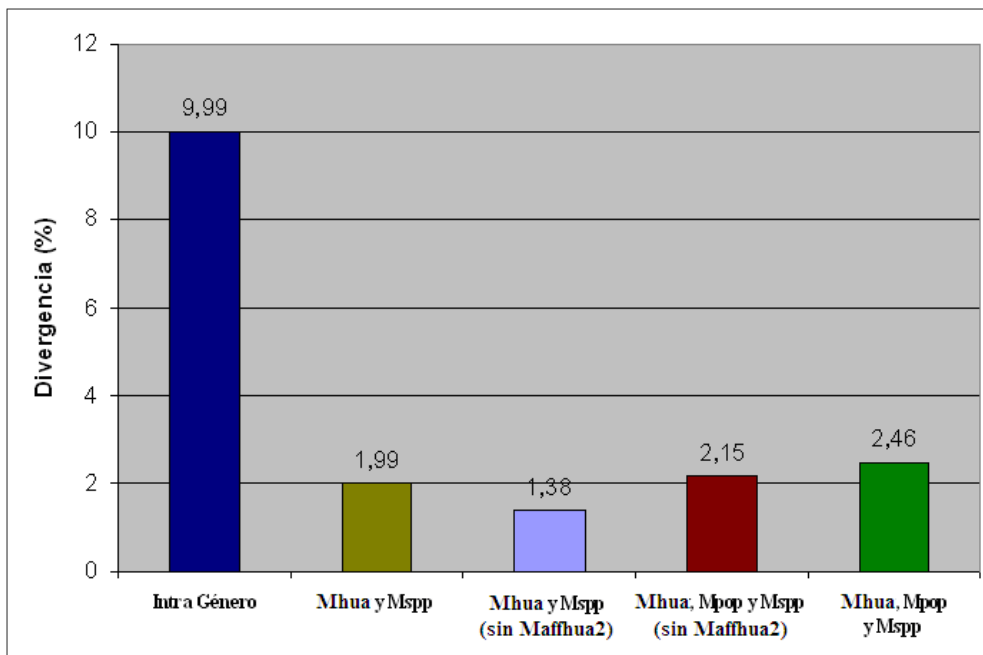
Por otro lado, si se comparan las distancias dentro y entre los grupos excluyendo al haplotipo Maffhua2, los grupos Mhua y Msp quedarían separados por 0,0226 de distancia genética y los individuos dentro de Msp tendrían sólo 0,0272 con el modelo de sustitución K2p.

Para reforzar el entendimiento de los valores de las tablas se puede revisar el UPGMA, en el que se aprecia una divergencia cercana al 3% entre los haplotipos de *M. huascari*, *M. aff. huascari*, *M. aff. popelairianus* y *M. popelairianus* (sin incluir a Maffhua2). *M. capillaceus* mantiene su elevada distancia genética con respecto a las otras especies (figura 28).

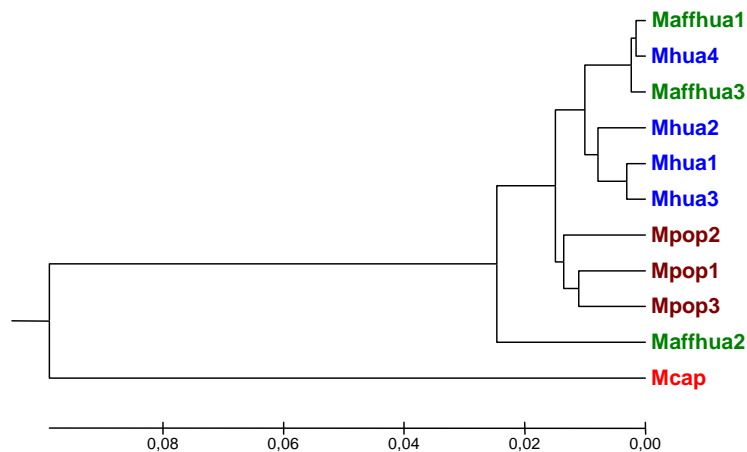
**Tabla 19.** Distancias de la comparación a pares de los haplotipos del gen 16S rRNA

<b>Haplotipos</b>	<b>Maffhua3</b>	<b>Maffhual</b>	<b>Mhua4</b>	<b>Mhual</b>	<b>Mhua3</b>	<b>Mhua2</b>	<b>Mpop1</b>	<b>Mpop2</b>	<b>Mpop3</b>	<b>Maffhua2</b>	<b>Mcap</b>
<b>Maffhua3</b>											
<b>Maffhual</b>	0,0031										
<b>Mhua4</b>	0,0062	0,0031									
<b>Mhual</b>	0,0189	0,0157	0,0189								
<b>Mhua3</b>	0,0253	0,0221	0,0253	0,0062							
<b>Mhua2</b>	0,0189	0,0157	0,0189	0,0125	0,0189						
<b>Mpop1</b>	0,0320	0,0287	0,0254	0,0254	0,0319	0,0189					
<b>Mpop2</b>	0,0353	0,0320	0,0287	0,0287	0,0352	0,0287	0,0222				
<b>Mpop3</b>	0,0286	0,0319	0,0352	0,0286	0,0351	0,0286	0,0221	0,0319			
<b>Maffhua2</b>	0,0520	0,0486	0,0452	0,0486	0,0485	0,0486	0,0418	0,0520	0,0587		
<b>Mcap</b>	0,2032	0,1990	0,1947	0,1990	0,2029	0,1990	0,1990	0,1947	0,1987	0,1866	

\* Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobolus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus*.



**Figura 27.** Distancias genéticas intragénero e intragrupo del 16S rRNA haciendo varias combinaciones de las secuencias de *M. capillaceus*, *Megalobulimus* spp. y *M. popelairianus*, calculadas con el modelo K2p.



**Figura 28.** Dendrograma de similitud del marcador 16S rRNA del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín con el método UPGMA. En la parte inferior se muestra la escala de distancia genética. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus*.



### 3.5.2.4. Índices Moleculares

Al igual que con lo ocurrido con el marcador COI, los individuos de la especie *M. capillaceus* sólo presentan un haplotipo. Es decir, a pesar de tener datos de dos marcadores diferentes (999 sitios nucleotídicos) de loci tan variables (como son los del genoma mitocondrial), de individuos de distintas procedencias geográficas, la diversidad genética fue siempre cero.

El taxón *M. huascari*, para el análisis con este marcador colapsó también en cuatro haplotipos, con 10 sitios polimórficos y cuatro fueron *singletons*. Similarmente a lo evaluado para la otra región, se hallaron altos valores de diversidad haplotípica y bajos para la nucleotídica.

**Tabla 20.** Estadística descriptiva del 16S rRNA de *M. huascari*, *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*

Set de datos	H	Hd	$\pi$	K	S	$\theta_s$
<i>M. huascari</i>	4	0,867	0,0141	4,667	10	4,38
<i>M. huascari</i> , <i>M.aff. huascari</i> y <i>M.aff. popelairianus</i> *	6	0,917	0,0126	4,167	11	4,047

\* No se incluyó al haplotipo Maffhua2 por tener una alta divergencia con respecto a los otros de ese grupo. **H**: número de haplotipos, **Hd**: diversidad haplotípica,  **$\pi$** : diversidad nucleotídica, **k**: es el promedio de la comparación a pares de los haplotipos, **S**: número de sitios segregantes y  **$\theta_s$** : el estadístico theta calculado a partir de S.

Evaluando a los haplotipos de *M. huascari* y *Megalobulimus* spp. (sin incluir a Maffhua2), se observaron seis haplotipos con once sitios segregantes, de los cuales cinco son *singletons*. Al igual que con el set de datos anterior, se hallaron altos valores de Hd y bajos de  $\pi$  en ambos genes (tabla 20).

### 3.5.2.5. Reconstrucción filogenética

Para establecer las relaciones evolutivas se necesita escoger un modelo de sustitución nucleotídica adecuado para cada set de datos, en tal sentido la comparación de los logaritmos de las tasas de verosimilitud realizado en el programa Model Test eligió como el mejor al TVM+I+G, el valor de *gamma shape* fue 4,0737 y la proporción de sitios invariantes fue 0,5366. Para el otro set de datos sin Maffhua2 y bajo la

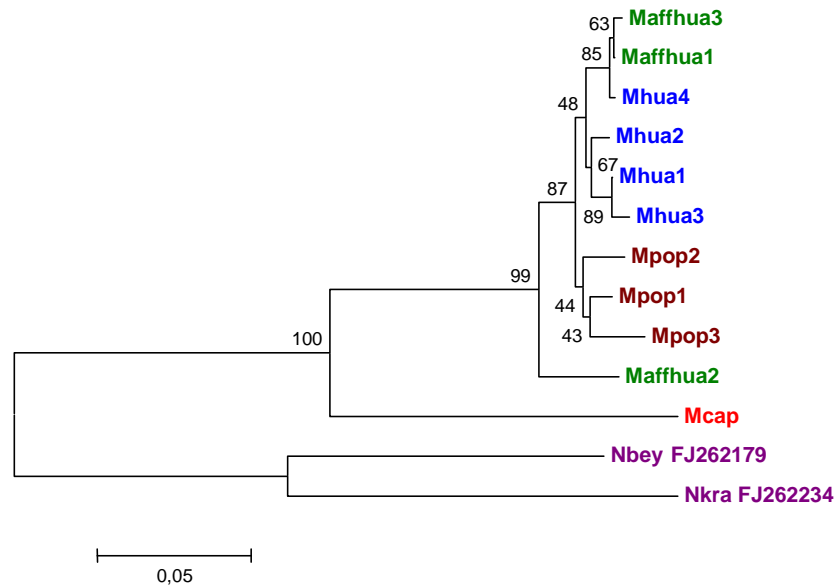
metodología anterior, mostró a TVM+I como el modelo de sustitución adecuado. El valor de *pinvar* en este caso fue 0,5334.

El mejor modelo de sustitución nucleotídica según el criterio de verosimilitud encontrado con el programa Mr. Model Test fue GTR+I+G. Aunque este método encontró al mismo modelo para el *set* de secuencias sin Maffhua2, determinó al parámetro alfa igual a infinito, lo que implica igual tasa entre los sitios, es decir el modelo final fue GTR+I.

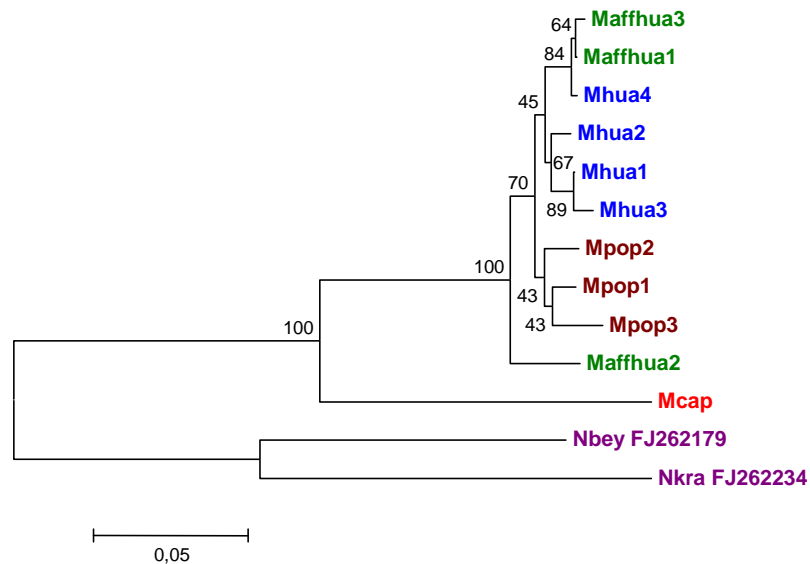
Los análisis filogenéticos con las metodologías NJ y MP, arrojaron la formación de cuatro clados, siendo la dicotomía de *M. huascari* y *M. popelairianus* la que presenta menor soporte estadístico (entre 70% y 80%). El haplotipo Maffhua2 se ubicó como un linaje hermano a los dos anteriores. Por tanto, *M. huascari*, *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus* se presentó en una polifilia. En posición basal se colocó *M. capillaceus*. Además, las topologías y la mayoría de los valores de *bootstrap* fueron indiferentes a la utilización de los *gaps* como caracteres en los filogramas (figuras 29 a la 32).

De manera contrastante, las topologías con ML e BI mostraron a dos linajes robustamente soportados (*bootstrap* de 100% y probabilidad posterior de 1.00). Uno de ellos fue *M. capillaceus* emparentado filogenéticamente con el haplotipo Maffhua2 (con bajos soportes). El otro clado mostró la monofilia de *M. huascari*, *M. aff. huascari* (sin considerar a Maffhua2), *M. aff. popelairianus* y *M. popelairianus*. Las relaciones evolutivas, sin la inclusión de la secuencia de Maffhua2, se mantuvieron en ML, pero el análisis bayesiano mostró al grupo *M. huascari* y *M. popelairianus* como recíprocamente monofiléticos (figuras 33 a la 34).

Por otra parte, las relaciones filogenéticas más profundas se mantienen invariables, tales como Maffhua3 unido en una politomía con Maffhua1 y Mhua4 y el clado dicotómico de Mhua1 y Mhua3, ambos altamente soportados estadísticamente. Al igual que con la metodología ML, Maffhua2 se agrupó con Mcap, pero con pobre sustento estadístico.

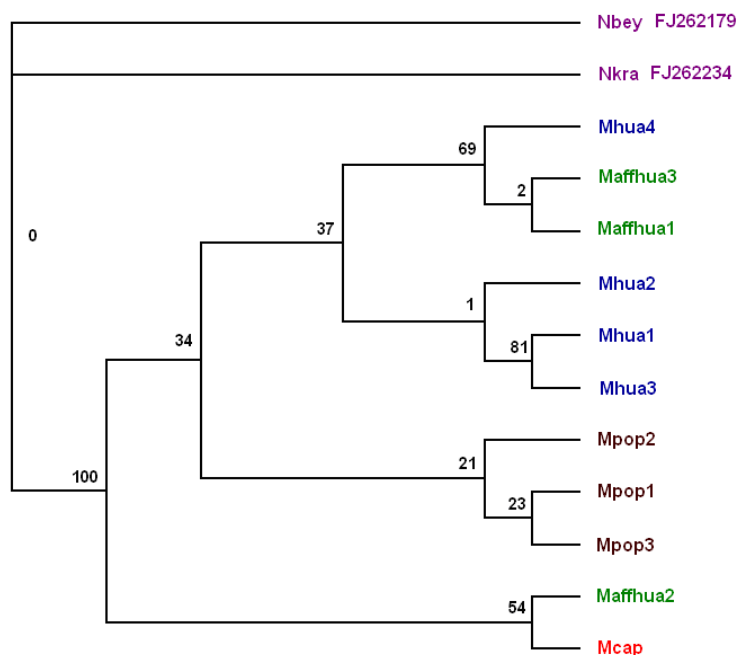


**Figura 29.** Filogenia por el método NJ de los haplotipos del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín con el gen 16S rRNA tomando en cuenta los *gaps*. En la parte inferior izquierda de la imagen se muestra la escala de distancia genética. Se muestran los valores de *bootstrap* y la escala de distancia genética. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank.

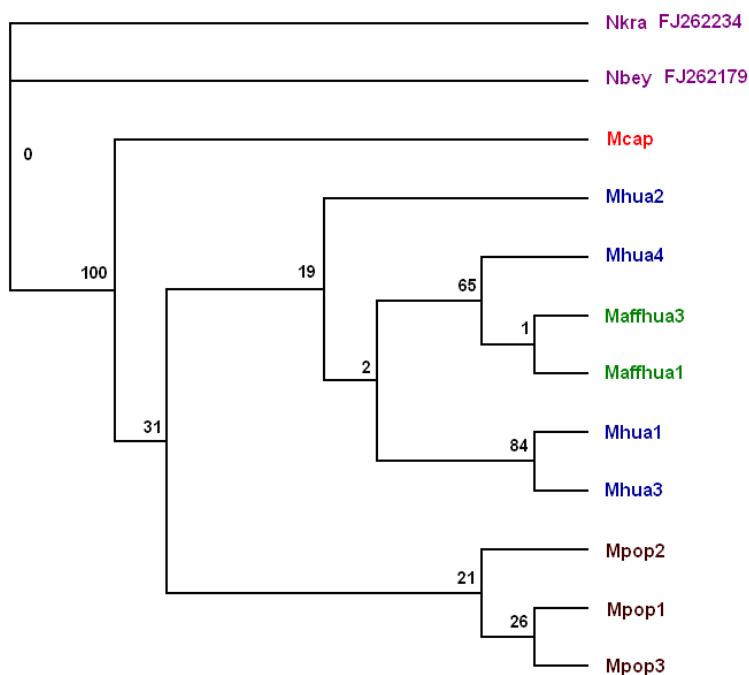


**Figura 30.** Filogenia por el método NJ de los haplotipos del 16S rRNA del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín sin tomar en cuenta los *gaps*. Se muestran los valores de *bootstrap* y la escala de distancia genética. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank.

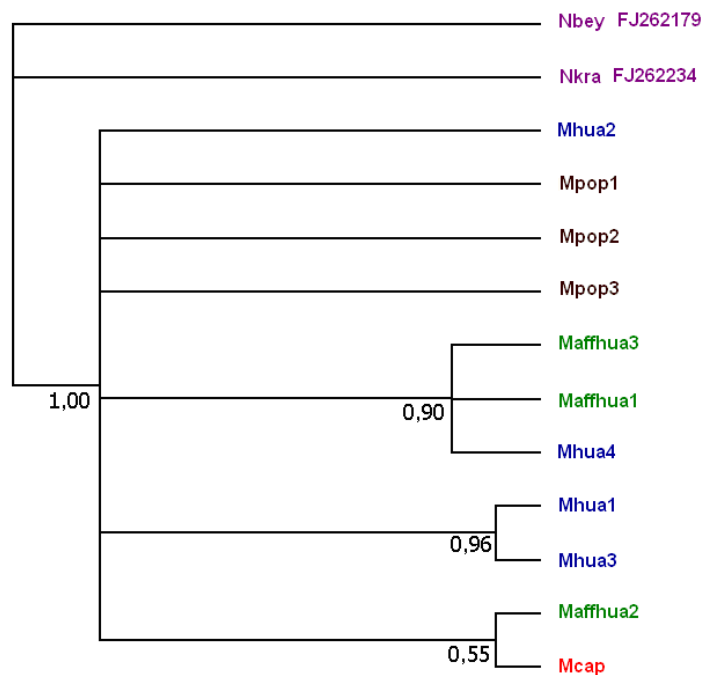




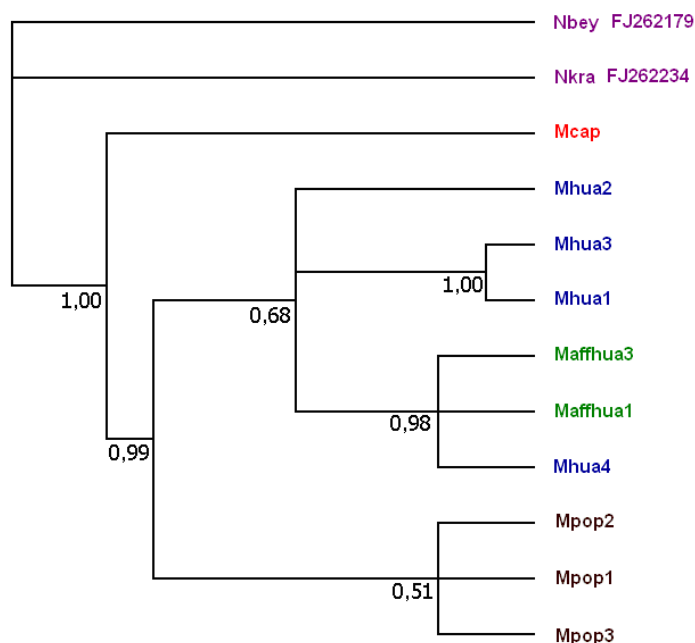
**Figura 33.** Árbol filogenético obtenido por consenso estricto con ML de los haplotipos del gen 16S rRNA del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de *bootstrap*. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank.



**Figura 34.** Árbol filogenético obtenido por consenso estricto con ML de los haplotipos del gen 16S rRNA del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín, excluyendo al individuo Maffhua2. Se muestran los valores de *bootstrap*. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank.



**Figura 35.** Árbol filogenético obtenido por la regla de la mayoría del análisis de Inferencia Bayesiana de los haplotipos del gen 16S rRNA del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de probabilidad posterior. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank.

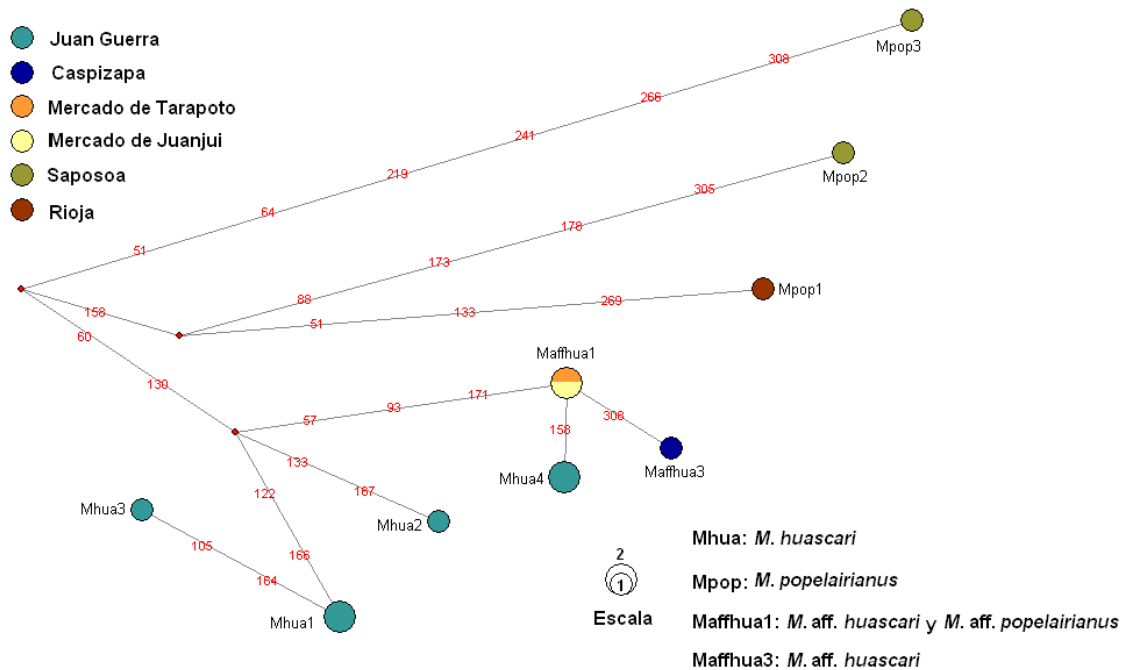


**Figura 36.** Árbol filogenético obtenido por la regla de la mayoría del análisis de Inferencia Bayesiana de los haplotipos del gen 16S rRNA del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín, excluyendo al haplotipo Maffhua2. Se muestran los valores de probabilidad posterior. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo con sus respectivos números de accesoión del GenBank.

### 3.5.2.6. Análisis de Network

El *network* del 16S rRNA agrupó las secuencias en dos, el primero a los *M. popelairianus* y el segundo a *M. huascari* y *M. aff. huascari*. Los haplotipos Maffhua3 y Maffhua1 quedaron separados por sólo una mutación de Mhua4.

El grupo de los tres *M. popelairianus* es bastante divergente, a pesar de que Mpop2 y Mpop3 pertenecen a la misma localidad están separados por 11 cambios mutacionales, y asimismo, entre el individuo de Rioja y los otros dos hay 7 y 10 mutaciones, respectivamente (figura 37).



**Figura 37.** Network de los haplotipos del gen 16S rRNA. Cada círculo representa un haplotipo, cada color indica la localidad (etiquetada a la izquierda de la figura) y el tamaño informa la frecuencia (la escala se encuentra a la derecha de la imagen). Los números de color rojo son las posiciones en donde ha ocurrido una mutación. Los círculos pequeños de color rojo representan la presencia de un haplotipo no muestreado o extinto. Nótese que el haplotipo Maffhua1 es compartido por *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*.

### 3.5.2.6. Barcode

No se pudieron obtener perfiles del 16S rRNA que permitan discriminar especies, porque las topologías de los árboles evolutivos no se mantuvieron constantes al variar las metodologías.

### 3.5.3. Genes 16S rRNA y COI

#### 3.5.3.1. Reconstrucción filogenética

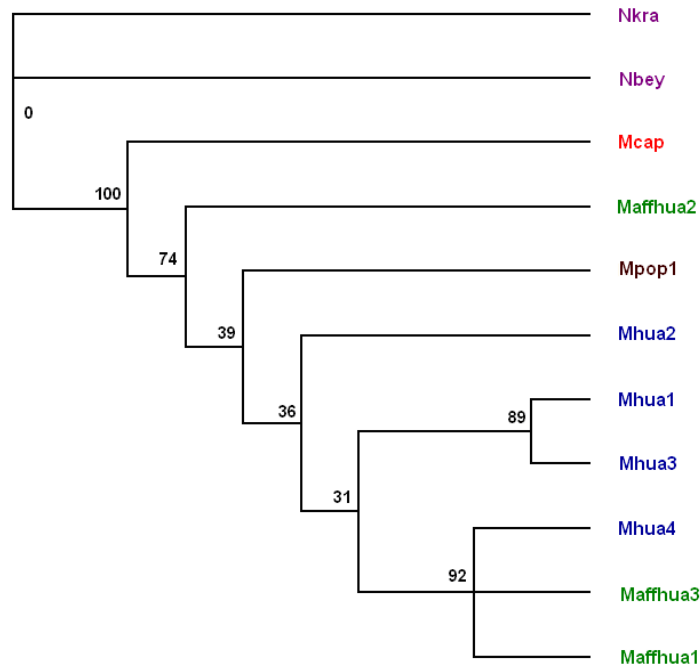
Antes de realizar este análisis se realizó la prueba de homogeneidad de la partición (Homogeneity Test), la que arrojó como resultado un valor de P igual al 0,92 ( $P > 0.05$ ), con lo que se acepta la hipótesis de la no existencia de diferencias entre las señales filogenéticas de ambos marcadores.

Para el ML, el modelo de sustitución nucleotídica elegido por la comparación de los logaritmos de las tasas de verosimilitud realizado en el programa Model Test fue TVM+I+G, el parámetro alfa de la distribución gamma fue 5,3197 y la proporción de sitios invariantes fue 0,5998. En el caso de BI se utilizaron los dos modelos de sustitución nucleotídica obtenidos para cada gen por el criterio de verosimilitud, es decir, GTR+G para el COI y GTR+I+G para el 16S rRNA

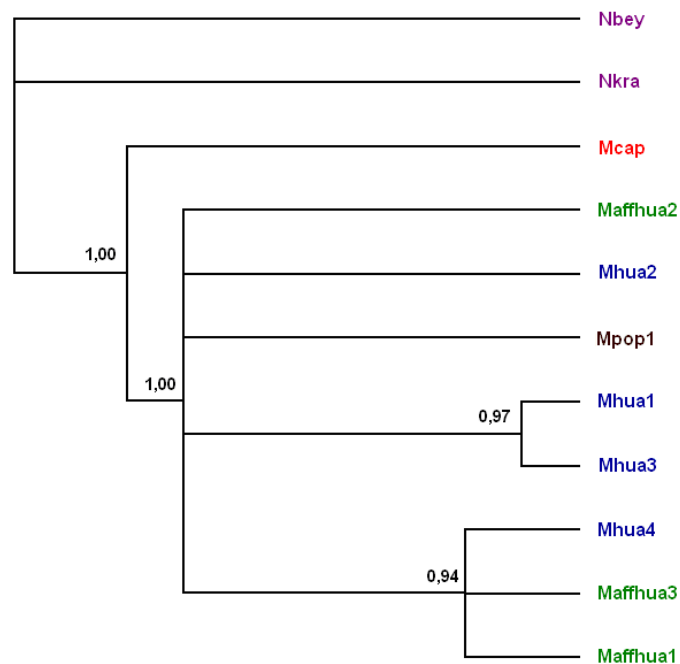
El enfoque filogenético con ML, mostró que *M. popelairianus*, *M. huascari* y *Megalobulimus* spp., con excepción del haplotipo Maffhua2, que se colocó en posición basal a éstos, se encuentran en un mismo clado pero con valores de *bootstrap* por debajo del 40% y cuyas relaciones evolutivas son imposibles de determinar (figura 38).

El filograma producido por BI indicó una pobre divergencia entre el haplotipo Mpop1 y el clado *M. huascari* y *Megalobulimus* spp., que se presenta como polifilético por la posición basal de Maffhua2 (figura 39).





**Figura 38.** Árbol filogenético obtenido por consenso estricto con ML de las 999 posiciones correspondientes a la matriz de datos combinando de los haplotipos de los genes 16S rRNA y COI del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de *bootstrap*. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo.



**Figura 39.** Árbol filogenético obtenido por la regla de la mayoría del análisis de Inferencia Bayesiana de las 999 posiciones nucleotídicas de la matriz de los datos con los haplotipos de los genes 16S rRNA y COI del género *Megalobulimus* del Departamento de San Martín. Se muestran los valores de probabilidad posterior. El haplotipo Maffhua1 fue presentado por dos individuos con identificaciones inciertas, nominados como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*. Azul: *M. huascari*, verde: *Megalobulimus* spp., marrón: *M. popelairianus*, rojo: *M. capillaceus* y morado: taxa extragrupo.

## **4. Discusión**

#### 4.1. Estandarización de protocolos

Existe una clara diferencia entre los porcentajes de éxito de las extracciones de ADN de las especies *M. capillaceus* y *M. huascari* (cerca al 90%) con respecto a *M. popelairianus* (60%), siendo la de esta última mucho menor. Ello puede ser causado por características de este molusco como carbohidratos en la baba o pigmentos del tejido muscular del pie que no pudieron ser extraídos con el protocolo utilizado (Ramírez, 2008). Mutaciones en la región 3' donde se hibridan los iniciadores pueden causar menor eficacia de amplificación y por tanto algunas veces se obtendrían bandas muy tenues y tal vez imperceptibles. Estas extracciones fueron realizadas aproximadamente 6 meses después de la colecta lo que también pudo haber influenciado negativamente, ya que el alcohol (preservante de las muestras) acidifica el tejido y degrada el ADN (Hajibabaei *et al.*, 2005).

Aproximadamente la mitad de las amplificaciones con resultados satisfactorios para el marcador 16S rRNA de los individuos de la especie *M. popelairianus* dieron productos positivos para el COI, en comparación con mayor porcentaje de éxito de este protocolo en *M. capillaceus* y *M. huascari*, ello demuestra que aún es ineficiente para la primera especie.

Una posible razón, tendría su origen en el protocolo de extracción de ADN, ya que en pulmonados se ha demostrado que algunos métodos pueden disminuir radicalmente la efectividad de las amplificaciones del COI. Además, el método sugerido para babosas es DNeasy Tissue Kit manufacturado por Qiagen (Skugiene & Soroka, 2003), y podría también ser útil para los taxa en estudio. Por otro lado, puede ser también ocasionada por la diferencia en el diseño de los *primers*, los del 16S rRNA fueron creados específicamente para moluscos (Ramírez, 2006), entre tanto los del COI son universales (Folmer *et al.*, 1994), por lo que, las regiones donde se unen los iniciadores pueden presentar algunos cambios mutacionales, evitando que éstos se hibriden correctamente o no lo hagan. Más aún, al trabajar con una región tan variable como lo es la del COI, que además es codificante, por lo que va a acumular una gran cantidad de mutaciones en la tercera posición de los codones, hace muy difícil generar iniciadores que funcionen para un amplio espectro de taxa (Vences *et al.*, 2005).

El problema antes acotado puede ser solucionado agregando algunos reactivos a la mezcla de los reactivos de PCR, tales como seroalbúmina bovina, betaína, DMSO (Al-Soud & Radstrom, 2000) y trehalosa (Hajibabaei *et al.* 2005), los cuales van a aumentar el porcentaje de éxito de las amplificaciones porque se unen a inhibidores de la *Taq* ADN polimerasa o la estabilizan, pero va a hacer más caro el procedimiento.

A pesar de una buena *performance* de amplificación del COI para los especímenes de *M. capillaceus*, se encontró un problema diferente, la presencia de más de una banda en un 56,76% de las amplificaciones exitosas de este marcador a una temperatura de *annealing* igual a 45°C, especialmente en individuos provenientes de la localidad de Piscoyacu (100%). Este problema fue resuelto aumentando la temperatura de hibridación primero a 48°C, sin obtener resultados deseados y en última instancia a 50°C, en la que todos los que tuvieron esta dificultad se convirtieron en resultados positivos. Esta temperatura ha sido utilizada en investigaciones anteriores en Gastrópodos (Hyman *et al.*, 2007; Remigio & Hebert, 2003 y Donald *et al.*, 2005). El Consorcio para el *Barcode* de la vida (CBOL, por sus siglas en inglés) sugiere, en una guía creada por Ivanova y colaboradores el año 2005, utilizar un protocolo de amplificación con dos temperaturas de *annealing*, primero a 45°C sólo por dos ciclos, seguido de 35 ciclos con 51°C.

#### **4.2. Calidad de los datos**

La distribución de las transiciones y transversiones con respecto a las distancias genéticas con los taxa de grupo externo, indicó niveles moderados y altos de saturación en los genes COI y 16S rRNA, respectivamente. En el caso del marcador codificante, estos niveles de saturación en las transiciones son causadas por los cambios en la tercera posición de los codones. Ambos resultados pueden parecer desalentadores para realizar los análisis filogenéticos, pero fueron corregidos utilizando un modelo de sustitución nucleotídico más complejo y apropiado para cada gen.

De los alineamientos, se observa que el 42% y 32% de las posiciones nucleotídicas son catalogadas como variables para el 16S rRNA y COI, respectivamente. De lo que se puede deducir que probablemente la tasa de mutación del COI sea menor en este taxón. También, se nota que el 68% y 72% de los sitios variables

son parsimoniosamente informativos para los loci 16S rRNA y COI, respectivamente, lo cual sugiere que la información que llevan las secuencias del COI es de mayor calidad para hacer inferencias filogenéticas.

### 4.3. Distancias genéticas

*M. capillaceus* presentó valores más altos de divergencia del gen COI con respecto a las otras especies (>19%). Dentro del grupo de los caracoles de mayor tamaño, Maffhua2 presentó valores mayores al 6,7%, que son superiores al 3%, que es el promedio de las distancias del haplotipo Mpop1, que corresponde a otra especie, con los otros *M. huascari* y *Megalobulimus. spp.*

En el otro marcador se encontraron valores superiores a 18% de divergencia de *M. capillaceus* con respecto al resto. Maffhua2 presentó valores por encima del 4,5% de distancia con respecto a los otros haplotipos. Al efectuar la misma comparación con *M. popelairianus*, los porcentajes variaron entre 1,8% y 3,5%.

El haplotipo Maffhua2 para el gen COI es muy divergente a *M. huascari*, *Megalobulimus spp.* y *M. popelairianus*. Una posible causa de ello, es que se haya coamplificado con una región duplicada (Campbell & Barker, 1999), heteroplásmica (Frey & Frey, 2004) o pseudogenes generados por integración de este marcador molecular en el genoma nuclear (Bensasson *et al.*, 2001). Estas tres hipótesis quedan descartadas porque se han utilizado dos genes que se encuentran en segmentos de ADN diferentes y en ambos casos ocurrió el mismo fenómeno. Además, presentó una composición de bases nucleotídicas muy parecida al resto del género *Megalobulimus* en las dos regiones genómicas.

En los moluscos europeos del género *Iberus* la divergencia intraespecífica, tanto en el gen 16S rRNA como en el COI, en promedio no es superior al 5% (Elejalde *et al.*, 2008). En el complejo de especies *Bostryx modestus* de Lomas del Perú, Chumbe (2008) reportó la presencia de un haplotipo con distancias genéticas entre 3% a 4% con respecto a los otros miembros del complejo. De manera contraria, se encuentran valores de distancias genéticas dentro de especies de otros caracoles terrestres en el gen 16S rRNA, superiores al 18% (Chiba *et al.*, 1999; Pinceel *et al.*, 2005). En la subclase

Orthogastropoda también se han detectado especies con individuos extremadamente divergentes, con porcentajes superiores al 10% (Frey *et al.*, 2008; Dillon & Frankis, 2004). Tomando en cuenta la posibilidad de estos valores extremos, cabe la posibilidad de incluir a todos los especímenes de *M. huascari*, *M. aff. huascari*, *M. aff. popelairianus* e inclusive a *M. popelairianus* como una sola especie.

Por otra parte, si se considera que la variación intraespecífica es casi siempre menor al 2% para el gen COI (Hebert *et al.*, 2003a), se pueden incluir a los individuos cuya clasificación específica se mantuvo en duda (con excepción de *M. aff. huascari* número 91), en el grupo de *M. huascari* (divergencia entre ambos grupos menor a 1%). Si se toma en cuenta el valor umbral de 4% de divergencia en el gen COI para identificar especies de caracoles terrestres (Davison *et al.*, 2009), entonces según este gen, *M. huascari*, *Megalobulimus* spp. y *M. popelairianus* serían una sola especie.

#### **4.4. Índices moleculares**

Al analizar los resultados es resaltante la extremadamente baja diversidad genética de *M. capillaceus*, la que es producida por la existencia de un solo haplotipo para ambos loci mitocondriales y para individuos localizados en ocho localidades separadas como mucho por 110 km.

A pesar de que *M. capillaceus* está amplia y densamente distribuida en el Departamento de San Martín, siempre asociado a poblaciones humanas, puede que haya pasado por una constricción demográfica, produciendo endogamia y cuellos de botella. Por otra parte, son encontrados preferentemente en huertos, con lo que su relación con el hombre es bastante estrecha y se puede pensar que son transportados constantemente entre las localidades por los pobladores de manera accidental o para comercializarlos en los mercados de la zona, lo que podría causar el efecto fundador, explicando la baja variabilidad genética.

En la actualidad se puede encontrar a *M. capillaceus* en un número de individuos, inclusive en mucha mayor cantidad que en las otras especies en estudio, lo que podría sugerir erróneamente que la salud poblacional de esta especie es óptima. Conclusión equivocada, ya que esta carencia de diversidad disminuye su capacidad para

adaptarse a nuevos ambientes y su protección contra las enfermedades (Hawley *et al.*, 2005; Frankham *et al.*, 1999; Lacy, 1997), por tanto es una marca en su genoma que puede ponerlo en peligro de extinción.

La carencia de diversidad genética en varias poblaciones de *M. capillaeus* ubicadas a lo largo de los puntos de colecta del Departamento de San Martín, hace imposible que esta especie tenga una estructuración geográfica de la variación genética en los loci en estudio (Avise, 2000).

Los índices moleculares presentados para *M. huascari* se usan sólo de referencia, porque tienen poco valor estadístico debido al pequeño universo muestral evaluado. Cabe destacar, según los dos genes mitocondriales evaluados, la diversidad haplotípica es muy alta y la diversidad nucleotídica es baja, lo que puede haber sido originado por un evento de cuello de botella seguido por una rápida expansión (Grant & Bowen, 1998).

La ocurrencia de este acontecimiento en la historia evolutiva de las poblaciones de *M. huascari* puede haberse debido a la pérdida y fragmentación de sus hábitats naturales por crecimiento de las poblaciones humanas o por su explotación excesiva, al igual que con la especie anterior.

#### **4.5. Relaciones evolutivas**

En general, las topologías de los árboles filogenéticos fueron variables según el marcador molecular y la metodología. En el gen COI, los resultados fueron prácticamente iguales a pesar de que se variaba la metodología, pero con el gen 16S rRNA la posición de los linajes cambiaba según la enfoque filogenético utilizado. La variabilidad en los resultados filogenéticos es uno de los mayores problemas para analizar las relaciones evolutivas de los taxa (Philipps *et al.*, 2004). Se conoce que este fenómeno puede ser evitado por la elección de un correcto modelo de sustitución nucleotídica y optimizando la calidad, así como cantidad de datos (Wägele & Mayer, 2007), lo que podría indicar que el criterio de verosimilitud utilizado para la elección de los modelos de sustitución no fue el apropiado o que los datos no estaban en condiciones adecuadas. Lo último puede haber ocurrido especialmente en el *set* de datos

del 16S rRNA por la evidencia de altos niveles de saturación. Además, a pesar de que el modelo de sustitución nucleotídica sea el correcto existen procesos en la evolución de las poblaciones que pueden incrementar o disminuir las tasa de sustitución en diferentes regiones genómicas y en diferentes linajes, lo cual produciría señales filogenéticas difíciles de reconocer (Wägele & Mayer, 2007).

En la mayoría de los análisis dentro del clado de *M. huascari* quedaron unidos los haplotipos de Juan Guerra, Mhua1 y Mhua3. Así como también, en otro clado se formó una politomía entre Mhua4 de Juan Guerra, Maffhua3 de Caspizapa y Maffhua1 que tenía dos individuos, provenientes de los mercados de Juanjui y Tarapoto.

Siguiendo a lo antes mencionado sobre la procedencia de los individuos del haplotipo Maffhua1, se podría pensar en la posibilidad de que provinieran de la localidad de Caspizapa, Juan Guerra o regiones aledañas, siempre y cuando existiera una estructuración geográfica de la arquitectura genética de esta especie, la cual por ahora es incierta.

Por otra parte, la localización geográfica verdadera del individuo Maffhua2 permanece no resuelta por su alta divergencia con los otros haplotipos, pero por haber sido comprado al mismo tiempo que el individuo con código 90, queda la posibilidad de que provengan del mismo lote y por tanto de la misma área.

Los árboles filogenéticos de los haplotipos del marcador COI obtenidos con los cuatro métodos (NJ, MP, ML e BI) presentaron igual topología. El clado de *M. huascari* y *Megalobulimus* spp. se mantuvo como un linaje monofilético y *M. popelairianus* se mostró como su clado hermano. *M. capillaceus* conservó una posición basal a los otros dos grupos. Todos los nodos mencionados atrás se presentaron estadísticamente robustos. Ello indicaría que los individuos cuya clasificación bajo caracteres conchológicos fue incierta a nivel de especie, es muy probable que formen parte de la especie *M. huascari*. Además, un análisis con mayor número de secuencias de COI de *M. popelairianus*, lo podrían separar en un linaje monofilético diferente al de *M. huascari*, asegurándole un linaje que sería considerado como otra especie. *M. capillaceus* se presentó bastante lejano filogenéticamente y sus características



morfológicas bastante diferentes a las de los *congompes*, es evidente que divergió de los otros linajes mucho antes en el tiempo.

Sin embargo, las reconstrucciones filogenéticas del 16S rRNA variaron según las metodologías usadas. Los árboles filogenéticos obtenidos con NJ y MP presentaron iguales topologías, sin importar si se consideraban o no los *gaps* como otro carácter. Se muestra la polifilia de *M. huascari* y *Megalobulimus* spp. ocasionada por el haplotipo Maffhua2 y a los individuos de *M. popelairianus* como un grupo monofilético y hermano al linaje de *M. huascari*. De manera contradictoria, los filogramas obtenidos con ML y BI presentan al haplotipo Maffhua2 unido a *M. capillaceus* con pobre soporte de *bootstrap* (54%) y probabilidad posterior (0,55). Esto último se puede deber a que, como los alineamientos con el marcador 16S rRNA presentaron varias variantes del tipo inserciones-deleciones (observadas en los alineamientos en forma de *gaps*), las posiciones con *indels* no han sido tomadas en cuenta por estos dos clases de análisis, por tanto se descartó parte de la información que podría resolver sus relaciones evolutivas.

Esto se puede deber al fenómeno de *Long branch attraction*, donde dos linajes que evolucionan más rápido o con altos valores de divergencia con respecto a los otros tienden a tener ramas más largas y son reconocidos como taxa cercanamente relacionados. Esta alta acumulación de mutaciones puede producir saturación, en donde las homoplasias van a ser observadas en el alineamiento como sinapomorfias (Bergsten, 2005).

Al analizar las filogenias sin el individuo Maffhua2, se evidencia que los nodos de los linajes pertenecientes a *M. huascari*, *M. popelairianus* *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus* colapsaron en una politomía en ML, pero en BI se presentan como dos grupos hermanos y monofiléticos. *M. capillaceus* se colocó siempre en posición basal.

La matriz de datos del concatenado de las dos regiones mitocondriales produjo una politomía que agrupa a *M. popelairianus* con el filogrupo conformado por *M. huascari* y *Megalobulimus* spp. con excepción del Maffhua2, que se dispuso en posición basal (*bootstrap* de ML igual a 74% y la probabilidad posterior para BI de 0,98).

La información de ambos genes evidencia que no es posible diferenciar filogenéticamente a *M. popelairianus* de *M. huascari*, por tanto ambas podrían ser parte de un complejo de especies. Esto se podría esclarecer si se utilizaran marcadores que hayan evolucionado independientemente de los escogidos en este estudio, como lo son los marcadores nucleares.

#### **4.6. Network**

Las redes de haplotipos de *M. popelairianus*, *M. huascari* y *Megalobulimus* spp. de los dos genes, mostraron a los individuos de *M. popelairianus* separados del resto en 18 mutaciones en el caso del COI y 10 para el 16S rRNA. Por otra parte, no se evidenciaron inconsistencias en ninguno de los dos *networks*.

Los individuos de *M. aff. huascari* con código 90 y *M. aff. popelairianus* con número 78, provenientes de los mercados de Tarapoto y Juanjui, respectivamente, colapsaron en un solo haplotipo (denominado Maffhua1) para ambos marcadores. Esto indica la existencia de plasticidad fenotípica, que dio como resultado individuos diferenciados morfológicamente en sus conchillas, pero que genéticamente pertenecen a un mismo linaje, fenómeno que es un problema en la taxonomía de los moluscos (Goodacre, 2001). Además, existe la posibilidad de que ambos individuos procedan de la misma área o de regiones cercanas, lo suficiente como para que el flujo genético permita la conservación del haplotipo.

Para complementar lo anterior, el haplotipo Maffhua1 quedó muy relacionado a Maffhua3 y Mhua4, separados por uno o dos pasos mutacionales del primero con cada marcador por separado. Ello reafirma la idea de que su procedencia podría ser Caspizapa o Juan Guerra, pero entre estos dos hay más certeza de que sea de la primera porque se localiza en forma equidistante en aproximadamente 50 km a ambos mercados.

#### **4.7. Barcode**

Las secuencias de COI de *M. huascari* presentaron una divergencia menor al 2%, así como también se encontró que se agrupaban filogenéticamente en un clado con nodos bien sustentados con todas las metodologías usadas. Con todo ello, el perfil de

COI de *M. huascari* cumplió con todas especificaciones para ser llamado como código de barras de ADN.

La región del gen COI de *M. capillaceus* no presentó ninguna variante mutacional, lo que determina una divergencia intraespecífica de 0%. Además, es irrefutablemente monofilética, por tanto puede ser llamado también como código de barras de ADN.

A pesar de que el grupo de los Stylommatophora muchas veces presenta alto grado de divergencia en su ADN mitocondrial, tal como se expuso anteriormente, los resultados obtenidos en esta tesis son consistentes con la utilización del COI como *barcode*. Esto refuerza los resultados obtenidos por Davison y colaboradores en el 2009, quienes utilizando secuencias de COI obtenidas del GenBank de 381 pb y 228 pb comparando a 97 y 127 especies, respectivamente, concluyeron que este gen tiene un gran potencial para discriminar especies de caracoles terrestres.

Esto quiere decir, que en el futuro, si se tuviera tan solo un trozo de tejido, se podría establecer con bastante grado de certeza si se trata de alguna de estas especies.

Por otro lado, las comparaciones con las bases de datos y los árboles filogenéticos NJ con las 100 secuencias COI más similares a las de los haplotipos Mhual y Mcap, revelaron que no existían secuencias de ADN parecidas, por tanto pertenece únicamente a *M. huascari* y *M. capillaceus*, respectivamente. Además, dado los bajos porcentajes de similitud y la no agrupación en los filogramas, demuestran que hay un gran vacío de información en Megalobulimidae y familias evolutivamente cercanas.

El gen 16S rRNA no fue coherente al resolver la relaciones evolutivas de estos organismos, en consecuencia no puede ser usado como un código de barras de ADN para los taxa aquí estudiados.

#### **4.8. Implicancias en la conservación y uso sustentable de especies de *Megalobulimus*.**

Los caracoles terrestres comestibles del género *Megalobulimus* tienen bastante acogida por el poblador de San Martín y además su venta se ha extendido a varios mercados del Perú, incluso de la capital.

*M. huascari*, al ser de mayor tamaño, es más vistoso y es comercializado en el mercado de La Parada (Lima) debido a sus supuestas propiedades cosméticas y en el mercado de Tarapoto su venta es básicamente como alimento. Tiene la ventaja de que ya se han realizado estudios donde se demuestra que esta especie tiene la capacidad de adaptarse satisfactoriamente a condiciones de cultivo en cautiverio (Rengifo *et al.*, 2004).

*M. capillaceus* presenta las mejores características nutricionales y un morfotipo que se asemeja al de otros caracoles que se consumen como una delicadeza en otras partes del mundo y por tanto tiene una latente posibilidad de ser exportado (Ramírez & Cáceres, 1991).

Por los resultados de este estudio, es un hecho que *M. capillaceus* sea una especie amenazada y mayores estudios de la genética de poblaciones de *M. maximus* podrían demostrar que también está en peligro. Si se le suma la constante degradación de sus hábitats por la deforestación y la expansión agrícola, es de vital importancia impulsar la crianza en cautiverio de estos organismos, para evitar la erosión genética en las poblaciones de estas especies y aprovechar de manera sustentable este recurso.

Actualmente, se utilizan varios criterios para seleccionar los taxa con los que se van a realizar estrategias de conservación. Para escoger estos grupos de manera tal que se tengan en cuenta inclusive categorías por debajo del nivel de especie se ha manejado el concepto de unidades evolutivamente significantes (ESU), el cual de manera general califica como unidades a los grupos geográficamente aislados, genéticamente diferenciados con marcadores neutrales, es decir que se presenten como monofilias en una filogenia (Avice, 1994).

Siguiendo lo anterior, a pesar de que los análisis filogenéticos no fueron concluyentes respecto a las relaciones entre *M. huascari* y *M. popelairianus*, y por tanto no se puede determinar con certeza si forman grupos naturales, están geográficamente aislados y si se le agrega que presentan diversidad morfológica, no se puede descartar que con más investigaciones, cada uno pueda ser considerados como un ESU. *M. capillaceus* es un caso muy distinto, ya que al presentarse, claramente, como un grupo monofilético con individuos poco divergentes genéticamente es evidente que debería ser considerado como un ESU.

#### **4.9. Comentario final**

Se han cumplido los objetivos planteados al principio de este trabajo. Lo más resaltante es que el gen COI resultó ser el adecuado para la diagnosis de especies por medio de *DNA barcode*. Viene la pregunta: ¿Para qué es necesaria esta información? La respuesta es bastante simple, cuando se compran por ejemplo, latas de atún en un mercado en ella se indica claramente el nombre de la especie que está contenida, en tal sentido, si deseamos exportar un recurso, es necesario contar con el nombre específico e inclusive el lugar de procedencia. Esto es muy aparte del granito de arena que se ha colocado para aumentar el conocimiento del proyecto *Barcode of life*.

La baja diversidad genética de estas especies sumada a la constante degradación de sus hábitats y a su sobre explotación, está introduciendo a las especies del género *Megalobulimus* en un agujero del que, tal vez en unos años, ya no puedan salir. La solución más lógica es establecer planes de conservación a largo plazo junto con las comunidades nativas, donde se haga hincapié en la utilización sustentable por medio de la cría en cautiverio de estas especies. En paralelo, se deberían hacer estudios de mercado a nivel internacional que conlleven a exportar estas especies y así promover el desarrollo de estas comunidades.

Este es sólo un ejemplo de los muchos recursos que alberga nuestra gran diversidad de ecosistemas, que lamentablemente, si no se toman las medidas y no se realizan estrategias adecuadas se extinguirán irremediablemente. Por ello es necesario mayores estudios a nivel ecológico y filogeográfico de nuestros recursos de flora y fauna que a la larga van a resultar en el desarrollo del país.

## **5. Conclusiones**

1. Las reacciones de PCR de COI deben ser efectuadas con temperaturas de *annealing* iguales a 45°C para *M. huascari* y *M. popelairianus*; y 50°C para *M. capillaceus*.
2. Existe una alta probabilidad de que *M. aff. huascari* (código 90) y *M. aff. popelairianus* (código 78) de los mercados de Tarapoto y Juanjui, respectivamente, hayan sido colectados en la localidad de Caspizapa, Juan Guerra o zonas cercanas. Por otro lado, la verdadera procedencia de Maffhua2 se mantiene incierta.
3. Las poblaciones estudiadas de *M. capillaceus* presentan una pobre diversidad genética, que disminuiría su capacidad de adaptación y por tanto su supervivencia; podría estar en grave riesgo si no se evita su colecta indiscriminada.
4. Los índices moleculares de *M. huascari* indican de forma preliminar que ha sufrido un proceso de cuello de botella seguido de una rápida expansión.
5. Las distancias genéticas de los genes en estudio de *M. huascari* y *Megalobulimus* spp. (sin Maffhua2) son bajas, pero las diferencias conchológicas indican que estamos ante un complejo de especies o una especie con alta plasticidad fenotípica.
6. La resolución de las relaciones filogenéticas de *M. huascari* y *M. popelairianus* de San Martín con el COI tuvo una mayor *performace* que con el 16S rRNA.
7. Los individuos cuya identificación específica se mantuvo como *M. aff. huascari* y *M. aff. popelairianus*, con excepción del espécimen *M. aff. huascari* con código 91, pertenecen a la especie *M. huascari*, por su inclusión en un grupo monofilético y su baja divergencia genética en ambos marcadores.
8. Los perfiles COI pueden ser usados como un código de barras de ADN para identificar a los individuos de *M. capillaceus* y *M. huascari*. En el caso de esta

última, se puede determinar con cierta exactitud hasta la procedencia geográfica del espécimen.



## **6. Recomendaciones**

1. La acidificación de las muestras biológicas conservadas en alcohol, es un problema que se va agravando con el paso del tiempo, es por ello que se recomienda realizar las extracciones de ADN con mucha premura, de preferencia inmediatamente después de ser colectadas.
2. Una solución práctica para aumentar el porcentaje de éxito de las amplificaciones del COI en estos taxa, sería diseñar un par de *primers* que sean específicos para moluscos, que hibriden en la región 5' del gen y con los que se amplifique una sección mayor a 500 pb.
3. Evaluar otros loci con mayor tasa de mutación como los microsatélites para evaluar las diferencias intraespecíficas de *M. capillaceus* y efectuar colectas en otras regiones para determinar si estos valores bajos de diversidad genética se mantienen.
4. Establecer programas de conservación para evitar la colecta indiscriminada de estos individuos. Una posibilidad para su uso sustentable sería incentivar su cultivo en cautiverio. Por otro lado, para mejorar su salud genética podría establecerse un plan estratégico basado en la cruce artificial con individuos que posean haplotipos distintos provenientes de otras regiones, siempre y cuando éstos existan.
5. Efectuar análisis con mayor número de secuencias para *M. huascari*, *M. popelairianus* y otras especies del género *Megalobulimus* del Perú, para resolver de una manera contundente las relaciones filogenéticas entre ellos y concluir si se trata de un complejo de especies o dos taxa cercanamente relacionados con plasticidad fenotípica en sus conchas.

## **7. Referencias Bibliográficas**

- Al-Soud, A. & P. Radstrom. 2000. Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 4463–4470.
- Altschul, S. F., T. Madden, A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Res*, 25: 3389-402
- Avise, J. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.
- Avise, J. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press.
- Avise, J., J. Arnold, R. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. Neigel, C. Reeb, & N. Saunders, 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics, *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18: 489-522.
- Bandelt H.J., P. Forster & A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Bensasson, D., D.X. Zhang, D.L. Hartl, G.M. Hewitt. 2001. Mitochondrial pseudogenes: Evolution's misplaced witnesses. *Trends Ecol. Evol.*, 16:314–321.
- Bequaert, J.C. 1948. Monograph of the Strophocheilidae, a neotropical family of terrestrial Mollusks. *At Harvard College*, 100: 1.
- Bergsten, J. 2005. A review of long-branch attraction. *Cladistics*, 21(2): 163-193.
- Bonnell, M.L., R.K. Selander. 1974. Elephant seals: genetic variation and near extinction. *Science*, 184:908–909.

- Brown, W., M. George & A. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 1967-1671.
- Campbell, N.J.H. & S.C. Barker. 1999. The novel mitochondrial gene arrangement of the cattle tick, *Boophilus microplus*: Fivefold tandem repetition of a coding region. *Mol. Biol. Evol.*, 16:732–740.
- Chiba, S. 1999. Accelerated evolution of land snails *Mandarina* in the oceanic Bonin Islands. *Evolution*, 53: 460-471.
- Chumbe, A. 2009. Evolución del complejo de especies *Bostryx modestus* basado en el gen de la Citocromo C Oxidasa subunidad I del genoma mitocondrial. Tesis de Bachiller en Genética y Biotecnología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Convention of Biological Diversity. 1992. Convenio sobre Diversidad biológica. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
- Cox, A. & P. Hebert. 2001. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Mol. Ecol.*, 10: 371–386.
- Davison, A., R. Blackie & G. Scothern. 2009. DNA barcoding of stylommatophoran land snails: a test of existing sequences. *Mol. Ecol.* 9(4): 1092-1101.
- Dillon, R.T. & R.C. Frankis. 2004. High levels of mitochondrial DNA sequence divergence in isolated populations of freshwater snails of the genus *Goniobasis* Lea, 1862. *Am. Malacol. Bull.*, 19:69–77.
- Donald, K.M., M. Kennedy, H.G. Spencer. 2005. The phylogeny and taxonomy of austral monodontine topshells (Mollusca: Gastropoda: Trochidae), inferred from DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 37(2): 474-83.

- Excoffier L., G. Laval, & S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Farris, J.S., M. Källersjö, A.G. Kluge & C. Bult. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics*, 10: 315-319
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz & R. Vrijenhoek. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294-299.
- Frankham, R., K. Lees, M.E. Montgomery, P.R. England, H. Lowe, D.A. Briscoe. 1999. Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Anim. Conserv.*, 2: 255–260.
- Frey, J.E. & Frey B. 2004. Origin of intra-individual variation in PCR-amplified mitochondrial cytochrome oxidase I of *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae): Mitochondrial heteroplasmy or nuclear integration? *Hereditas*, 140: 92–98.
- Frey, M.A. & G.J. Vermeij. 2008. Molecular phylogenies and historical biogeography of a circumtropical group of gastropods (Genus: *Nerita*): Implications for regional diversity patterns in the marine tropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48: 1067–1086
- García-Villacorta, R. 2009. Diversidad, composición y estructura de un hábitat altamente amenazado: los bosques estacionalmente secos de Tarapoto, Perú. *Rev. Peru. Biol.* 16(1): 081- 092.
- Goodacre, S.L. 2001. Genetic variation in a Pacific Island land snail: population history versus current drift and selection. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 268: 121–126.

- Graham, G., P. Mayers & R. Henry. 1994. A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. *BioTechnique*, 16: 48–50.
- Grant, W.A.S. & B.W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The Journal of Heredity*, 89 (5): 415-426
- Hajibabaei, M., J.R. deWaard, N.V. Ivanova, S. Ratnasingham, R.T. Dooh, S.L. Kirk, P.M. Mackie & P.D.N. Hebert. 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 360: 1959–1967.
- Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 41: 95–98.
- Hawley, D.M., K.V. Sydenstricker, G.V. Kollias, A.A. Dhondt. 2005. Genetic diversity predicts pathogen resistance and cell-mediated immunocompetence in house finches. *Biol. Lett.*, 1: 326–329.
- Hebert, P., A. Cywinska, S. Ball & J. deWaard. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Royal. Soc. Lond.*, 270: 313-322.
- Hebert, P., S. Ratnasingham, & J. deWaard. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 270: S96–S99.
- Hebert, P., M. Stoeckle, T. Zemplak & C. Francis. 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *Plos Biology*, 2(10): e312.
- Hoelzel, A.R., J. Halley, S.J. O'Brien, C. Campagna, T. Arnborn, B. Le Boeuf & G.A. Dover. 1993. Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. *J. Hered.*, 84: 443–449.

- Holland, B. & M. Hadfield. 2002. Islands within an island: phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina*. *Mol. Ecol.*, 11: 365-375.
- Hugall, A., C. Moritz, A. Moussalli, & J. Stanisic. 2002. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosophia bellendenkerensis* (Brazier 1875). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(9): 6112–6117.
- Huang, X. & A. Madan. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res.*, 9: 868-877.
- Huelsenbeck, J. & B. Rannala. 2004. Frequentist properties of Bayesian posterior probabilities of phylogenetic trees under simple and complex substitution models. *Syst Biol.*, 53(6): 904-13.
- Huelsenbeck, J. P. & F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Ivanova, N.V., J.R. deWaard; M. Hajibabaei & P.D.N. Hebert. 2005. Protocols for High-Volume ADN Barcode Analysis. Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. Publicado *online* en <http://www.dnabarcoding.ca/>.
- Janzen, D.H. 1988. Tropical dry forest: the most endangered major tropical ecosystem. In: E. O Wilson, eds. Biodiversity. National Academy Press, Washington. Pp: 130-137.
- Ketmaier, V., F. Giusti & A. Caccone. 2006. Molecular phylogeny and historical biogeography of the land snail genus *Solatopupa* (Pulmonata) in the peri-Tyrrhenian area. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 439–451.



- Koblmüller, S., C. Sturmbauer, E. Verheyen, A. Meyer & W. Salzburger. 2006. Mitochondrial phylogeny and phylogeography of East African squeaker catfishes (Siluriformes: Synodontis). *BMC Evolutionary Biology*, 6: 49.
- Lacy, R.C. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *J. Mammal.*, 78: 320–335.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson & D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics Application Notes*, 23(21): 2947–2948.
- Mayaux, P., P. Holmgren, F. Achard, H. Eva, H. Stibig & A. Branthomm. 2005. Tropical forest cover change and options for future monitoring in the 1990s. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 360: 373–384.
- McCarthy, C. 1996. Chromas: version 1.3. Griffith University, Brisbane, Australia.
- Moussalli, A., D.G. Herbert, D. Stuart-Foxd. 2009. A phylogeny of the cannibal snails of southern Africa, genus *Natalina* sensu lato (Pulmonata: Rhytididae): Assessing concordance between morphology and molecular data. *Mol Phylogenet Evol.*, 52(1):167-82.
- Myers, N., R. Mittermeier, C. Mittermeier, G. da Fonseca & J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858.
- O'Brien, S. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 5748-5755.
- ONERN. 1976. Mapa ecológico de Perú: Guía Explicativa, Oficina Nacional de Evaluación de Recursos Naturales, Lima, Perú. 146 pp.
- Nylander, J.A.A. 2004. MrModeltest v2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

- Parson, W., K. Pegoraro, H. Niederstätter, M. Föger, M. Steinlechner. 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int. J. Legal Med.*, 114: 23–28.
- Pfenninger, M., M. Cordellier & B. Streit. 2006. Comparing the efficacy of morphologic and DNA-based taxonomy in the freshwater gastropod genus *Radix* (Basommatophora, Pulmonata). *BMC Evolutionary Biology*, 6:100.
- Philipps, M.J., F. Delsuc, D. Penny. 2004. Genome-scale phylogeny and the detection of systematic biases. *Mol. Biol. Evol.*, 21: 1455-1458.
- Pinceel, J., K. Jordaens & T. Backeljau. 2005. Extreme mtDNA divergences in a terrestrial slug (Gastropoda, Pulmonata, Arionidae): accelerated evolution, allopatric divergence and secondary contact. *J. Evol. Biol.*, 18: 1264–1280.
- Posada, D. & K.A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14 (9): 817-818.
- Ramírez, J. 2008. Genómica evolutiva de *Bostryx aguilari* (Gastropoda: Orthalicidae), relaciones filogenéticas con otros Orthalicidos del Perú. Tesis de título profesional de Biólogo, Genetista y Biotecnólogo. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas.
- Ramírez, R. 2004. Sistemática e Filogeografía dos Moluscos do Ecosistema de “Lomas” do Deserto da Costa Central do Peru. Tese do Doutorado em Zoologia. Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Biociências.
- Ramírez, R. & S. Cáceres. 1991. Caracoles Terrestres (Mollusca, Gastropoda) Comestibles en el Perú. *Boletín de Lima*, 77: 67–74.

- Ramírez, R., C. Paredes & J. Arenas. 2003. Moluscos del Perú. *Rev. Biol. Trop.*, 51 (3): 225-284.
- Ramírez, R., V. Borda, C. Congrains, J. Chirinos, D. Fernández, M. Quispe, P. Romero, C. Calderón, N. Medina, J. Zarria & P. Ramírez. 2009. Diferenciación morfológica y molecular em cuatro especies comerciales de *Megalobulimus* (Mollusca: Gastropoda). XVIII Reunión Científica ICBAR, UNMSM, 19-21 Agosto, Lima-Perú. Libro de resúmenes, pág. 31.
- Ratnasingham, S. & P. Hebert. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Mol. Ecol. Notes*, 7: 355–364.
- Rengifo, V.A., P. Padilla & L. Mori. 2004. Caracterización Morfológica del “Congompe” *Megalobulimus maximus* (Sowerby, 1825) y posibilidades de su cultivos, Iquitos-Perú. Memorias, VI Congreso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonía y Latinoamérica: 269-275.
- Rozas, J., J. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer & R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496–2497.
- Rosello-Mora, R. & R. Amann. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 39-67
- Rundell, R., B. Holland & R. Cowie. 2004. Molecular phylogeny and biogeography of the endemic Hawaiian Succineidae (Gastropoda: Pulmonata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 246-255.
- Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharfj, R. Higuchi, G. Horn, K. Mullis & H. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487–91.
- Simmons, M.P., K.M. Pickett & M. Miya. 2004. How meaningful are Bayesian posterior probabilities? *Mol. Biol. Evol.*, 21: 188-199.

- Skugiene, G. & Soroka M. 2003. A comparison of different DNA extraction methods for slugs (Mollusca; Pulmonata). *Ekologija* (Vilnius), 1: 12-16.
- Smith, A., B. Fisher & P. Hebert. 2005. DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 360(1462): 1825–1834.
- Sullivan, J. & P. Joyce. 2005. Model selection in phylogenetics. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 36: 445–466
- Swofford, D. 1998. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b8a. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599.
- Tautz, D., P. Arctander, A. Minelli, R. Thomas & A. Vogler. 2003. A plea for DNA taxonomy. *Trends Ecol. Evol.*, 18: 70–74.
- Thomaz, D., A. Guiller & B. Clarke. 1996. Extreme Divergence of Mitochondrial DNA within Species of Pulmonate Land Snails. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 263(1368): 363-368.
- Vences, M., M. Thomas, A. Meijden, Y. Chiari & D. Vieites. 2005. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology*, 2: 5.
- Wade, C., P. Mordan & B. Clarke. 2001. A phylogeny of the land snails (Gastropoda: Pulmonata). *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 268: 413-422.

- Wade, C.M., Mordan P.B. & F. Naggs. 2006. Evolutionary relationships among the Pulmonate land snails and slugs (Pulmonata, Stylommatophora). *Biological Journal of the Linnean Society*, 87: 593–610.
- Wägele, J.W. & C. Mayer. 2007. Visualizing differences in phylogenetic information content of alignments and distinction of three classes of long-branch effects. *BMC Evol Biol.*, 7: 147
- Ward, R., T. Zemlak, B. Innes, P. Last & P. Hebert. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 360(1462) 1847-1857.
- Wares, J. & C. Cunningham. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, 12: 2455–2469.
- Xia, X. & Z. Xie. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92: 371-373.